(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 26 052 T2** 2006.04.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 045 902 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 26 052.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/00717**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 902 219.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/036519**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.01.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **22.07.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.10.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.07.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.04.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/11*** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
71416 P **14.01.1998** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Human Gene Therapy Research Institute, Des Moines, Ia., US

(72) Erfinder:
PANCHAL, G., Rekha, Des Moines, US; LINK, J., Charles, Des Moines, US

(74) Vertreter:
FRITZ Patent- und Rechtsanwälte, 59757 Arnsberg

(54) Bezeichnung: **Menschliche Suppressor-tRNA Oligonukleotide Verfahren für deren Verwendung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vier Nukleotidbasen von DNA-Molekülen tragen die genetische Information. Diese Information wird in Form von Codonen, von aneinandergrenzenden Basen durch eine mRNA transkribiert und durch eine tRNA und Ribosome translatiert, um Proteine zu bilden. Der genetische Code ist die Beziehung zwischen einem Triplett-Codon und einer bestimmten Aminosäure. Von den vierundsechzig möglichen Codon-Tripletts, die den genetischen Code bilden, gibt es drei Stopp- oder Abschlusscodone, welche dafür bekannt sind, die Proteinproduktion in den zellulären Ribosomen zu stoppen; die anderen einundsechzig Tripletts im Code beziehen sich auf die eine oder andere Aminosäure. (siehe Tabelle 1)

TABELLE 1

UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
UUC Phe	UCC Ser	AUC Tyr	UGC Cys
UUA Leu	UCA Ser	UAA Stopp	UGA Stopp
UUG Leu	UCG Ser	UAG Stopp	UGG Trp
CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
CAU Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
AUU Lle	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
AUC Lle	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
AUA Lle	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

[0002] Wenn die genetischen Instruktionen an den Ribosomen translatiert werden, sind die Aminosäuren aneinandergereiht, um komplexe Polypeptide zu bilden. Wenn allerdings ein Stopp-Codon gelesen wird, wird es als Stopp-Signal interpretiert, das die Proteinproduktion beendet. Die drei Stopp-Codons sind UAG (Amber), UAA (Ochre) und UGA (Opal). Mutationen, die ein Codon in ein Stopp-Codon ändern, werden Nonsense-Mutationen genannt und, als ein Ergebnis, können genetische Phänotypen nicht exprimiert werden. Folglich kann trotz des Vorhandenseins einer genführenden Expression ein entscheidendes Protein nicht produziert werden, weil ein unerwünschtes Stopp-Signal ein Ribosom erreicht und ein unfertiges Protein beendet.

[0003] Transfer-RNAs (tRNAs) translatieren die Messenger-RNA (mRNA) an dem Ribosom in ein Protein. Jede Transfer-RNA enthält einen Anti-Codonbereich, der mit einer mRNA hybridisiert, sowie eine Aminosäure, welche an das wachsende Peptid angefügt werden kann. Das Strukturgen der tRNA ist etwa 72 bis 90 Nukleotide lang und klappt in eine Kleeblattstruktur. Die tRNAs werden durch die RNA-Polymerase-III transkribiert und enthalten ihre eigenen intragenischen Spaltungspromotoren, die ein Teil der vollentwickelten tRNA Codiersequenz wird (Sharp S.J., Schaack J., Coolen L., Burke D.J. und D., „Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes", Crit. Rev. Biochem, 19:107-144 (1985); Geiduschek E.O., und Tocchini-Valentini, „Transcription by RNA polymerase III, Annu. Rev. Biochem. 57:873-914 (1988)).

[0004] Nonsense-Suppressoren sind Allele der tRNA-Gene, die in das Anticodon geändert sind, so dass sie als Antwort auf ein Abschlusscodon (Stopp-Codon) eine Aminosäure einfügen können. Beispielsweise führt eine Ochre-Mutation zu einer Schaffung eines UAA-Codons in der Messenger-RNA. Ein Ochre-Suppressorgen produziert die tRNA mit einem AUU Anticodon, das an dem UAA-Ort eine Aminosäure einfügt, was trotz des Vorhandenseins eines Nonsense-Codons eine kontinuierliche Translation ermöglicht.

[0005] Eine Anzahl von Nonsense-Suppressor-tRNA-Allelen sind in Prokaryoten und Eukaryoten, wie zum Beispiel in Hefe und C.elegans identifiziert worden. Jedoch konnte bis heute keine Säugetierzelllinie, die eine funktionsfähige Suppressor-tRNA enthält, isoliert werden, indem man eine klassische genetische Selektion verwendet. Versuche, Suppressor-tRNAs von höheren Eukaryoten zu isolieren, führten zu der Identifikation einer opal-Suppressor-Phosphoserin-tRNA im Hühnergenom (Hatfield D.L., Dudock B.S., und Eden F.C., „Characterization and nucleotide sequence of a chicken gene encoding an opal Suppressor-tRNA and its flanking DNA segments", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4940-4944 (1983)), und später in dem menschlichen Genom (O'Neill V.A., Eden F.C., Pratt K., und Hatfield D. L., "A human opal suppressor-tRNA gene and pseudogene", J. Biol. Chem. 260:2501-2508 (1985)). Diese beiden unterscheiden sich nur bei einer einzigen Nukleotidposition voneinander. Suppressor-tRNAs können auch ein Durchlesen (engl.: read through) der natürlich auftretenden Stopp-Codonen bewirken, um dadurch verlängerte Proteine mit geänderten Funktionen zu produzieren. Die Unterdrückung des Abschlusses kann für die Zelle schädlich sein, obwohl mehrere natürliche Stopp-Codonen am Ende des Gens einen Schutz vor solchen schädlichen Effekten zur Verfügung stellen können. Die unterschiedlichen Suppressor-tRNAs unterscheiden sich in ihrer Unterdrückungseffizienz. In E.coli und anderen Systemen sind die Amber-Suppressoren, verhältnismäßig effizienter, Ochre-Suppressoren weniger effizient, während Opal-Suppressoren die Schwächsten sind, dieses legt nahe, dass die Amber-Codonen nicht so häufig verwendet werden, um die Proteinsynthese zu beenden, während Ochre- und Opal-Codonen häufiger als natürliche Beendigungssignale verwendet werden.

[0006] Die Wiederherstellung eines normalen Phänotyps durch Suppressoren wird vom Aminosäuretyp abhängen, der bei der Position des Nonsense-Codons eingefügt ist. Die eingefügte Aminosäure kann mit der Struktur, der Funktion oder der Stabilität des Genproduktes inkompatibel sein. Daher existiert ein Bedarf für eine große Vielfalt an Suppressor-tRNAs, um unterschiedliche Aminosäuren einzufügen. Es wurde gezeigt, dass Amber- und Ochre-Suppressoren, die von einem Xenopus Laevis Tyrosin-tRNA-Gen abgeleitet wurden, sowohl in Säugetierzellen in transienten Transfektionsproben als auch in permanenten Zelllinien funktionsfähig sind. (Laski F.A., Belagaje U.L., RajBhandary U.L. und Sharp P.A., „An amber Suppressor – tRNA gene derived by site-directed mutagenesis: cloning and expression in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 79:5813-5817 (1982); Laski F.A., Belagaje R., Hudzoal R.M., Capecchi M.R., Palese P., RajBhandary U.L. und Sharp P.A., „Synthesis of an ochre suppressor tRNA gene and expression in mammalian cells", EMBO J 3:2445-2452 (1984); Hudziak R.M., Laski R.A., RajBhandary U., Sharp P.A. und Cappecchi M.R., „Establishment of mammalian cell lines containing multiple nonsense mutations and functional suppressor transfer RNA genes", Cell 31:131-146 (1982)). Capone und Mitarbeiter erzeugten in ähnlicher Weise Amber-, Ochre-, Opal-Supressor-tRNA-Gene, die von einem menschlichen Serin-tRNA-Gen abgeleitet sind.", (Capone J.P., Sharp P.A. und RajBhandary U.L., „Amber, ochre and opal suppressor tRNA genes derived from a human serine tRNA gene" EMBO J 4:213-221 (1985)).

[0007] Zusätzlich zur Ermöglichung eines Durchlesens einer Mutation, die ein Nonsense-Codon in der Mitte einer transkribierten Proteinsequenz hervorruft, gibt es auch Zeiten, in denen man eine Translation manipulieren möchte, um die Genprodukte abzuschneiden. In jedem Fall existiert ein Bedarf für einen Suppressionsmechanismus, welcher es den zellulären Ribosomen ermöglichen würde, derartige Stopp-Signale zu „durchlesen", wenn sie nicht erwünscht sind. Es besteht auch ein Bedarf für die Gelegenheit, die Proteinsynthese durch ein absichtliches Ändern der Translation des genetischen Codes lagespezifisch zu modifizieren, um etwas über die Proteinfunktionen zu lernen.

[0008] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, neue Nonsense-Suppressor-tRNAs, die in Zellen und in Anwendungsverfahren derselben in Genmanipulations-Protokollen funktionsfähig sind, zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0009] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden neue Oligonukleotidsequenzen, die Suppressor-tRNAs oder funktionale Äquivalente dazu kodieren, zur Verfügung gestellt, die dann, wenn sie in Zellen, die eine Nonsense-Mutation enthalten, eingeführt werden, die Expression des Nonsense-Stopp-Codons unterdrücken können, was eine vollständige Translation des Proteinproduktes ermöglicht. Auf Grundlage der Kenntnis bekannter menschlicher tRNA – Sequenzen, werden synthetische Oligonukleotide die sich auf Opal-, Amber- oder

Ochre-Mutationen beziehen, aufgebaut, welche dann in jeder aus einer Anzahl von Genmanipulations-Protokollen verwendet werden können.

[0010] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonukleotidsequenz zur Verfügung gestellt, die eine synthetische Suppressor-tRNA kodiert, umfassend:

A) eine menschliche tRNA-Strukturgensequenz, umfassend nicht mehr als zwanzig 3' flankierende Residuen und keine 5' flankierenden Residuen, wobei die besagte Sequenz eine Anticodonregion für eine Paarung mit einer mRNA kodiert;

B) eine Gesamtlänge von weniger als 150 Nukleotiden;

C) eine Anticodonsequenz, die modifiziert wurde, um ein Codon zu erkennen, das sich von demjenigen, das ursprünglich erkannt wurde, unterscheidet.

[0011] Kurz gesagt, wird ein Oligonukleotid synthetisiert, welches die strukturelle Komponente eines bekannten tRNA-Gens aufweist. Die Sequenz dieses Oligonukleotids ist auf Basis der bekannten Sequenz mit Substitutionen, die in der Anticodonregion der tRNA hergestellt sind aufgebaut, was dazu führt, dass die spezifische tRNA eine Nonsense- oder jede andere spezifische oder erwünschte Mutation erkennt. Zum Beispiel wurde gemäß der vorliegenden Erfindung, wie in **Fig.** 2 gezeigt, die Sequenz einer menschlichen Serin-tRNA, die ein Anticodon von TCG hat, modifiziert, um eine Substitution von TCA, dem Gegenstück der Opal-Mutation, aufzunehmen, um zu bewirken, dass die tRNA das Opal-Stopp-Codon eher als das übliche Serin-Codon erkennt.

[0012] Wichtig ist, dass die Sequenzen für die Oligonukleotiden der vorliegenden Erfindung nur die Strukturseqenz enthalten, die sowohl das tRNA-Molekül als auch einen kleinen Teil (rund 20 nt) der 3' flankierenden Region kodiert. Die 5' Region wird ausgelassen, um zu einem Oligonukleotid zu führen, das klein ist und einfacher zu bearbeiten ist (d. h. ungefähr 100 Nukleotiden lang). Die Oligonukleotidsequenz weist die strukturelle Komponente der Gene auf und umfasst rund 15 Basen von der 3' flankierenden Region und keine der 5' nicht-kodierenden Region. Herkömmliche Verfahren die Suppressor-tRNAs bis heute verwenden, haben die kompletten Suppressor-tRNA kodierenden Moleküle, welche isoliert, geklont und dann lagemutiert sind, verwendet, um die Suppressor-tRNA zu erzeugen. Die vorliegende Erfindung liefert ein viel einfacheres Verfahren, um die Suppressor-tRNA kodierenden Oligonukleotide aufzubauen, und zwar das Aufbauen einer Oligonukleotidsequenz, die nur die strukturellen Sequenzen, die die tRNA kodieren und einen Teil der 3' flankierenden Region enthält. Dieses kleine Oligonukleotid kann dann eher synthetisch synthetisiert als isoliert werden, wobei Standard-Genmanipulationstechniken eingesetzt werden, und diese synthetischen Suppressor-tRNAs können gemäß den Verfahren der Erfindung eingesetzt werden.

[0013] Die synthetischen Suppressor-tRNAs und die Sequenzen, die diese oder deren funktionale Äquivalente kodieren, können für jedes Protokoll einer Anzahl von Genmanipulations-Protokollen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden diese synthetischen Suppressor-kodierenden tRNAs, die einen Suppressor kodieren in einem Genmanipulations-Protokoll, ob in-vitro, ex-vivo oder in-vivo, in eine Zelle eingeführt, um die Effekte der Mutationen zu unterdrücken, die zu abgeschnittenen und inaktiven Genprodukten führen, welche für eine Krankheit verantwortlich sind. Die Oligonukleotide, die eine Suppressor-tRNA kodieren, können direkt in die Zellen eingebracht werden. Sie sind so ähnlich zu natürlichen tRNAs, dass sie eine signifikante immunologische Antwort unwahrscheinlich hervorrufen werden. Zusätzlich und in einer bevorzugten Ausführungsform für eine erhöhte Abgabe von tRNAs, die einen Suppressor kodieren, kann die tRNA-synthetische Oligonukleotidsequenz in einem passenden Expressionsträger enthalten sein, der einen Nukleotidvektor aufweist.

[0014] Der Ausdruck „funktionales Äquivalent", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf jeden Abkömmling, welcher zu der Bezugssequenz oder dem Protein funktional im Wesentlichen ähnlich ist. Insbesondere umfasst der Ausdruck „funktionales Äquivalent" Abkömmlinge, in denen eine Nukleotidbase (Nukleotidbasen) und/oder eine Aminosäure (Aminosäuren) ohne eine signifikant schädliche Wirkung auf eine biologische Funktion hinzugefügt, gelöscht oder ersetzt worden sind und die unter hohen Auflagen hinsichtlich der Knappheit gemäß den Protokollen, die im Stand der Technik bekannt sind und in Maniantis et. al. „Molecular Cloning" cold Spring Harbor Press, (1989) offenbart sind, hybridisieren werden.

Beschreibung der Figuren

[0015] Die **Fig. 1A**, **Fig. 1B** und **Fig. 1C** sind Diagramme, die die Grundkonzepte der vorliegenden Erfindung zeigen. In **Fig. 1A** ist eine herkömmliche mRNA mit einem Tyrosin-Codon in ein herkömmliches Protein translatiert. In **Fig. 1B** ist eine mutierte mRNA mit einer Ochre-Nonsense-Mutation translatiert, so dass sich ein ab-

geschnittenes Protein ergibt. In Fig. 1C ist eine Nonsense-(Ochre)-Suppressor-tRNA bereitgestellt, welche eine Translation des normalen Proteins von der mutierten mRNA oder ein „Durchlesen" der Ochre-Mutation ermöglicht.

[0016] Die Fig. 2A und Fig. 2B sind Diagramme, die eine Suppressor-tRNA sowie Expressionsvektorkonstrukte zeigen. **Fig.** 1(A) menschliche Arginin-tRNA: die Sequenz (nicht kodierender Strang) und die Kleeblattstruktur einer menschlichen Arginin-tRNA sind dargestellt. Eine einzelne Basenänderung (gezeigt mit *) in dem Anticodon ist erforderlich, um die menschliche Arginin-tRNA in eine Opal-Suppressor-tRNA umzuwandeln. **Fig.** 1(B) zeigt einen HSV-Amplicon-Vektor: Amp^r, Ampicillin resistent; „a", HSV-Packungs-Signal; HSV-tk-Promotor, HSV-1-Thymidinkinase-Promotor; EBNA-1 modifiziertes EBV-Nuklear-Antigen-Gen; ori P, EBV einzeln-latenter Replikationsursprung; ori S, HSV-1 Repliktationsursprung.

[0017] Die Fig. 2A–2D sind Abbildungen, die die Wiederherstellung der GFP-Fluoreszenz, unter der Verwendung der hargsup $tRNA^{Opal}$ zeigen. (A) die GFP-Fluoreszenz, die in XP12ROSV Zellen detektiert wird, welche mit dem mhRGFP-Expressionskonstrukt und dem pHEhargsup-$tRNA^{Opal}$-Plasmid kotransfiziert wurden. Man beachte die helle grüne Fluoreszenz in mehreren Zellen, die durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines FITC-Filters beobachtet wurde. (B) Phasenkontrast desselben Feldes transfizierter XP12ROSV-Zellen wie in A. (C) XP12ROSV Zellen, die allein mit dem mhRGFP-Vektor transfiziert wurden. Keine signifikante Fluoreszenz wird beobachtet, wenn das Nonsense-Codon nicht unterdrückt ist. (D) Phasenkontrast desselben Feldes wie in (C).

[0018] Die Fig. 4A und Fig. 4B sind Abbildungen, die die Northern- und Western-Analyse der hRGFP-Expression zeigen. (A) die Northern-Analyse. Die gesamte RNA (10µg/Strang) von XP12ROSV-Zellen (Strang 1) oder XP-Zellen, die mit dem hRGFP Gen (Strang 2) oder dem mhRGFP Gen transfiziert wurden, welche eine Opal-Nonsense-Mutation (CGC in TGA) an der Aminosäure 73 (Strang 3) enthalten, und auf hRGFP cDNA (oberstes Feld) untersucht wurden. GFP-Transkripte ähnlicher Größe wurden erhalten. Die Positionen der 18S rRNA ist gezeigt. Derselbe Blot wurde anschließend mit einem Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Housekeeping-Gen (unteres Feld) wieder untersucht. Nach der Normalisierung unterschiedlicher RNA-Proben mit dem GAPDH-Gen beobachteten wir eine um ein Drittel geringere Menge der mhRGFP-Transkription im Vergleich zu der hRGFP-Transkription. (B) Detektion des GFP Proteins durch Western-Analyse. Zell-Lysate wurden in einem 10-20%-igen SDS-PAGE-Gradienten-Gel elektrophoresiert und mit dem Anti-GFP-Antikörper untersucht. XP12ROSV-Zellen, die das hRGFP-Gen alleine exprimieren (Strang 2) oder das mhRGFP und die hargsup $tRNA^{Opal}$ koexprimieren (Strang 4), zeigten ein 27 kDa GFP-Protein in voller Länge. Rezuzierte Niveaus des GFP-Proteins wurden in Zellen, die mit den mhRGFP- und hargsup $tRNA^{Opal}$-Plasmiden transfiziert wurden, beobachtet. Kein GFP-Protein in voller Länge war in den Zellen, die mhRGFP-Gene in Abwesenheit der Suppressor-tRNA exprimieren (Strang 3), detektierbar. Nicht-transfizierte XP12ROSV Zellen zeigten kein unspezifisches Anfärben (Strang 1).

[0019] Fig. 5 zeigt einen Graph, der die teilweise Korrektur des DNA-reparaturfehlerhaften Phänotyps durch eine Suppressor-tRNA. VA13-, XP12ROSV- und XP12ROSV-Zellen, die hargsup $tRNA^{Opal}$ exprimieren, wurden bei unterschiedlichen Zelldichten von $2{,}5 \times 10^2$ bis 1×10^6 in Abhängigkeit von der Zelllinie und der eingesetzten UVC-Strahlendosis, gesät. Am folgenden Tage wurden die Zellen mit PBS gespült und mit UVC-Licht (254 nm) bei 0 bis 6 J/m^2 bestrahlt. Ungefähr 10 bis 12 Tage nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett eingefärbt. Die prozentuale Koloniebildungsfähigkeit wurde durch Vergleich der Koloniezahlen der bestrahlten Platten mit denen der unbestrahlten Platten bestimmt und gegen die verwendete UVC-Dosis aufgetragen. Ein vier- bis fünfunddreißig-facher Anstieg in der Koloniebildungsfähigkeit wurde bei höheren UV-Dosen in XP12ROSV-Zellen, die die hargsup $tRNA^{Opal}$ exprimieren, beobachtet.

[0020] Fig. 6 ist ein Graph, der die Korrektur einer fehlerhaften Reparatur des pSVCAT-Plasmids zeigt. XP12ROSV-Zellen wurden vorübergehend mit den UVC-bestrahlten pSVCAT- und pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Plasmiden kotransfiziert. Als Kontrollen wurden VA13-Zellen (positive Kontrolle) und XP12ROSV-Zellen (negative Kontrolle) mit dem UVC-bestrahlten pSVCAT-Plasmid und dem pHE-Vektor alleine kotransfiziert. Nach 72 Stunden wurden Zelllysate erhalten, die unter Verwendung des Flüssigkeits-Szintillationszählverfahrens (LSC) auf CAT-Aktivität analysiert wurden. Die CAT-Aktivität in Zellextrakten wurde in Prozent der Aktivität in Zellen, die mit unbestrahlten pSVCAT Zellen transfiziert wurden, ausgedrückt und gegen die UV-Strahlendosis aufgetragen, die verwendet wurde, um das pSVCAT-Plasmid zu inaktivieren. XP12ROSV-Zellen, die die hargsup $tRNA^{Opal}$ exprimieren, zeigten eine drei- bis siebzehnfach erhöhte Fähigkeit, das mit UV bestrahlte pSVCAT-Plasmid im Vergleich zu XP12ROSV-Zellen, die mit dem bestrahlten pSVCAT-Plasmid alleine transfiziert wurden, zu reaktivieren.

[0021] Die Fig. 7A und Fig. 7B sind Northern- und Western-Analysen der XPAC-Genexpression. (A) Expression der XPAC-Transkription. Eine Northern-Analyse der gesamten RNA (10µg/Strang) von normalen VA13-Kontrollzellen (Strang 1) und XP12ROSV-Zellen (Strang 2), die mit einer abgeschnittenen XPAC-cDNA überprüft wurden, ist in dem Autoradiogramm dargestellt (oberes Feld). Die zwei Bänder in den VA13-Zellen (normale Kontrollen) sind wegen einer alternativen Polyadenyation (Tanaka, K. et al., „Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain", Nature 348 72-78 (1990)). Das XPAC-Transkriptionsniveau wurde in den XP12ROSV-Zellen wesentlich reduziert. Derselbe Blot wurde auf das GAPDH-Gen wiederüberprüft, um eine relative Normalisierung der unterschiedlichen RNA-Proben zu ermöglichen, und ist im unteren Feld dargestellt. (B) Western-Analyse, um das XPAC-Protein nachzuweisen. Western-Analyse von DNA-reparaturfähigen VA13-Zellen (Strang 1), XP12ROSV-Zellen (Strang 2) und XP12ROSV-Zellen, die die Suppressor-tRNA (Strang 3) exprimieren, die mit Anti-XPAC-Antikörpern untersucht wurden. Das XPAC-Protein wird einfach in VA13-Zellen beobachtet, es wird aber weder in XP12ROSV-Zellen alleine oder in XP12ROSV-Zellen, die mit hargsup $tRNA^{Opal}$ transfiziert wurden, nachgewiesen.

[0022] Fig. 8A und Fig. 8B zeigen eine Transduktion von XP12ROSV-Zellen mit einem pHEhargsup $tRNA^{O\text{-}pal}$-Amplicon-Vektor, der in HSV-1-Virionen verpackt ist. (A) GFP-fluoreszierende Zellen wurden beobachtet, wenn XP12ROSV-Zellen, die das mhRGFP-Gen exprimieren, mit dem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$ Amplicon-Vektor transduziert wurden, was auf eine erfolgreiche in-vitro Abgabe der Suppressor-tRNA durch das Herpesvirus-Amplicon-System sowie eine Unterdrückung der Nonsense-Mutation im mhRGFP Gen hinweist. (B) Phasenkontrast desselben Feldes wie in (A).

[0023] Fig. 9 ist eine Abbildung, die die menschlichen Opal-, Amber- und Ochre-Suppressor-Serin-tRNAs zeigt, gemäß der Erfindung aufgebaut wurden. (SEQ ID NOS: 1-6). Wie dargestellt, können die Suppressor-tRNAs, unter Verwendung der angedeuteten Restriktionsverbindungsstellen im Tandem verwendet werden.

[0024] Fig. 10 ist eine Darstellung einer menschlichen Opal-Suppressor-Serin-tRNA und menschlichen Amber-Suppressor-Serin-tRNAs, die gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebaut sind, sowie eine graphische Darstellung von zwei menschlichen Suppressor-tRNAs hintereinander, welche die angedeuteten Verbindungsstellen verwenden. (SEQ ID NOS: 5-8)

[0025] Fig. 11 ist ein Diagramm, das die Kleeblattstruktur, die durch die neuartige menschliche ochre-Suppressor-Serin-tRNA der Erfindung ausgebildet wurde, zeigt. (SEQ ID NOS: 9)

[0026] Fig. 12 ist ein Diagramm, das die Kleeblattbildung in der Anticodon-Region einer weiteren synthetischen Amber-Suppressor-Serin-tRNA, die gemäß der vorliegenden Erfindung ausgebildet wurde, zeigt. (SEQ ID NOS: 10)

[0027] Fig. 13 ist eine Zeichnung, die die Kleeblattbildung noch einer weiteren menschlichen Opal-Suppressor-tRNA zeigt, welche die Anticodon-Region gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt. (SEQ ID NOS: 11)

[0028] Fig. 14 ist eine Zeichnung, die die Kleeblatt- und Anticodonregionen, die durch ein weitere menschliche Opal-Suppressor-tRNA mittels der vorliegenden Erfindung ausgebildet wurden, zeigt. (SEQ ID NOS: 12)

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0029] Atkinson und Martin identifizierten 1994 bei einer Durchsuchung von Literaturbeschreibungen nahezu 180 einzelne Punktmutationen an Nonsense-Codonen, die in menschlichen Genen identifiziert wurden. Diese Arten der Mutationen führen zu muskulärer Dystrophie, Xeroderma pigmentosum, zystischer Fibrose, Hämophilie, Anämie, Hypothyreodismus, einem p53 Squamal-Zellkurzinom, einem p53 hepatozellulären Karzinom, einem p53-Eierstock-Karzinom, einem Ösophayus-Karzinom, Knochenkrebs, Eierstockkarzinom, einem Speiseröhrenkarzinom, einem Leberzellenkarzinom, Brustkrebs, einem hepatozellulärem Karzinom, einem faserigen Eierstock-Karzinom, einer SRY-Geschlechtsumwandlung, einer triosephosphaten Isomerase-Anämie, Diabetes und Knochenerweichung. Die BRACA-1 und BRACA-2 Gene, die mit Brustkrebs in Verbindung gebracht werden, haben auch eine ähnliche Mutation, welche gemäß der Lehre hierin behandelt werden kann. Die vorliegende Erfindung umfasst in einer Ausführungsform Verfahren zur Behandlung dieser Erkrankungen durch Umkehrung der Effekte vorhandener Mutationen, die mit Nonsense-Mutationen verbunden werden, durch Einführung der synthetischen Oligonukleotid-Suppressor-tRNA der Erfindung.

[0030] Die Nukleotidsequenzen, die einige menschliche tRNAs kodieren sind bekannt und für den Fachmann allgemein durch Quellen wie zum Beispiel die Genbank erhältlich. Siehe: Sprinzl, Mathias et. al., Nucleic Acids Research, volume 12, Supplement „compilation of tRNA Sequences", Seite r1-r57 (1984); Schimmel, P.R., et. Al. Editors, "Transfer.RNA: Structure, Properties, and Recognition, Cold Spring Harbor Labs New York 1979; Agris, P.F., (1983) "The Modified Nucleosides of Transfer RNA, II, Alan R. Liss Inc., New York (Buckland RA et al., "A cluster of tRNA genes into [DRNI, TRR3, DDRAN] on the short arm of human chromosome 6", Genomics, 35 164-171 (1996)). Es wurde gezeigt, dass tRNAs stark konserviert sind und häufig über Spezies hinweg funktional sind und damit sind bakterielle oder andere eukaryotische tRNA-Sequenzen auch potentielle Quellen für die Oligonukleotide der Erfindung. Die Feststellung, ob eine bestimmte tRNA-Sequenz in einer gewünschten Säugetierzelle funktional sein wird, kann einfach durch routinemäßiges Experimentieren und Untersuchungen und Verfahren, die hierin diskutiert oder eingeschlossen sind, getroffen werden. Ferner können zusätzlich potentielle, bislang unbekannte tRNA-Sequenzen sowohl durch die diskutierten Untersuchungen und Protokolle als auch durch die hierin aufgenommenen Referenzen, die Routineexperimente verwenden, ermittelt werden.

[0031] tRNA-Gene haben starke Promotoren, die in allen Zelltypen aktiv sind. Die Promotoren für eukaryotische tRNA-Gene liegen innerhalb der Struktursequenzen, die das tRNA-Molekül selbst kodieren. Obwohl es Elemente gibt, die die transkriptionale Aktivität innerhalb der 5' Steigregion regulieren, kann die Länge einer aktiven transskriptionalen Einheit wesentlich kleiner als 500 Basenpaare sein, und damit stellt eine Unterbringung in einem Übergabevektor kein Problem dar. Sobald sie transkribiert und verarbeitet wurden, haben tRNAs geringe Degradationsraten. Letztendlich behält eine Gentherapie mit einem Nonsense-Suppressor die endogenen physiologischen Kontrollen über das Zielgen bei, welches das Nonsense-Codon enthält. Ein Fachmann wird verstehen, dass entsprechend der hierin enthaltenen Lehre die Oligonukleotide der Erfindung nicht nur für menschliche Generkrankungen genutzt werden können, sondern auch für eine Gentherapie durch eine Nonsense-Suppression, die für Mutationen in einem weiten Bereich von Genen für eine lagespezifische Substitution von Proteinprodukten anwendbar sein soll.

[0032] Kurz gesagt, wird ein Oligonukleotid synthetisiert, das eine strukturelle Komponente eines tRNA-Gens, das in einer menschlichen Zelle funktional ist, umfasst. Eine Thr-Sequenz dieses Oligonukleotids wird auf Grundlage der bekannten Sequenz mit Substitutionen, die in der Anticodon-Region der tRNA gemacht wurden, aufgebaut, was die spezifische tRNA veranlasst, eine Nonsense- oder andere spezifische Mutation zu erkennen. Wie zum Beispiel in **Fig.** 2 gezeigt und gemäß der Erfindung wurde die Sequenz der menschlichen Serin-tRNA, die ein Anticodon aus TCG hat, modifiziert, um einer Substitution von TCA das Komplement der Opal-Mutation einzuführen, um zu erreichen, dass die tRNA das Opal-Stopp-Codon schneller als das ursprüngliche Serin-Codon erkennt.

[0033] Wichtig ist, dass die Sequenzen für die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung nur die Struktursequenzen enthalten, die sowohl das tRNA-Molekül als auch einen kleinen Teil (rund 20 nt) der 3' flankierenden Region kodieren. Die 5' Region wird ausgelassen, um ein Oligonukleotid zu ergeben, das klein und einfacher zu handhaben ist (d. h., ungefähr 100 Nukleotiden lang). Die Oligonukleotidsequenz umfasst die strukturelle Komponente der Gene und enthält rund 15 Basen der 3' flankierenden Region und keine der 5' nicht-kodierenden Region. Herkömmliche Verfahren, die bis heute Suppressor-tRNAs verwenden, haben die ganzen Suppressor-tRNA-Moleküle verwendet, welche isoliert, geklont und dann lagemutiert werden, um die Suppressor-tRNA zu erzeugen. Die vorliegende Erfindung stellt ein viel einfacheres Verfahren zur Verfügung, um die Suppressor-tRNA aufzubauen, und zwar einen Aufbau einer Oligonukleotidsequenz, die nur die strukturellen Sequenzen, die die tRNA kodieren, und einen Teil der 3' flankierenden Region enthält. Dieses kleine Oligonukleotid kann dann eher synthetisch synthetisiert als isoliert werden, indem man Standard-Genmanipulationstechniken einsetzt, und diese synthetischen Suppressor-tRNAs können gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

[0034] Suppressor-tRNAs sind derzeit als Werkzeuge ausgeführt, um grundlegende biologische Fragen zu behandeln. Sie werden verwendet, um unnatürliche Aminosäuren lagespezifisch in Proteine in-vivo einzubinden (Noren C.J., Anthony-Cahill S.J., Griffith M.C. and Schultz P.G., „A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins", Science 244:182-188 (1989)) und in Kombination mit elektrophysiologischen Techniken haben sie ein allgemeines Verfahren für Struktur-Funktionsstudien von Rezeptoren, Kanälen und Transportern zur Verfügung gestellt (Nowak M.W., Kearney P.C., Sampson, J.R., Saks, M.E., Labarca G.C. et. al., „Nicotinic receptor binding site probed with unnatural amino acid incorporation in intact cells", Science 268:439-442 (1995)).

[0035] Allerdings sind Suppressor-tRNAs gerade jetzt für die Behandlung von menschlichen Krankheiten er-

forscht worden. Nonsense-Mutationen, die in Hauptregulatorgenen auftreten, sind häufig für die Zelle schädlich und verantwortlich für verschiedene Arten genetischer Erkrankungen. Atkinson und Martin (Atkinson J. und Martin R., „Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense suppressor tRNAs", Nucleic Acids Res. 22:1327-1334 (1994)) untersuchten und berichteten über eine Liste von 179 einzelnen Punktmutationen, die zu Nonsense-Mutationen führten, die in menschlichen Genen identifiziert wurden und menschliche genetische Erkrankungen verursachten. Diese sind alle potentielle Ziele für eine Gentherapie (in-vivo oder ex-vivo) für die Behandlung einer Krankheit mit der Suppressor-tRNA-Technologie. Die mögliche Anwendung der Suppressor-tRNA auf die Gentherapie wurde zuerst für β-Thalassämie demonstriert (Temple G.F., Dozy A.M., Roy K.L. and Kan Y.W., „Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for β-thalassemia", Nature 296:537-540 (1982)). Eine menschliche Amber-Suppressor-Lysin-tRNA war in der Lage, eine Nonsense-Mutation in einem mutierten β-Globin-Gen zu unterdrücken, wenn beide gleichzeitig in-vivo in einem Xenopus-Oozyt-System exprimiert wurden. Die in-vivo Anwendung von Suppressor-tRNAs für die Behandlung von genetischen Krankheiten, die durch Nonsense-Mutationen verursacht wurden, wurde kürzlich an einer mdx-Maus demonstriert, welche ein Tiermodell für eine menschliche Duchenne-Muskeldystrophie mit einer Ochre-Mutation im Dystrophin-Gen ist (Li K., Zhang J., Buvoli M., Yan X.D., Leinwand L. and He H., „Orchre suppressor transfer RNA restored dystrophin expression in mdx mice", Life Sciences 61:205-209 (1997)). Eine direkte Injektion einer Plasmid-DNA, die die Ochre-Suppressor-tRNA kodiert, in mdx-Mäuse verursachte dystrophin-positive Fasern. Die praktische Anwendung der Suppressor-tRNA als therapeutische Wirkstoffe für die Gentherapie würde weitgehend von der Entwicklung effizienter Vektoren abhängen, welche die Genexpression aushalten können.

[0036] In letzter Zeit haben sie als Werkzeuge gedient, um grundlegende biologische Fragen, wie zum Beispiel die Untersuchung der Zell-Zell-Wechselwirkungen während der Entwicklung, zu behandeln (Kunes, S. & Steller, H., „Ablation of drosophila photoreceptor cells by conditional expression of a toxin gene", Genes Develop 5, 970-983 (1991)), oder dazu, unnatürliche Aminosäuren in-vivo lagespezifisch in Proteine einzubinden (Noren, C.J., Anthony-Cahil, S.J., Griffith, M.C. & Schultz, P.G., „A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins" Science 244, 182-188 (1989)). In Kombination mit elektrophysiologischen Techniken, haben sie ein allgemeines Verfahren für Struktur-Funktionsstudien von Rezeptoren, Kanälen und Transportern bereitgestellt (Nowak, M.W. et al., „Nicotinic receptor binding site probed with unnatural amino acid incorporation in intact cells", Science 268, 439-442 (1995)).

[0037] Zusätzliche Verwendungen der Erfindung können die Verwendung der Suppressor-Oligonukleotid-tRNAs als auslösende Moleküle umfassen, um ein inaktives Toxinmolekül in ein aktives Toxinmolekül umzuwandeln. Siehe zum Beispiel Robinson et al., „Suppression of single and double nonsense mutations inducted into the diphteria toxin A-Chain Gene: a potential binary system for toxin gene therapy", Human Gene Therapy 6:137-143 (Feb. 1995).

[0038] Des Weiteren können die Oligonukleotide der Erfindung verwendet werden, um lagegerichtete Mutagenesen von Proteinprodukten in-vitro durch Einführung von Missense-Mutationen in Genprodukte einzuleiten, um eine Struktur und Funktionsbeziehungen zu identifizieren.

[0039] Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden menschliche Opal-, Amber- und Ochre-Suppressor-Serin- und -Arginin-tRNAs aufgebaut, die annähernd 100 Nukleotide lang sind und in Zellen eingefügt werden können, um Mutationen zu unterdrücken, die zu Nonsense-Codonen führen, wo ein Serin oder Arginin vorhanden sein sollte. Die Oligonukleotide können direkt in Empfängerzellen eingefügt oder hintereinander angebunden werden, um die Wirksamkeit der Oligonukleotide zu steigern. In noch einer weiteren Ausführungsform kann die Suppressor-tRNA der Erfindung in die Zellen unter Verwendung herkömmlicher Standard-Genmanipulationstechniken durch die Verwendung von Vektoren eingefügt werden. Wegen der internen Promotorsequenzen der tRNA-kodierenden Sequenzen muss die tRNA-Sequenz nicht in eine separate Transkriptionseinheit eingefügt werden, obwohl eine bereitgestellt werden kann.

[0040] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleotidexpressionssystem der Erfindung innerhalb eines geeigneten Gentransferüberträgers eingeschlossen, welcher dann eingesetzt wird, um Zellen zu transduzieren, um die Suppressor-tRNA zu exprimieren. Der Genzuführungsträger kann ein beliebiger Zuführungsträger sein, der aus dem Stand der Technik bekannt ist, und er kann sowohl einfach eine nackte DNA, die durch eine rezeptorvermittelte Transfektion unterstützt wird, als auch jeden aus einer Anzahl von Vektoren umfassen. Derartige Vektoren schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf eukaryotische Vektoren, prokaryotische Vektoren (wie zum Beispiel bakterielle Vektoren) und Virusvektoren, die wiederum Retrovirusvektoren, Adenovirusvektoren, adeno-zugeordnete Virusvektoren, Lentivirusvektoren (menschliche und andere, die schweineähnliche umfassen), Herpesvirusvektoren, Epstein-Barr-Virusvektoren, SV40-Virusvektoren, Poxvirusvektoren,

Pseudotyp-Virusvektoren.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform, wird eine Packungs-Zelllinie mit dem Virusvektor transduziert, der eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die exprimiert werden soll, um eine Erzeugerzelllinie zu bilden, die den Virusvektor umfasst. Die Erzeugerzellen können daraufhin direkt verabreicht werden, wodurch die Erzeugerzellen Viruspartikel entwickeln, die geeignet sind, die Empfängerzellen zu transduzieren.

[0042] In einer bevorzugten Ausführungsform, ist der Virusvektor ein Retrovirus- oder ein Adenovirusvektor. Beispiele für Retrovirusvektoren, welche eingesetzt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf den Moloney-Murine-Leukemia-Virus, den Milz-Necrosis-Virus und Vektoren, die von Retroviren, wie dem Rous-Sarcoma-Virus, dem Harvey-Sarcoma-Virus, dem Avianleukosisvirus, dem menschlichen Immunodeficiencyvirus, dem myeloproliferativen Sarcoma-Virus und dem Brusttumorvirus abgeleitet sind.

[0043] Retrovirusvektoren sind als Wirkstoffe nützlich, um einen retroviral-vermittelte Gentransfer in eukaryotische Zelle zu vermitteln. Retrovirusvektoren sind allgemein so aufgebaut, dass die Mehrheit der Sequenzen, die für die Strukturgene des Virus kodieren, gelöscht und durch das Gen/die Gene von Interesse ersetzt werden. Am häufigsten werden die Strukturgene (das heißt, gag, pol und env) von dem Retrovirus-Rückgrat entfernt, indem man Genmanipulationstechniken aus dem Stand der Technik einsetzt. Das kann eine Digestion mit der passenden Restriktionsendonuklease oder in einigen Fällen mit Bal 31-Exonuklease, um Fragmente zu erzeugen, die entsprechende Teile des Packungs-Signals enthalten, umfassen.

[0044] Diese neuen Gene wurden in das provirale Rückgrat in verschiedenen allgemeinen Wegen eingebunden. Die unkompliziertesten Aufbauten sind solche, in denen die Strukturgene des Retrovirus durch ein einzelnes Gen ersetzt werden, welches anschließend unter der Kontrolle der viralregulativen Sequenzen innerhalb der langen terminalen Wiederholung (long terminal repeat, LTR) transkribiert wird. Es sind auch retrovirale Vektoren aufgebaut worden, welche mehr als ein Gen in die Zielzellen einfügen können. Normalerweise ist in derartigen Vektoren ein Gen unter der regulativen Kontrolle der viralen LTR, während das zweite Gen entweder aus einer verbundenen Nachricht exprimiert wurde oder unter der Steuerung seines eigenen inneren Promotors ist.

[0045] Die Bemühungen sind auf die Minimierung der viralen Komponente des Virus-Rückgrates gerichtet worden, größtenteils in einer Bemühung, die Chance für eine Rekombination zwischen dem Vektor und dem packungsgestörtes Helfervirus innerhalb der Packungs-Zellen zu reduzieren. Ein packungsgestörtes Helfervirus ist notwendig, um die Strukturgene eines Retrovirus bereitzustellen, der vom Vektor selbst zerstört worden ist.

[0046] In einer Ausführungsform kann der Retrovirusvektor einer aus einer Serie von Vektoren sein, die in Bender et al., J. Virol. 61:1639-1649 (1987) beschrieben sind, basierend auf einem N2-Vektor (Armentano, et al., J. Virol., 61:1647-1650), der eine Reihe von Löschungen und Substitutionen enthält, um die Homologie zwischen dem Vektor und den Packungs-Systemen auf ein absolutes Minimum zu reduzieren. Diese Änderungen haben auch die Wahrscheinlichkeit verringert, dass Virus-Proteine exprimiert würden. Im ersten dieser Vektoren, LNL-XHC, wurde durch eine lage-gerichtete Mutagenese das natürliche ATG Start-Codon von gag zu TAG geändert, um dadurch eine unerwünschte Proteinsynthese von dieser Stelle zu entfernen.

[0047] In dem Moloney-Murine-Leukämie-Virus (MoMuLV), 5' bis zum authentischen gag-Start, existiert ein offenes Leseraster, welches die Expression eines anderen glycosylierten Proteins ($pPr80^{gag}$) ermöglicht. Das Moloney-Murine-Sarcoma-Virus (MoMoSV) hat Veränderungen in dieser 5' Region, die eine Rasterverschiebung und Verluste von Glycolysationsorten einschließen, welche eine potentielle Expression der Aminoendstelle von $pPr80^{gag}$ vermeidet. Deshalb wurde der Vektor LNL6 hergestellt, der sowohl die geänderte ATG von LNL-XHC als auch den 5' Teil von MoMOSV einbezogen hat.

[0048] Die 5'-Struktur der LN-Vektorreihe eliminiert somit die Möglichkeit der Expression der retroviralen lesenden Raster mit der anschließenden Produktion viraler Antigene in genetisch transduzierten Zielzellen. In einer letzten Änderung, um einen Überlapp mit dem packungsdefekten Helfervirus zu verringern, hat Miller zusätzliche env-Sequenzen, die unmittelbar der 3' LTR in dem LN-Vektor vorausgehen, entfernt (Miller, et al., Biotechniques, 7:980-990, 1989).

[0049] Das wichtigste Erfordernis, das durch jedes Gentransfersystem für seine Anwendung auf die Gentherapie erfüllt sein muss, ist Sicherheit. Sicherheit wird durch die Kombination der Vektorgenomstruktur zusammen mit dem Packungs-System erreicht, die für die Produktion des infektiösen Vektors verwendet wird. Miller

et al. haben die Kombination des pPAM3-Plasmids (das packungsgestörte Helfergen) für die Expression retroviraler Strukturproteine zusammen mit der LN-Vektor-Serie entwickelt, um ein Vektor-Packungs-System zu bilden, wo die Generation eines rekombinanten Wild-Typ-Retrovirus durch die Entfernung fast aller Rekombinationsorte zwischen dem Vektorgenom und dem packungsgestörten Helfergen auf ein Minimum reduziert wird (d. h. LN mit pPAM3).

[0050] In einer Ausführungsform kann der Retrovirusvektor ein Moloney-Murine-Leukemia-Virus der LN-Serie von Vektoren sein, wie zum Beispiel jene hierin oben erwähnten, und darüber hinaus die in Bender, et al. (1987) und Miller, et al. (1998) beschriebenen. Diese Vektoren haben einen Teil des Packungs-Signals von einem Maus-Sarcom-Virus erhalten und ein mutiertes gag-Anfangs-Codon. Der Ausdruck „mutiert", wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass das gag-Anfangs-Codon entfernt worden oder so verändert worden ist, dass das gag-Protein oder Fragmente oder Verkürzungen desselben nicht exprimiert werden.

[0051] In einer weiteren Ausführungsform kann der Retrovirusvektor mindestens vier klonende Orte oder Restriktionszymerkennungsorte einschließen, bei denen mindestens zwei dieser Orte eine durchschnittliche Entstehungsfrequenz in eukaryotischen Genen von weniger als einmal in 10.000 Basenpaaren haben; d. h., das Restriktionsprodukt hat eine durchschnittliche DNA-Größe von mindestens 10.000 Basenpaaren. Bevorzugte Klonorte werden aus einer Gruppe, die NotI, SnaBI, SalI und XhoI umfasst, ausgewählt. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Retrovirusvektor jede dieser Klonorte.

[0052] Wenn ein Retrovirusvektor, der solche Klonorte umfasst, eingesetzt wird, kann auch ein Pendelklonvektor [engl.: shuttle cloning vector] bereitgestellt werden, der mindestens zwei Klonorte aufweist, die zu mindestens zwei Klonorten kompatibel sind, welche aus einer Gruppe umfassend NotI, SnaBI, SalI und XhoI, die an dem Retrovirusvektor angeordnet sind, ausgewählt werden. Der Pendelklonvektor schließt auch mindestens ein gewünschtes Gen mit ein, welches dazu geeignet ist, dass es von dem Pendelklonvektor zum Retrovirusvektor transferiert werden kann.

[0053] Der Pendelklonvektor kann von einem Basis-„Rückgrat"-Vektor oder -Fragment hergestellt werden, an denen ein oder mehrere Verknüpfer angebunden werden, welche Klone oder Restriktionsenzym-Erkennungs-Orte einschließen. Eingeschlossen in die Klonorte sind die kompatiblen oder die komplementären Klonorte, die hierin oben beschrieben worden sind. Die Gene und/oder Promotoren, die Enden haben, die den Restriktionsorten des Pendelvektors entsprechen, können in den Pendelvektor durch Techniken, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, eingebunden werden.

[0054] Der Pendelklonvektor kann eingesetzt werden, um DNA-Sequenzen in prokaryotischen Systemen zu verstärken. Der Pendelklonvektor kann aus Plasmiden, die allgemein in prokaryotischen Systemen und insbesondere in Bakterien verwendet werden, bereitgestellt werden. Daher kann der Pendelklonvektor beispielsweise von Plasmiden, wie von pBR322; pUC 18; etc abgeleitet werden.

[0055] Der Vektor schließt einen oder mehrere Promotoren ein. Geeignete Promotoren, die verwendet werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf einen Retrovirus-LTR; den SV40-Promotor und den menschlichen Zytomegalovirus-(CMV)-Promotor, der in Miller et al., Biotechniques, 7:(9):980-990 (1989) beschrieben ist, oder jeden anderen Promotor (beispielsweise zelluläre Promotoren, wie eukaryotische zelluläre Promotoren, die umfassen, aber nicht begrenzt sind auf die Histon-, pol III-, und β-Aktin-Promotoren). Andere virale Promotoren, die verwendet werden können, schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf Adenovirus-Promotoren, TK-Promotoren und B19-Parvovirus-Promotoren. Die Auswahl eines geeigneten Promotors wird für Fachleute aus der hierin enthaltende Lehre offensichtlich sein.

[0056] Anschließend wird der Vektor eingesetzt, um eine Packungs-Zelllinie zu transduzieren, um eine Produzenten-Zelllinie auszubilden. Beispiele für Packungs-Zellen, die transfiziert werden können, umfassen, sind aber sind nicht beschränkt auf PE501, PA317, ψ2, ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψCRE, ψCRIP, GP+E-86, GP+envAM12 und DAN-Zelllinien. Der Vektor, der die Nukleinsäuresequenz enthält, welche den Wirkstoff kodiert, der dazu geeignet ist, die Hemmung, Prävention oder Zerstörung des Tumorzellenwachstums bei Expression der Nukleinsäuresequenz, die den Wirkstoff kodiert, zur Verfügung zu stellen, kann die Packungs-Zellen durch jedes Mittel, das aus dem Stand der Technik bekannt ist, transduzieren. Solche Mittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Elektroporation, die Verwendung von Liposomen und $CaPO_4$-Ablagerung.

[0057] Die Erzeugerzellen werden anschließend unmittelbar an oder benachbart zu den gewünschten Empfängerzellen verabreicht.

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Erfindung einen Virusvektor, der üblicherweise Menschen und eine Packungs-Zelllinie menschlichen Ursprungs infiziert. Beispielsweise können Vektoren, die von Viren, die üblicherweise Menschen infizieren, wie zum Beispiel dem Herpes-Virus, dem Epstein-Barr-Virus, abgeleitet sind, eingesetzt werden, welche keine aktive α-Galactosyl-Hülle exprimieren.

[0059] In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform umfasst der Vektor einen Herpes-Simplex-Virus-Plasmid-Vektor. Es wurde gezeigt, dass der Herpes-Simplex-Virus-Typ-1 (HSV-1) ein potenziell nützliches Genüberträger-Vektor-System für die Gentherapie ist (Glorioso, J.C., „Development of Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Transfer to the Central Nervous System. Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer", Jon A. Wolff, Herausgeber, 1994 Birkhauser Boston, 281-302; Kennedy, P.G., "The Use of Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Therapy in Neurological Diseases", Q J Med, Nov. 1993, 86(11):697-702; Latchman, D.S., "Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Therapy", Mol Biotechnol, Oct. 1994, 2(2):179-95.

[0060] HSV-1-Vektoren sind für die Übertragung von Genen auf einen Muskel eingesetzt worden (Huard, J., „Herpes Simplex Virus Type 1 Vector Mediated Gene Transfer to Muscle", Gene Therapy, 1995, 2, 385-392; und Gehirn, Kaplitt, M. G., "Preproenkephalin Promoter Yields Region-Sprecific and Long-Term Expression in Adult Brain After Direct In-vivo Gene Transfer Via a Defective Herpes Simplex Viral Vector", Proc Natl Acad Sci USA, Sep 13, 1994, 91(19):8979-83) und sie sind für Behandlungen mausartiger Gehirntumore eingesetzt worden (Boviatsis, E.J., "Long-Term Survival of Rats Harboring Brain Neoplasms Treated With Ganciclovir and a Herpes Simplex Virus Vector That Retains an Intact Thymidine Kinase Gene", Cancer Res, Nov 15, 1994, 54(22):5745-51; Mineta, T., "Treatment of Malignant Gliomas Using Ganciclovir-Hypersensitive, Ribonucleotide Reductase-Deficient Herpes Simplex Viral Mutant", Cancer Res, Aug 1, 1994, 54(15):3963-6).

[0061] Helfervirusabhängige, minivirale Vektoren sind für eine einfachere Handhabung und wegen ihrer Kapazität für einen größeren Eintrag (bis zu 140 kb) entwickelt worden, Geller, Al, „An Efficient Deletion Mutant Packaging System for Defective Herpes Simplex Virus Vectors: Potential Applications to Human Gene Therapy and Neuronal Physiology", Proc Natl Acad Sci USA, Nov 1990, 87(22):8950-4; Frenkel, N., „The Herpes Simplex Virus Amplicon: A Versatile Defective Virus Vector", Gene Therapy. 1. Supplement 1, 1994. Replikationsunfähige HSV-Ampliconen wurden im Stand der Technik aufgebaut, ein Beispiel ist der pHSVlac-Vektor durch Geller et al., Science, 241, Sept. 1988, der hierin durch Bezugnahme eingebunden wird. Diese HSV-Ampliconen enthalten erhebliche Streichungen des HSV-Genoms, um Raum für die Einbringung einer exogenen DNA zu schaffen. Üblicherweise umfassen sie den HSV-1-Packungsort, den HSV-1-"ori S"-Replikationsort und die IE 4/5 Promotor-Sequenz. Diese Virionen sind für die Übertragung von einem Helfer-Virus abhängig.

[0062] Hauptsächlich wurden zwei Arten von veränderten Helferviren entwickelt, um eine Rekombination zu minimieren. Andere komplementäre HSV-Helfervirus-Systeme sind hierin genannt und sind innerhalb des Handlungsspielraums von Fachleuten. Ein solches System, das entwickelt wurde, ist ein temperaturempfindlicher Mutant. Ein HSV-temperaturempfindlicher (TS) Mutant wurde mit einer TS-Mutation in dem IE3-Gen entwickelt (Davison et al, 1984, J. Gen. Virol., 65:859-863) Demzufolge hat dieses Virus einen IE-Phänotyp, repliziert keine DNA, ändert die zelluläre Physiologie nicht signifikant und produziert keinen Virusabkömmling bei 37°C. Das Virus ist bei einer erlaubten Temperatur von 37°C gewachsen. TS-Mutanten haben jedoch eine Tendenz gehabt, zum Wild-Typ zurückzukehren.

[0063] Im Gegensatz dazu ist ein zweites Helfervirus-System ein Löschungsmutant, bei dem die Mehrheit der IE3-Gene einfach gelöscht ist. Diese kehren nicht zum Wild-Typ zurück. Daher sind HSV-1-Vektoren, die gepackt sind, in dem sie einen Löschungsmutanten als Helfervirus verwenden, die bevorzugtesten Helferviren der Erfindung. Siehe zum Beispiel: Patterson et al., 1990, J. Gen. Virol., 71:1775-1783. Andere replikations-unfähige Helferviren können eingesetzt werden und ein Fachmann wird erkennen, dass andere Mutationen in den IE-Genen oder in anderen Genen, welche zu einem replikationsunfähigen Helfervirus führen, welches die passende Replikation und Expressionsfunktionen zur Verfügung stellen wird, und welche mit der Helferzelllinie und Vektor koordiniert sind, innerhalb dieser Erfindung in Betracht gezogen sind. Jede Zelllinie kann für diesen Schritt eingesetzt werden, solange sie geeignet ist, das IE3- oder ein replikationsabhängiges Gen zu exprimieren oder eine Helferzelllinie zu erhalten, die bereits transformiert wurde und kommerziell erhältlich ist. Jede Zelllinie kann verwendet werden, indem man pHE und das Plasmid, das gleichzeitig das IE3-Gen enthält, einführt. Als nächstes wird der Vektor der Helferzelllinie durch Elektroporation, Calciumphosphat-DNA-Transfektion oder ein anderes passendes Verfahren geliefert. Jede Zelllinie kann verwendet werden, indem man pHE und das Plasmid, das gleichzeitig das IE3-Gen enthält, einführt. Als nächstes werden die Zellen mit einem Helfervirus-IE3-Zerstörungsmutanten oder einem anderen geeigneten Zerstörungsmutanten, der replikationsunfähig ist, infiziert. Das IE3-Gen oder ein anderes derartiges Gen in der Helferzelllinie ergänzen das Helfervirus,

was zu einer produktiven HSV-1-Infektion führt, und das erhaltene Virusmaterial umfasst HSV-1-Partikel, die entweder eine Vektor-DNA oder eine Helfervirus-DNA enthält, von denen alle replikationsunfähig sind. Weitere Informationen über Helferzelllinien und das Verfahren sind in Geller et al., PNAS, 87:8950-8954, November 1990, „An Efficient Deletion Mutant Packaging System for Defective Herpes Simplex Virus Vectors: Potential Applications to Human Gene Therapy and Neuronal Physology" offenbart. Die Erfindung umfasst einen HSV-Mini-Vektor, der einen replikationsunfähigens HSV-Amplicon mit anderen viralen Sequenzen, beispielsweise mit denen des Epstein-Barr-Virus, des menschlichen Papillomavirus, oder des Rinder-Papillomavirus Typ 1, kombiniert, welche es ermöglichen, den Vektor in der Zelle in episomaler Form beizubehalten, um einen zehnfach größeren Titer und eine sehr große DNA-Einfügekapazität zu erhalten.

[0064] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst einen helfervirusabhängigen Mini-Virusvektor, umfassend: (a) die HSV-1, „a" Sequenz für das Packungs-/Teilungs-Signal und einen „ori S" Replikationsursprung für die Replikationspackung des Plasmids (als Antwort auf Signale vom Helfervirus, zu replizieren und zu packen); (b) ein Epstein-Barr-Virus-(EBV)-Nuklear-Antigen-(EBNA-1)-Gen und einen EBV-latenten Replikationsursprung (ori P), der es dem Vektor ermöglicht, dass er in episomaler Form innerhalb des Kerns für eine Replikation ohne Integration zum Wirtsgenom und so für eine Replikation in jeder von zwei sich teilenden Zellen beibehalten wird; vorzugsweise (c) Gene von prokaryotischen Zellen für eine Propagation des Vektors in E. coli (ein auswählbares Markergen wie zum Beispiel das Ampizilin-resistente oder Tetrazyklin-resistente Gen und das col. E1 ori); und (d) eine Sequenz, die eine Nonsense-Suppressor-tRNA kodiert. Optional kann der Vektor auch prokaryotische Gene umfassen, die einen auswählbaren Marker, wie zum Beispiel die Gene für eine positive Hygromycin-Auswahl zur Verfügung stellen. So beschrieben in US-Patent Nummer 5,830,727, das hierin durch Bezugnahme eingebunden wird.

[0065] In dieser besonderen Ausführungsform wird die Packungs-Funktion der Mini-Vektor-DNA in Herpes-Simplex-virale Kapside durch ein Helfervirus und eine Helferzelllinie bereitgestellt.

[0066] In noch einer weiteren Ausführungsform kann der HSV-Vektor so aufgebaut werden, dass er einen helferfreien Virusvektor produziert, wie in Mann et al., „Construction of a Retro-Virus Packaging Mutant and its Use to Produce Helper-Free Defective Retrovirus", 33 Sal., p. 153-159, May 1983, Jounal of Virology, September 1989, pp. 3822-3829, September 1989; Samulski „Helper Free Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression"; and Kohn et al., "High Efficiency Gene Transfer Into Mammalian Cells: Generation of Helper-Free Recombinant Retrovirus With Broad Mammalian Host Range", PNAS, 81:6349-6353, October 1984 beschrieben. Siehe auch Okasinki, US-Patent-Nr. 4,970,155 "HSV HELPER VIRUS INDEPENDENT VECTOR", das hierin durch Bezugnahme eingebunden werden.

[0067] Gemäß der Erfindung wurden verschiedene tRNA-synthetische Suppressoren synthetisiert, einschließlich einer menschlichen Ochre-Suppressor-Serin-tRNA (SEQ ID NO:1), einer menschlichen Amber-Suppressor-Serin-tRNA (SEQ ID NO:2), einer menschlichen Serin-Opal-Suppressor-tRNA (SEQ ID NO:3) und einer menschlichen Opal-Suppressor-Arginin-tRNA (SEQ ID NO:4). Es wurde gezeigt, dass diese Oligonukleotide als aktive Suppressor-tRNAs in menschlichen Zellen funktionieren, die ein Durchlesen von Nonsense-Mutationen zur Verfügung stellen. Die Erfindung schließt daher diese Oligonukleotide sowie funktionale Äquivalente derselben mit ein. Vektoren sind ebenfalls aufgebaut worden, welche die Oligonukleotide einschließen und erfolgreich an Empfängerzellen gemäß der Erfindung liefern, welche die pHEhargsuptRNA^{opal} einschließen.

[0068] Sowohl der Aufbau von zusätzlichen Oligonukleotiden auf Basis der Lehre hierin als auch die Nukleotidabgabeträger, die dieselben einschließen, sind einfach eine Optimierung von Routine-Versuchsverfahren und sollen innerhalb des Schutzbereichs dieser Erfindung sein.

[0069] Alle hierin zitierten Referenzen werden hiermit ausdrücklich in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme eingefügt. Die folgenden Beispiele dienen dazu, die hier beschriebene Lehre zu erläutern und sind nicht dazu gedacht, die Erfindung in irgendeiner Weise zu beschränken.

Beispiele

[0070] Xeroderma pigmentosum (XP) ist eine autosomale rezessive Erkrankung mit einer ausgeprägten Prädisposition zu sonnenlichtinduziertem Hautkrebs und anderen neurologischen Abnormalitäten, (Cleaver, J.E., „Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum", Nature 218, 652-656 (1968)). Diese Erkrankung ist durch eine extreme Empfindlichkeit auf ultraviolette Strahlung und fehlerhafte DNA-Nukleotid-Exisi-

on-Reparatur (NER) gekennzeichnet, (Hanawalt, P.C., „DNA repair comes of age", Mutation Res 336, 101-113 (1995); Copeland, N.E., Hanke, C.W. & Michalak, J.A., „The molecular basis of xeroderma pigmentosum", Dermatol Surg 23, 447-455 (1997)). Zellfusionsstudien, um DNA-Reparaturdefekte zu ergänzen, haben zur Identifikation von sieben genetischen Ergänzungsgruppen von XP geführt, die als XPA-XPG bezeichnet werden (Cleaver, J.E. & Kraemer, A.L., „Xeroderma Pigmentosum", The Metabolic Basis of Inherited Disease Vol. II" (eds Scriver, C.R., L., B.A., Sly, W.S. & Valle, D.) 2949-2971 (McGraw-Hill, New York, 1989)), was andeutet, dass mindestens sieben unterschiedliche Genprodukte in den NER-Weg eingebunden sind. Alle der relevanten menschlichen Gene (XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF und XPG) wurden identifiziert und auf bestimmte chromosomale Orte abgebildet, (Cleaver, J.E. & Kraemer, A.L., „Xeroderma Pigmentosum", The Metabolic Basis of Inherited Disease Vol. II" (eds Scriver, C.R., L., B.A., Sly, W.S. & Valle, D.) 2949-2971 (McGraw-Hill, New York, 1989); Tanaka, K. et al., "Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain", Nature 348 73-78 (1990); Satokata, I., Iwai, K., Matsuda, T., Okada, Y. & Tanaka, K., "Genomic characterization of the human DNA excision repair-controlling gene XPAC", Gene 136, 345-348 (1993); Boulikas, T., "Xeroderma pigmentosum and molecular cloning of DNA repair genes", Anticancer Res 16, 693-708 (1996)). Das Klonen und Charakterisieren dieser DNA-Reparaturgene hat das Verständnis der NER-Mechanismen und der Beziehung zwischen NER-Molekulardefekten und den klinischen Erscheinungsformen der XP-Erkrankungen stark verbessert, (Nishigori, C., Moriwaki, S.-i., Takebe, H., Tanaka, T. & Imamura, S., „Gene alterations and clinical characteristics of xeroderma pigmentosum group A patients in Japan", Arch Dermatol 130, 191-197 (1994)). Diese Erkrankung wurde ausgewählt, um den neuen genetischen Ansatz zur Korrektur des erkrankten Phänotyps zu zeigen.

[0071] Ein herkömmlicher Ansatz, um den XP-Phänotypdefekt zu korrigieren würde sein, relevante DNA-Reparatur-Gene in Zellen, die von XP-Patienten abgeleitet sind, einzuführen. Verschiedene in-vitro Studien haben die Wiederherstellung eines herkömmlichen DNA-Reparatur-Phänotyps und ein verbessertes Überleben nach einer UV-Bestrahlung von XP-Zellen, welche der Expression des herkömmlichen DNA-Reparatur-Gens folgt, gezeigt (Mezzina, M. et al., „Correction by the ERCC2 gene of UV sensitivity and repair deficiency phenotype in a subset of trichothiodystrophy cells", Carcinogenesis 15, 1493-1498 (1994); Gozukara, E.M. et al., „The human DNA repair gene, ERCC2 (XPD), corrects ultraviolet hypersensitivity and ultraviolet hypermutability of a shuttle vector replicated in Xeroderma pigmentosum", Cancer Res 54, 3837-3844 (1994); Levy, D.D., Saijo, M., Tanaka, K., Kraemer, K.H., „expression of a transfected DNA repair gene (XPA) in xeroderma pigmentosum group A cells restores normal DNA repair and mutagenesis of UV-treated plasmids", Carcinogenesis 16, 1557-1563 (1995); Yagi, T. et al., "Complete restoration of normal DNA repair characteristics in group F xeroderma pigmentosum cells by over-expression of transfected XPF cDNA", Carcionogenesis 19, 55-60 (1998)). Andere Forscher haben den Defekt durch Einfügen von DNA-Reparaturgenen von anderen Organismen, wie von Mäusen, Hefe und Drosophila, ergänzt. (Tanaka, K., Satokata, I., Ogita, Z., Uchida, T. & Okada, Y., „Molecular cloning of mouse DNA repair gene that complements the defect of group-A xeroderma pigmentosum", Proc Natl Acad Sci, USA, 86, 5512-5516 (1989); Lambert, C., et al., "A yeast DNA repair gene partially complements defective excision repair in mammalian cells", EMBO J 7, 3245-3253 (1988); Shimamoto, T., et al., "Expression and functional analyses of the Dxpa gene the drosophila homolog of the human excision repair gene XPA", J Biol Chem 270, 22452-22459 (1995)). Ein weiterer nützlicher Ansatz wäre, den genetischen Defekt in dem DNA-Reparaturgen oder seine Transkription zu korrigieren und einen normalen Phänotyp wiederherzustellen. Molekulargenetische Studien haben neue Löschungen, Verbindungen-, Punktmutationen und Nonsense-Mutationen in dem XP-Gruppe-A-komplementären (XPAC) Gen definiert, (Satokata, I. et al., „Characterization of a slicing mutation in group A xeroderma pigmentosum", Proc Natl Acad Sci, USA 87, 9908-9912 (1990); Satokata, I. et al., „Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum", Mutation Res 273, 193-202 (1992); Satokata, I., Tanaka, K. & Okada, Y., „Molecular basis of group A xeroderma pigmentosum: a missense mutation and two deletions located in a zinc finger consensus sequence of the XPAC gene", Hum Genet 88, 603-607 (1992); Satokata, I., Tanaka, K., Yuba, S. & Okada, Y., "Identification of splicing mutations of the last nucleotides of exons a nonsense mutation and a missense mutation of the XPAC gene as causes of group A xeroderma pigmentosum", Mutation Res 273, 203-212 (1992)). Der durch Nonsense-Mutationen verursachte genetische Defekt könnte durch Expression von Suppressor-tRNAs behoben werden, die das verfrühte Terminationssignal erkennen, was gemäß der Lehre der vorliegenden Erfindung zur Einbringung ihrer jeweiligen Aminosäure und zur Wiederherstellung des normalen Phänotyps führt.

Materialien und Verfahren

[0072] Zelllinien. Eine DNA-reparaturfähige menschliche Fibroblast-Zelllinie (VA13, eine SV40, die eine menschliche W138 Fibroblast-Zelllinie transformiert, ATCC, Gaithersburg, MD) und eine SV40 transformierte Zelllinie, die bei einem XP-Patienten nachgewiesen wurde (XP12ROSV; eine Art Geschenk von Dr. Tanaka, Japan), wurde zur Studie verwendet. Die Zellen, wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagles's-Medium

(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) gezüchtet, das mit 1 % Glutamin und 10 % fetalem RInder-Serum (DIV Medium) ergänzt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C in einem befeuchteten CO_2-Brutschrank gezüchtet. E5-Helferzellen sind grüne Affennierenzellen, die das IE3-Gen exprimieren und die Replikation des IE3-gelöschten Helfervirus (freundlicherweise von P. Johnsen, San Diego bereitgestellt) ermöglichen.

[0073] Transfektion. Unter Verwendung einer FuGENE 6 Reagenz (Boehringer Mannheim, Deutschland) wurde die Transfektion nach Herstelleranweisungen mit geringen Modifkationen durchgeführt. Zellen (~1.5-2 × 10^5) wurden in 60 mm Gewebekultur-Platten ausgesät und es wurde ihnen gestattet, sich für 16-20 Stunden anzusetzen. Eine FuGENE 6 Transfektions-Reagenz (12 µl) wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einem 88 µl opti-MEM-Medium (Gibco BRL.) gereift, dann zu der Plasmid-DNA (4 µg) hinzugefügt und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gereift. Diese Transfektions-Mischung wurde den Zellen, die in dem fertigen DMEM-Medium (2 ml) gewachsen sind, hinzugefügt. Nach 14-16 Stunden bei 37°C wurden die Zellen einmal mit einer ausgewogenen Hanks-Salzlösung gewaschen (HBSS) und dann mit dem kompletten Medium gespeist und weiter bei 37°C für eine Gesamtzeit von 72 Stunden nach der Transfektion gereift. Transfizierte Zellen wurden in Gegenwart von Hygromycin (100-150 µg/ml) ausgewählt.

[0074] Aufbau einer menschlichen Ariginin-Opal-Suppressor-tRNA (hargsup $tRNA^{Opal}$) und Subklonen in einen Herpes-Simplex-Virus (HSV-Amplicon-Vektor). Auf Basis der beschriebenen Nukleotidsequenz menschlicher Ariginin-tRNA-Gene (Buckland RA et al., „A cluster of tRNA genes into [DRNI, TRR3, DDRAN] on the short arm of human chromosome 6", Genomics, 35 164-171 (1996)), wurde die Arginin-Opal-Suppressor-tRNA aufgebaut, die die Struktur-Sequenzen enthielt, welche die tRNA-Moleküle und 15 Basen der 3' flankierenden Region kodiert. Die 3' flankierende Region enthält Cluster von T-Residuen in dem nicht-kodierenden Strang, die als Signal agieren, um die Transkription zu beenden. Die Sequenz (nicht-kodierender Strang) und die Kleeblattstrukur der menschlichen Arginin-tRNA ist so, wie in **Fig. 2A** gezeigt. Ein einzelner Basenwechsel (gezeigt durch den * in **Fig. 2A**) in dem Anti-Codon wurde eingefügt, um die menschliche Arginin-tRNA in eine Opal-Suppressor tRNA umzuwandeln. Ein Paar von überlappenden Oligonukleodiden: 5'-GCGCTCGAG-AAAACGAAC CCCACTTAACCACGAAGGGATTCGAACCCTCAATCTTCTGATC-3' und
5'-GCGGGT ACCGACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAA GATTGAGGG-3' (synthetisiert von Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) wurden geglüht und eingefüllt, indem man ein T7-DNA-Polymerase-(Sequenzse Version 2, United States Biologicals) Enzym und eine Reaktionsmischung, die alle vier Deoxynukleotide enthält, verwendet. Das Doppelstrang-Oligonukleotid wurde mit Kpn I/Xho I digeriert und an denselben Restriktionsorten in einen HSV-Amplicon-Vektor ligiert (Wang, S., Young, W.-B., Jacobsen, C. & Link, C.J., „A novel Herpesvirus amplicon system for in-vivo gene therapy", Gene Ther 4, 1132-1141 (1997)), der modifiziert wurde, um den CMV-Promotor und die Poly-A-Sequenzen zu entfernen. Der resultierende Expressionsvektor pHEhargsup $tRNA^{Opal}$ ist so, wie in **Fig. 2B** gezeigt. Der Expressionsvektor enthält eine EBV-ori P- und EBNA-Sequenz, um das Plasmid episomal und ein Hygromycin-resistentes Gen beizubehalten, um eine Auswahl transfizierter Säugetierzellen zu ermöglichen. Das Plasmid enthält auch den HSV-1-lytischen Replikationsursprung (ori S) und einen HSV-1 Abschluss, der „A"-Sequenzen für eine Replikation und Packung in HSV-Virionen in Gegenwart eines ausführenden Helfervirus packt (Wang, S., Young, W.-B., Jacobsen, C. & Link, C.J., „A novel Herpesvirus amplicon system for in-vivo gene therapy", Gene Ther 4, 1132-1141 (1997); Spaete, R.R. & Frenkel, H., „The herpes simplex virus amplicon: A new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector", Cell 30, 295-304 (1982); Wang, S. & Vos, J., „A hybrid infectious vector based on Epstein-Barr virus and Herpes simplex virus type I for gene transfer into Human Gene", J Virol 70, 8422-8430 (1996)).

[0075] Einführung einer Opal-(TGA)-Mutation bei einer festgelegten Position innerhalb eines humanisierten, rot-verschobenen, grün-fluoreszenten Protein-(hRGFP)-Gens. Eine Opal-Mutation wurde an der Position Arg(CGC)73Opal(TGA) in das hRGFP-Gen eingeführt (Levy, J.P., Muldoon, R.R., Zolotukin, S. & Link, C.J., „Retroviral transfer and expression of humanized, red shifted green fluoescent protein into human tumor cells", Nature Biotechnol 14, 610-614 (1996)). Die Mutation wurde durch PCR eingeführt und aufgereiht, um die Mutation zu bestätigen. Das opal-mutierte hRGFP wurde in den pHE700-HSV-Amplicon-Vektor subgeklont [engl.: subcloned] (Wang, S., Young, W.-B., Jacobson, C. & Link, C.J., „A novel Herpesvirus amplicon system for in-vivo gene therapy", Gene Ther 4, 1132-1141 (1997)) unter der Kontrolle des CMV Promotors (mnRGFP).

[0076] Northern-Analyse. Die gesamte RNA wurde von gezüchteten Zellen durch Verwendung der RNeasy-Total-RNA-Ausrüstung (Qiagen, Santa Clarita, CA) isoliert. RNA-Proben (10 g) wurden mittels Elektrophorese durch 1 % Formaldehyd-Agarose-Gele getrennt und auf Nytran-Membran-Filter transferiert (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Die Filter wurden für 2 Stunden bei 42°C in einer Hybrisol-1-Lösung (Oncor, Gaithersburg, MD) vor-hybridisiert und anschließend über Nacht bei 42°C mit Sonden, die mit a (Aktinson, J. & Martin, R., „Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense sup-

pressor tRNAs", Nucleic Acids Res 22, 1327-1334 (1994)) PdCTP gekennzeichnet sind, unter Verwendung der Random-Primed-DANN-Kennzeichnungsausrüstung (Boehringer Mannheim) hybridisiert. Die Filter wurden zweimal mit 2 × SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur (RT), dann mit 0,1 × SSC und mit 0,1% SDS bei 55°C für 30 Minuten gewaschen und autoradiographiert.

[0077] Western-Analyse. Die gezüchteten Zellen wurden zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS lysiert und enthalten als Proteasehemmstoffe Phenylmethylsulfonylfluorid (100 µg/ml), Aprotinin (1 µg/ml) und Leupeptin (1 µg/ml). Das Zelllysat, wurde auf Eis für 20 Minuten herangezüchtet, bei 10.000 × g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Überschüssige wurde gesammelt. Proben (30µg) wurden mit einem 6 µl oder einem 5 × Probenpuffer (Laemmli, 1970) gemischt, für 3 Minuten gekocht und durch SDS-PAGE getrennt. Proteinproben wurden auf Nitrozellulosemembran elektroblotiert und mit speziellen Antikörpern untersucht. Die GFP- und XPAC-Proteine wurden durch erweiterte Chemilumineszenz (Amersham, England) detektiert, indem man Anti-GFP (Clontech, Palo Alto, CA) beziehungsweise Anti-XPAC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) polyklonale Antikörper und Meerrettich-Peroxidase (HRP) gepaartes Antikaninchen-Immunoglobulin als zweiten Antikörper verwendet.

[0078] Klongenetische Prüfung. Für UV-Überlebensexperimente wurden drei Zelllinien VA13, XP12ROSV und XP12ROSV, die die hargsup $tRNA^{Opal}$ exprimiert, in dreifacher Ausfertigung in 60 mm Platten bei unterschiedlichen Zelldichten, die von $2,5 \times 10^2$ bis 1×10^6 in 60 mm Petriplatten reichen, in Abhängigkeit von der Zelllinie und der verwendeten UVC-Dosis plattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gespült und einer UVC-Dosis ausgesetzt (254 nm, Spectroline, Modell XX-15G, Spectronics Corp, NY), die von 0-6 J/m^2 reicht. Der PBS-Puffer wurde entfernt und durch ein komplettes DMEM-Medium ersetzt, das Vitamine und nicht lebenswichtige Aminosäuren enthält. Ungefähr 10-12 Tage nach der Bestrahlung wurden die Kolonien mit Formaldehyd fixiert und mit Kristall-Violett (0,05 % in Wasser) eingefärbt. Die prozentuale Koloniebildungsfähigkeit wurde durch Vergleich der Koloniezahlen der bestrahlten Platten mit denen der unbestrahlten Platten bestimmt. Separate Experimente wurden unabhängig voneinander zwei- bis dreimal wiederholt.

[0079] Reaktivierungsprüfung unter Verwendung eines Plasmids, das ein Chloramphenikol-Acetyl-Transferase (CAT)-Reportergen trägt.

[0080] Ein Plasmid-pSVCAT (Kontrollvektor; Promega, Madison, WI), das das CAT-Gen unter der Kontrolle des SV-Promotors exprimiert, wurde für Plasmid-Reaktivierungsuntersuchungen verwendet. CAT-Prüfungen wurden unter Verwendung des Herstellerprotokolls mit geringen Modifikationen durchgeführt. Eine Plasmid-DNA (20 µg/ml) in Wasser wurde mit 254 nm UVC-Bestrahlung in Dosierungen, die von 0-600 J/m^2 reichen, behandelt, Ethanol ausgefällt und in ein geeignetes Volumen für Transfektion resuspensiert. XP12ROSV-Zellen (2×10^5) wurden in einer 60 mm Platte ausgesät und am folgenden Tag mit pHEhargsup $tRNA^{Opal}$ und einer UVC-bestrahlten pSVCAT-Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 10:1 (4µg der gesamten DNA) kotransfiziert. Als Kontrolle für die CAT-Plasmid-Reaktivierung wurden DNA-reparaturfähige VA13-Zellen (positive Kontolle) und XP12ROSV-Zellen (negative Kontrolle), die in eine 60 mm Platte gesät sind, mit dem modifizierten pHE-Vektor und dem UVC-bestrahlten pSVCAT-Plasmid in einem Verhältnis von 10:1 kotransfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen lysiert. Die Lysate wurden auf CAT-Aktivität unter Verwendung eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählverfahrens (LSC) untersucht. Kurz gesagt, wurde die Reaktionsmischung, die Protein-Lysate, [15C] Chloramphenicol (Du Pont, New England Nuclear, Wilmington DE; NEC 408A, 0,15 µCi) und n-butyryl CoA (25 µg als Substrat) (engültiges Reaktionsvolumen von 125 µl) bei 37°C für drei Stunden herangezüchtet. Das Reaktionsprodukt wurde mit 300 µl eines gemischten Xylols extrahiert. Die obere Xylol-Phase wurde gesammelt und zweimal mehr durch Hinzufügen von 100 µl von 0,25 M Tris-HCl, pH 8,0 extrahiert. Eine feste Menge der oberen Xylol-Phase, die das butyrylierte Chloramphenicol-Produkt repräsentiert, wurde zu der Szintillationsflüssigkeit (5 ml; OptiScint „Hi-Safe"1 LKB, England) hinzugefügt und durch Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie gezählt. Individuelle Transfektionen wurden in doppelter Ausfertigung durchgeführt und separate Experimente wurden unabhängig voneinander zwei- bis dreimal wiederholt. Die Fähigkeit, das mit UVC bestrahlte Plasmid zu reaktivieren, wurde als das Verhältnis der CAT-Aktivität in Extrakten von Zellen, die mit dem UV-bestrahlten Plasmid transfiziert wurden, zu derjenigen in den Zellen, die mit dem unbestrahlten pSVCAT-Plasmid transfiziert wurden, definiert.

[0081] Packung des pHEhargsup $tRNA^{Opal}$ Amplicon-Vektors. E5-Zellen (2×10^6 Zellen/10 cm Schale) wurden mit dem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Vektor transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen unter Selektion mit Hygromycin B (150 µg/ml) platziert. Die Hygromycin-resistenten E5-Zellen wurden mit 1 MOI eines CgaIΔ3 Helfer-Virus (freundlicherweise von P. Johnson, San Diego, zur Verfügung gestellt) in 1 ml Opti-MEM-Medium super-infiziert. Den Viren wurde es ermöglicht, auf den Zellen für zwei Stunden bei 37°C in

einem befeuchteten Brutschrank mit 5 % CO_2 zu absorbieren, und anschließend wurden 9 ml eines DEM-Mediums mit 10 % FBS hinzugefügt und die Zellen wurden für weitere 50-60 Stunden gebrütet. Der virale Überschuss, der einen Zellüberschuss enthält, wurde gesammelt. Die Zellen wurden durch ein Einfrier-Auftau-Verfahren (drei Wiederholungen) lysiert, anschießend bei 2.400 × g zentrifugiert, um den Zellüberschuss niederzuschlagen. Der Titer eines CgalΔ3 Helfer-Virus wurde durch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-gal)-Anfärbung ermittelt, wie vorher beschrieben (Wang, S. Young, W.-B., Jacobson, C. & Link, C.J., „A novel Herpesvirus amplicon system for in-vivo gene therapy", Gene Ther 4, 1132-1141 (1997)). Um den in-vitro Transfer des pHEhargsup $tRNA^{Opal}$ Amplicon-Vektors zu demonstrieren, wurden XP12ROSV-Zellen, die das mhRGFP-Gen exprimieren, mit unterschiedlichen Mengen des viralen Überschusses, der in opti-MEM verdünnt und bei 37°C in einem befeuchteten Brutschrank mit 5 % CO_2 herangezüchtet wurde, transduziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für die Wiederherstellung der GFP-Fluoreszenz visualisiert.

Ergebnisse

[0082] Wiederherstellung der GFP-Fluoreszenz durch eine Suppressor-tRNA. Um die funktionale Aktivität der hargsup $tRNA^{Opal}$ zu testen, wurde mhRGFP als Reporter-Gen eingesetzt. Eine bei der Position Arg73 Opal im hRGFP-Gen eingeführte opal-Mutation verhindert eine nachweisbare GFP-Fluoreszenz vollständig. Allerdings konnte die Kotransfektion des Plasmids, das die hargsup $tRNA^{Opal}$ enthält, mit dem Plasmid, das das mhRGFP-Gen in XP12ROSV-Zellen enthält, die Opal-Mutation in mhRGFP unterdrücken und die GFP-Fluoreszenz wiederherstellen (**Fig.** 3A und 3B). Kontrolltransfektionen mit einem mhRGFP-Plasmid alleine zeigten keine GFP-Fluoreszenz (**Fig.** 3C und 3D).

[0083] Expression von GFP-Transkriptionen und Protein. Um die Expression von hRGFP- und mhRGFP-Transkriptionen in transfizierten XP12ROSV-Zellen zu bestimmen, wurden Northern-Blots mit der hRGFP-cDNA untersucht. Transkriptionen ähnlicher Größe wurden in beiden transfizierten Zelllinien beobachtet (**Fig. 4A**, oberes Feld). Nach einer Normalisierung mit dem GAPDH-Housekeeping-Gen (**Fig. 4A**, unteres Feld), waren mhRGFP-Transkriptionen im Vergleich mit den hRGFP-Transkriptionen circa ein Drittel weniger reichlich. Eine Western-Analyse, die einen Anti-GFP-Antikörper verwendet, zeigt, dass XP12ROSV-Zellen, die mit mhRGFP und hargsup $tRNA^{Opal}$ kotransfiziert sind, ein GFP-Protein voller Länge, das in seiner Größe dem hRGFP-Protein ähnlich ist, exprimiert (**Fig. 4B**). Auf diese Weise wurde der direkte Beweis zur Verfügung gestellt, dass eine hargsup $tRNA^{Opal}$ die Nonsense-Mutation in dem mhRGFP-Gen unterdrücken und ein funktionales Protein in voller Länger produzieren kann. Obwohl gleiche Mengen des Proteins angereichert wurden (Daten nicht gezeigt), wurde im Vergleich zu hRGFP alleine eine etwa 10-fache Reduktion der Signal-Intensität in den XP12ROSV-Zellen, die sowohl mit mhRGFP als auch mit hargsup $tRNA^{Opal}$ transfiziert wurden, beobachtet. Zwei Beobachtungen erklären das viel weniger detektierte hRGFP-Protein, das in Zellen gefunden wurde, die sowohl mit dem mhRGFP als auch mit dem hargsup $tRNA^{Opal}$ kotransfiziert wurden. Das Niveau der mhRGFP-Transkriptionsziele für die Suppressor-tRNA war relativ zur Expression eines Housekeeping-Gens über ein Drittel geringer (**Fig. 4A**). Allerdings war die Reduktion im Proteinniveau signifikant größer als die Abnahme in RNA-Transkriptionen, die einen zusätzlichen Effekt von einer relativ geringen Unterdrückungseffizienz anzeigen. XP12ROSV-Zellen, die mit dem mhRGFP-Gen allein transfiziert wurden, sollten ein abgeschnittenes (~8 kDa) GFP-Protein produzieren, dieses wurde aber auf Grund des verwendeten Gel-Systems nicht detektiert.

[0084] Korrektur eines XPA-NER-Mangel-Phänotyps in XP-Zelllinien durch Nonsense-Suppressor-tRNA, wie gemessen durch ein Post-UV-Bestrahlungs-Zellüberleben. Um in-vitro zu zeigen, dass Suppressor tRNAs genetische Defekte, die durch Nonsense-Mutationen verursacht wurden, reparieren können, wurde eine DNA-reparatur-fehlerhafte XP-Fibroplast-Zelllinie – XP12ROSV ausgewählt.

[0085] Ein C- zu T-Übergang am Nukleotid 619 im Exon 5 des XPAC-Gens änderte das Arg-207-Codon (CGA) in ein Nonsense-Codon (TGA). Das führt zu einem abgeschnittenen XPAC-Protein und zu einer Unterbrechung der funktionalen Aktivität des XPAC-Gens (Satokata, I., et al., „Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum", Mutation Res 273, 193-202 (1992)). Diese Zelllinie hat nach der UV-Bestrahlung eine geringe Koloniebildungsfähigkeit. Diese Zellen wurden mit dem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Plasmid transfiziert und mit Hygromycin ausgewählt. Die ausgewählten Zellen wurden mit UVC (254 nm) in Dosen, die von 0-6 J/m^2 reichen, bestrahlt. Eine klonogenetische Prüfung wurde durchgeführt und ein 4- bis 35-facher Anstieg in der Koloniebildungsfähigkeit bei höherer UV-Dosis wurde in XP12ROSV-Zellen, die das hargsup $tRNA^{Opal}$ exprimieren, beobachtet (**Fig. 5**). Die Ergebnisse zeigten ein verbessertes UV-Überleben der XP12ROSV-Zellen auf Grund der partiellen Korrekturen in dem DNA-reparaturfehlerhaften-Phänotyp durch Einführung der Suppressor-tRNA.

[0086] UV-bestrahlte CAT-Plasmid-Reaktivierungs-Studien. Ein alternativer in-vitro Test, um zu bestimmen, ob Suppressor-tRNAs die XPAC-Gen-Nonsense-Mutation in XP12ROSV-Zellen unterdrücken können und eine DNA-Reparaturaktivität wiederherstellen können, ist die Verwendung von Expressionsvektoren. Plasmid-Vektoren, die das bakterielle CAT-Gen exprimieren, sind häufig dazu verwendet worden, die DNA-Reparatur und Mutagenesen in menschlichen Zellen zu messen (Kraemer, K.H., Protic-Sabljic, M., Bredberg, A. & Seidman, M.M., „Plasmid vectors for study of DNA repair and mutagenesis", Curr Probl Derm 17, 166-181 (1987)). Die XP12ROSV-Zellen, die kurzzeitig mit dem UV-bestrahlten pSVCAT-Plasmid transfiziert wurden, waren in der Hemmung der CAT-Expression im Vergleich zu den normalen VA13-Zellen viel empfindlicher (**Fig. 6**). Allerdings führt eine kurzzeitige Expression der Suppressor-tRNA in XP12ROSV-Zellen zu einer erhöhten Fähigkeit, ein UV-bestrahltes pSVCAT-Plasmid durch eine effiziente Unterdrückung der Nonsense-Mutation im XPAC-Gen zu reaktivieren und die DNA-Reparaturaktivität wiederherzustellen. Eine 3 bis 17-fache Erhöhung in der CAT-Aktivität bei höheren UV-Dosen wurde in XP-Zellen, die kurzzeitig sowohl mit dem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Plasmid als auch mit dem UV-geschädigten pCAT-Plasmid transfiziert wurden, beobachtet (**Fig. 6**).

[0087] Niveaus der XPAC-Transkription und des XPAC-Proteins in XP-Zellen. Die Northern-Analyse von XP12ROSV-Zellen zeigte eine sehr geringe Menge der XPAC-Transkription im Vergleich zu den normalen DNA-reparaturfähigen VA13-Zellen (**Fig. 7A**, oberes Feld). Die erhaltenen Ergebnisse waren ähnlich zu jenen, die früher berichtet wurden (Satokata, I., et al., „Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmetosum", Mutation Res 273, 193-202 (1992)). Um die partielle phänotypische Korrektur in XP12ROSV-Zellen durch eine Suppressor-tRNA mit dem Vorhandensein eines Proteins voller Länge zu korrelieren, wurde die Western-Analyse durchgeführt. **Fig. 7B** zeigt, dass ein XPAC-Protein, obwohl es in den normalen VA13-Zellen detektierbar war, in XP12ROSV-Zellen, die mit der hargsup $tRNA^{Opal}$ transfiziert sind, nicht detektierbar war. Außerdem wurde kein abgetrenntes XPAC-Polypeptid in den XP12ROSV-Zellen beobachtet.

[0088] Transduktion von XP12ROSV-Zellen, die mhRGFP mit einem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Amplicon-Vektor exprimieren, der in HSV-1-Vironen gepackt ist. Der in HSV-1-Virionen gepackte pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Amplicon-Vektor könnte eine Nonsense-Mutation in dem mhRGFP-Gen, das in XP12ROSV-Zellen exprimiert wurde, erfolgreich transduzieren und unterdrücken, wie durch die Wiederherstellung der GFP-Fluoreszenz veranschaulicht (**Fig. 8A** und **Fig. 8B**). Bei 40 MOI des Helfervirus wurde eine Wiederherstellung der GFP-Fluoreszenz in ungefähr 5 % der Zellen beobachtet. Allerdings war eine beachtliche Zytotoxizität zwischen 24 und 48 Stunden nach der Infektion offensichtlich. Bei geringerer MOI der Infektion wurden keine GFP-positiven Zellen beobachtet. GFP-Fluoreszenz wurde mit der oben genannten Zelllinie nicht beobachtet, die mit dem pHE700TK-Vektor, der in HSV-1-Vironen gepackt ist, transduziert wurde und als negative Kontrolle eingesetzt wird, oder wenn XP12ROSV-Zellen mit dem pHEhargsup $tRNA^{Opal}$-Amplicon-Vektor alleine transduziert wurden (Daten nicht gezeigt).

[0089] Diskussion. Indem wir Xeroderma-Pigmentosum Gruppe A-Zellen als Krankheitsmodell verwenden, sind wir in der Lage gewesen, in-vitro eine partielle Wiederherstellung der DNA-Reparatur-Aktivität von nonsense-mutierten-XPAC-Genen zu demonstrieren. Die XP12ROSV-Zelllinie, die für die Studie verwendet wurde, enthält eine homozygote Nonsense-Mutation im XPAC-Gen (Satokata, I., et al., „Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum", Mutation Res 273, 193-202 (1992)). Ein Arginin-(CGA)-Codon war zu einem Opal-(TGA)-Codon in dem XPAC-Gen mutiert worden, folglich entschieden wir, für unsere Studien eine menschliches Arginin-opal-Suppressor-tRNA aufzubauen. Bis heute waren keine tRNA-Suppressoren zuvor von der menschlichen Arigin-tRNA abgeleitet worden. Die aufgebaute Suppressor-tRNA ist klein in ihrer Größe, so dass die 5' flankierenden Sequenzen entfernt worden sind, während 15 Basen von den 3' flankierenden Sequenzen beibehalten wurden, um das Ende der Transkription zu signalisieren. Der Aufbau kleiner tRNAs durch Verwendung eines Paares von Oligonukleotiden hat einen Vorteil gegenüber dem mühsameren und zeitraubenden Verfahren der lagegerichteten Mutagenese, um eine tRNA in eine Suppressor-tRNA zu konvertieren. Durch die Verwendung unseres Verfahrens haben wir verschiedene unterschiedliche funktionale Suppressor-tRNAs, wie beispielsweise eine menschliche Serin-Amber-Suppressor- und eine Tyrosin-Ochre-Suppressor-tRNA aufgebaut. Eine hohe Durchleseffizienz bei der Verwendung von amber- oder ochre-mutierter hRGFP als Reporter-Gen wurde auch durch eine FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz beobachtet (Daten nicht dargestellt).

[0090] Die funktionale Aktivität der hargsup $tRNA^{Opal}$ wurde zuerst unter Verwendung eines opal-mutierten, humanisierten, rot-verschobenen, grün-fluoreszenten Proteins als Reportergen gezeigt. Eine hohe Effizienz von Nonsense-Suppression (>80 %) wurde durch die Wiederherstellung der hRGFP-Fluoreszenz und durch FACS-Analyse für GFP-positive Zellen gezeigt (Daten nicht gezeigt). Eine Expression der hargsup $tRNA^{Opal}$ XP-Zelllinien produzierte einen 4 bis 35-fachen Anstieg beim Zellüberleben nach einer UV-Bestrahlung und

eine erhöhte Fähigkeit der XP-Zellen, ein mit UV bestrahltes pSVCAT-Plasmid zu reaktivieren.

[0091] Suppressor-tRNAs können ein Durchlesen der natürlichen Terminations-Codone bewirken. Die am C-Ende erweiterten Proteine können kodominante negative Eigenschaften aufweisen oder sie können eine streng begrenzte Aktivität haben oder sie können Gegenstand einer vorzeitigen Degradation sein. All dies kann schädlich für die Zelle sein. Allerdings kann die Zelle in der Lage sein, sich aufgrund mehrfacher translationaler Stopp-Codone am Ende eines Gens und auch wegen der ineffizienten Unterdrückung unterschiedlicher Suppressor-tRNAs selbst vor solch schädlichen Effekten zu schützen. Vorläufige Studien von unserer Toxizitätsprüfung offenbarten, dass eine stabile Expression der Suppressor-tRNA in XP-Zellen den Zyklus, wie er durch FACS-Analysen (Daten nicht gezeigt) bestimmt wurde, nicht änderte oder eine direkte zytotoxische Beeinflussung verursachte, der in klonogenetischen Proben detektiert werden konnte.

[0092] Die praktische Anwendung der Suppressor-tRNA als therapeutische Wirkstoffe für die Gentherapie wird stark von der Entwicklung von effizienten Vektoren abhängen, die die langfristige Gen-Expression in den passenden Zielgeweben oder Zellen aushalten können. Einige Vektor-Arten sind für diesen Zweck in der Entwicklung. Über die Verwendung von rekombinanten Retroviren, um DNA-Reparatur-Gene, wie zum Beispiel XPD (Carreau, M., et al., „Functional retroviral vector for gene therapy of xeroderma pigmentosum group D patients", Hum Gene Ther 6, 1307-1315 (1995); Quilliet, X., et al., „Long-term complementation of DNA repair deficient human primary fibroblasts by retroviral transduction of the XPD gene", Mutation Res 364, 161-169 (1996)), XPA, XPB und XPC Gene (Zeng, L. et al., "Retrovirusmediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C", Gene Ther 4, 1077-1084 (1997), in XP-Zellen mit dem entsprechenden defekten DNA-Reparatur-Gen zu liefern, ist berichtet worden. Eine funktionale Expression des Transgens und eine Verbesserung der DNA-Reparatur-Aktivität wurden in den transduzierten Zellen beobachtet. Um eine effiziente Bereitstellung der Suppressor-tRNA zu erhalten, beschlossen wir, einen neuen HSV-Amplicon-Vektor, pHE, zu verwenden (Wang, S., Young, W.-B., Jacobsen, C. & Link, C.J., „A novel Herpesvirus amplicon system for in-vivo gene therapy", Gene Ther 4, 1132-1141 (1997), so dass das Plasmid, welches die Suppressor-tRNA enthält, verstärkt und in infizierten HSV-1-Virionen in Gegenwart des durchführenden Helfervirus gepackt werden konnte. Der infektiöse pHE-Vektor hat eine effiziente Transgenexpression in einer Vielzahl menschlicher Zelllinien. Die aufgebaute Suppressor-tRNA ist nur ungefähr 0,1 kb groß. Dadurch könnten circa 15 Kopien der tRNA in ein einfaches 152 kb-Virus-Genom gepackt werden. Obwohl wir in der Lage sind, die Suppressor-tRNA in das Herpes-Genom zu packen, zeigten weniger als 5 % der transduzierten XP12ROSV-Zellen, die das mhRGFP exprimieren, eine grüne Fluoreszenz (**Fig.** 7). Die zelluläre Toxizität und die geringe Unterdrückungseffizienz sind wahrscheinlich für Helfervirus-Proteine zweitrangig, die die Wirtsproteinsynthese abschalten. Frühere Studien haben gezeigt, dass die HSV-Wirt-Abschaltgene, wie beispielsweise vhs (UL41) und ICP47 (UL54) eine Wirtszellenproteinsynthesen hemmen können (Kwong, A.D., Kruper, J.A. & Frenkel, N., „Herpes simplex virus host shutoff function", J Virol 62, 912-921 (1988); Hardwicke, M.A. & Sandri-Goldin, R.M., „The Herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection", J Virol 68, 4797-4810 (1994)). Zum Beispiel erleichtert eine Expression des vhs-Gens die Degradation einer Wirts-mRNA (Kwong, A.D., Kruper, J.A. & Frenkel, N., „Herpes simplex virus host shutoff function", J Virol 62, 912-921 (1988)). Es ist möglich, dass diese oder andere Helfervirus-Proteine die mRNA-Stabilität oder die Expression des mhRGFP-Gens reduzierten und zu weniger Zielen für die Suppressor-tRNA führten. Studien sind im Gange, um das vor kurzem entwickelte helferfreie-Packungs-System zu verwenden, um die Präsenz viraler Wirtabschalt-Gene zu beseitigen und die Virus-Zytotoxizität zu reduzieren oder zu beseitigen (Fraefel, C. et al., „Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells", J Virol 70, 7190-7 (1996)).

[0093] Gemäß der vorliegenden Erfindung sind einige weitere menschliche Suppressor-Serin-tRNAs synthetisiert worden und es wurde gezeigt, dass sie in Übereinstimmung mit der hierin enthaltenen Lehre funktional sind. Diese sind in den **Fig.** 8–Fig. 13 offenbart.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Panchal, Rekha G.
Link, Charles J.

<120> Supressor-tRNA-Oligonucleotide und Verfahren für deren Verwendung

<130> Suppressor-tRNAs

<140>
<141>

<150> 60/071,416
<151> 1998-01-14

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 118
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 1
gcgcggtacc agtaaaaaaa gcacgccgta gtcggcagga ttcgaacctg cgcggggaga 60
ccccaatgga tttgaagtcc atcgccttaa ccactcggcc acgactacca gctgcgcg 118

<210> 2
<211> 119
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 2

cgcgccatgg tcatttttt cgtgcggcat cagccgtcct aagcttggac gcgcccctct 60

ggggttacct aaacttcagg tagccggaat tggtgagccg gtgctgatgg tcgaccgcg 119

<210> 3

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 3

gcgcctcgag agtaaaaaaa gcacgccgta gtcggcagga ttcgaacctg cgcggggaga 60

ccccaatgga tttagagtcc atcgccttaa ccactcggcc acgactacgg taccgcgc 118

<210> 4

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 4

cgcggagctc tcatttttt cgtgcggcat cagccgtcct aagcttggac gcgcccctct 60

ggggttacct aaatctcagg tagcggaatt ggtgagccgg tgctgatgcc atggcgcg 118

<210> 5

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 5

gcgcgctagc agtaaaaaaa gcacgccgta gtcggcagga ttcgaacctg cgcggggaga 60

ccccaatgga tttaaagtcc atcgccttaa ccactcggcc acgactacct cgaggcgc 118

<210> 6

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 6

cgcgcgatcg tcatttttt cgtgcggcat cagccgtcct aagcttggac gcgcccctct 60

ggggttacct aaatttcagg tagcggaatt ggtgagccgg tgctgatgga gctccgcg 118

<210> 7

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 7

gcgcggtacc agtaaaaaaa gcacgccgta gtcggcagga ttcgaacctg cgcggggaga 60

ccccaatgga tttgaagtcc atcgccttaa ccactcggcc acgactacca gctggcgc 118

<210> 8

<211> 119

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 8

cgcgccatgg tcatttttt cgtgcggcat cagccgtcct aagcttggac gcgcccctct 60

ggggttacct aaacttcagg tagccggaat tggtgagccg gtgctgatgg tcgaccgcg 119

<210> 9

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 9

gcgcctcgag agtaaaaaaa gcacgccgta gtcggcagga ttcgaacctg cgcggggaga 60

ccccaatgga tttagagtcc atcgccttaa ccactcggcc acgactacgg taccgcgc 118

<210> 10

<211> 118

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 10

cgcggagctc tcatttttt cgtgcggcat cagccgtcct aagcttggac gcgcccctct 60

ggggttacct aaatctcagg tagcggaatt ggtgagccgg tgctgatgcc atggcgcg 118

<210> 11

<211> 82

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 11

gtagtcgtgg ccgagtggtt aaggcgatgg actttaaatc cattggggtc tccccgcgca 60

ggttcgaatc ctgccgacta cg 82

<210> 12

<211> 82

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 12

gtagtcgtgg ccgagtggtt aaggcgatgg actctaaatc cattggggtc tccccgcgca 60

ggttcgaatc ctgccgacta cg 82

<210> 13

<211> 82

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 13

gtagtcgtgg ccgagtggtt aaggcgatgg acttcaaatc cattggggtc tccccgcgca 60

ggttcgaatc ctgccgacta cg 82

<210> 14

<211> 73

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 14

gaccacgtgg cctaatggat aaggcgtctg acttcagatc agaagattga gggttcgaat 60

cccttcgtgg tta 73

Patentansprüche

1. Oligonukleotidsequenz, die eine synthetische Suppressor – tRNA kodiert, umfassend:
A) eine menschliche tRNA – Strukturgensequenz, bestehend aus nicht mehr als zwanzig 3' flankierenden Residuen und keinen 5' flankierenden Residuen, wobei die besagte Sequenz eine Anticodonregion für eine Paarung mit einer mRNA kodiert;
B) eine Gesamtlänge von weniger als 150 Nukleotiden;
C) eine Anticodonsequenz, die modifiziert wurde, um ein Codon zu erkennen, das sich von dem ursprünglich erkannten unterscheidet.

2. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei die besagte Anticodonregion eine Nonsensmutation kodiert, die aus folgender Gruppe ausgewählt wird: bernsteinfarben (TAG), ockerfarben (UAA) und opal (UGA).

3. Oligonukleotid nach Anspruch 1 oder 2, das des weiteren eine zweite Oligonukleotidsequenz wie die in Anspruch 1 beschriebene enthält, wobei sich die besagten zwei Sequenzen hintereinander („in tandem") befinden.

4. Oligonukleotid nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Serin-tRNA kodiert.

5. Oligonukleotid nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Arginin-tRNA kodiert.

6. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das besagte Oligonukleotid eine Sequenz aus der Gruppe aufweist, die aus SEQ ID NOS:1-10, ihren Komplementen (Ergänzungen), und ihren funktionellen Entsprechungen (Äquivalenten) besteht.

7. Ein In-vitro-Verfahren der Wiederherstellung der Übersetzung einer Nukleotidsequenz, die eine Nonsensmutation innerhalb einer Zelle einschließt, bestehend aus: Einführen einer Nukleinsäuresequenz, die ein synthetisches Suppressor – tRNA Oligonukleotid kodiert, in besagte Zelle, wobei besagtes Oligonukleotid folgendes umfasst:
A) eine menschliche tRNA – Strukturgensequenz, bestehend aus nicht mehr als zwanzig 3' flankierenden Residuen und keinen 5' flankierenden Residuen, wobei die besagte Sequenz eine Anticodonregion für eine Paarung mit einer mRNA kodiert;
B) eine Gesamtlänge von weniger als 150 Nukleotide;
C) eine Anticodonsequenz, welche modifiziert wurde, um ein Codon zu erkennen, das sich von dem ursprünglich erkannten unterscheidet, wobei das besagte Anticodon eines ist, das sich mit der besagten Nonsensmutation paaren wird, und die besagte tRNA – Strukturgensequenz für die Aufladung mit einer Aminosäure kodiert wurde, welche durch die besagte Nonsensmutation gelöscht wurde.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die besagte Nukleotidsequenz mit der besagten Nonsensmutation eine ist, die in besagte Zelle eingeführt wurde.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Serin-tRNA kodiert.

10. Verfahren nach Anspruch 7, 8 oder 9, wobei besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Arginin-tRNA kodiert.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7, 8, 9 oder 10, wobei das besagte Oligonukleotid eine Sequenz aus der Gruppe aufweist, die aus SEQ ID NOS:1-10, ihren Komplementen (Ergänzungen), und ihren funktionellen Entsprechungen (Äquivalenten) besteht.

12. Ein In-vitro-Verfahren der Wiederherstellung der Übersetzung einer Nukleotidsequenz, die eine Nonsensmutation innerhalb einer Zelle einschließt, bestehend aus: Einführen eines synthetischen Suppressor – tRNA Oligonukleotids in die besagte Zelle, wobei das besagte Oligonukleotid ein solches ist, das von der Sequenz aus einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wurde.

13. Nukleotidvektor der die Nukleotidsequenz aus einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.

14. Nukleotidvektor nach Anspruch 13, wobei der besagte Vektor ein Virusvektor ist.

15. Vektor nach Anspruch 13, wobei der besagte Vektor ein solcher ist, der aus folgender Gruppe ausgewählt ist: Retrovirus, Adenovirus, Adeno – Zugehörige, Herpes simplex Virus, und Herpes simplex Virus-Vektor.

16. Vektor nach Anspruch 13, wobei der besagte Vektor ein Herpesvirusvektor ist.

17. Vektor nach Anspruch 13, wobei der besagte Vektor ein Herpesvirus mini Amplicon-Vektor ist, bestehend aus: einem Epstein-Barr-Virus ori P und einer EBNA-1 Sequenz zur Aufrechterhaltung eines episomalen Plasmides, einem hygromycin resistentem Gen, einem HSV-1 lytischen Reproduktionsursprung (ori S), und einem HSC-1 terminal Verpackungssignal.

18. Vektor nach Anspruch 13, wobei der besagte Vektor ein pHhargsup $tRNA^{Opal}$ Vektor ist.

19. Eine transformierte Wirtszelle, die die Nukleotidsequenz aus einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.

20. Ein In-vitro-Verfahren zur Einführung einer orts-spezifischen Mutation in ein umgewandeltes Protein, bestehend aus: Einführen einer Nukleinsäuresequenz in besagte Zelle, die ein synthetisches Suppressor – tRNA Oligonukleotid kodiert, wobei das besagte Oligonukleotid folgendes umfasst:
A) eine menschliche tRNA – Strukturgensequenz, die nicht mehr als zwanzig 3' flankierende Residuen und keine 5' flankierende Residuen umfasst, wobei besagte Sequenz eine Anticodonregion für eine Verbindung mit der mRNA kodiert;
B) eine Gesamtlänge von weniger als 150 Nukleotiden;
C) eine Anticodonsequenz, welche modifiziert wurde, um ein Codon zu erkennen, das sich von dem ursprünglich erkannten unterscheidet, wobei das besagte Anticodon eines ist, das sich mit der besagten Nonsensmutation paaren wird und die besagte tRNA – Strukturgensequenz für die Aufladung mit einer Aminosäure kodiert wurde, welche durch die besagte Nonsensmutation gelöscht wurde.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die besagte Anticodonregion eine Nonsensmutation kodiert, die aus folgender Gruppe ausgewählt wird: bernsteinfarben (TAG), ockerfarben (UAA) und opal (UGA)

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Serin-tRNA kodiert.

23. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Arginin-tRNA kodiert.

24. Verfahren nach Anspruch 20, 21, 22 oder 23, wobei das besagte Oligonukleotid eine Sequenz aus der Gruppe hat, die aus SEQ ID NOS:1-10, ihren Komplementen (Ergänzungen), und ihren funktionellen Entsprechungen (Äquivalenten) besteht.

25. Ein In-vitro-Verfahren zur Einführung einer orts-spezifischen Mutation in ein umgewandeltes Protein, bestehend aus: Einführen einer synthetischen Suppressor – tRNA in besagte Zelle, die von der Sequenz aus einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wurde.

26. Verfahren zur Entwicklung einer synthetischen Suppressor – tRNA, die folgendes umfasst:
A) Identifizieren einer interessierenden tRNA – Sequenz;
B) Identifizieren eines Anticodons der besagten tRNA – Sequenz;
C) Entwickeln einer alternativen Anticodonsequenz derart, dass eine andersartige Aminosäure in Bezug zu besagtem Anticodon gesetzt wird, als es normalerweise der Fall wäre;
D) Synthetisieren eines Oligonukleotids, das folgendes umfasst:
a) eine menschliche tRNA – Strukturgensequenz, bestehend aus nicht mehr als zwanzig 3' flankierenden Residuen und keinen 5' flankierenden Residuen, wobei die besagte Sequenz eine Anticodonregion für eine Paarung mit einer mRNA kodiert;
b) eine Gesamtlänge von weniger als 150 Nukleotiden;
c) eine Anticodonsequenz, welche modifiziert wurde, um ein Codon zu erkennen, das sich von dem ursprünglich erkannten unterscheidet, wobei das besagte Anticodon eines ist, das sich mit der besagten Nonsensmutation paaren wird, und die besagte tRNA – Strukturgensequenz für die Aufladung mit einer Aminosäure kodiert wurde, welche durch die besagte Nonsensmutation gelöscht wurde.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die besagte Anticodonregion eine Nonsensmutation kodiert, die aus folgender Gruppe ausgewählt wird: bernsteinfarben (TAG), ockerfarben (UAA) und opal (UGA)

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Serin-tRNA kodiert.

29. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei die besagte tRNA – Strukturgensequenz eine Arginin-tRNA kodiert.

30. Ein In-vitro-Verfahren zur Transduktionsüberwachung von Zellen, die folgendes umfaßt: Einführen eines Oligonukleotidvektors, bestehend aus einem Reportergen, wobei das besagte Reportergen durch Einleiten einer Nonsensmutation deaktiviert wurde; Einführen einer synthetischen Suppressor – tRNA – Sequenz in besagte Zelle entsprechend einem der Ansprüche 1 bis 6; und Überprüfung einer Reaktivierung des Reportegens.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das besagte Reportergen aus folgender Gruppe ausgewählt wird: Chloramphenicol Acetyltransferase und Green Fluorescent Protein (GFP).

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

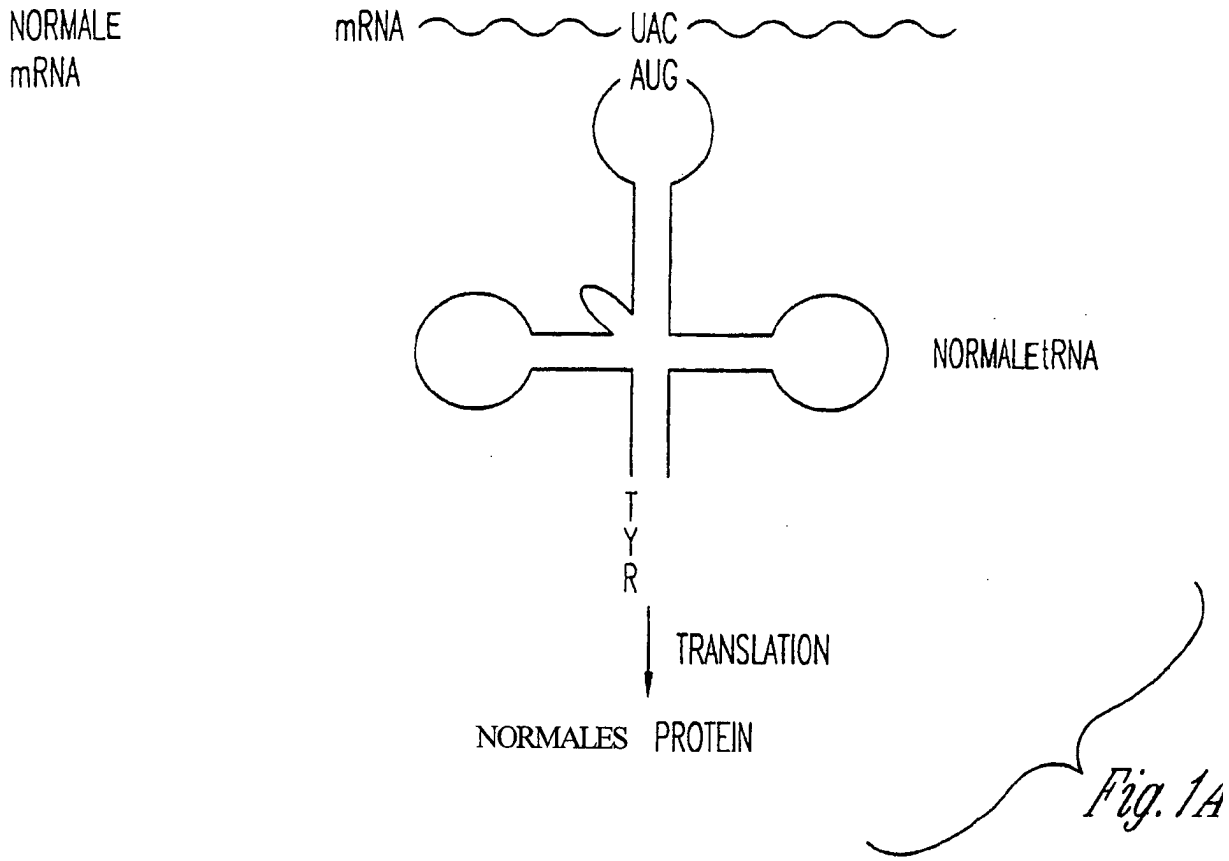


Fig. 1A

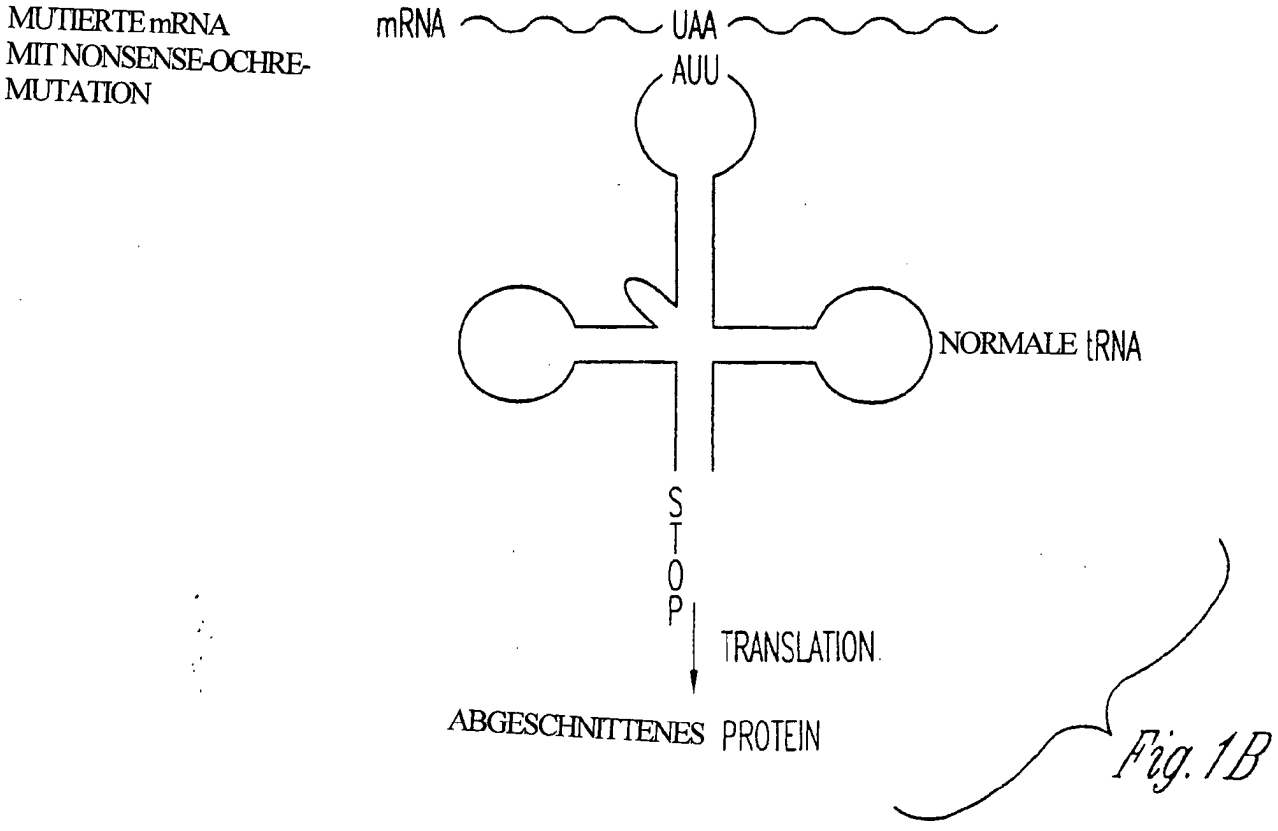


Fig. 1B

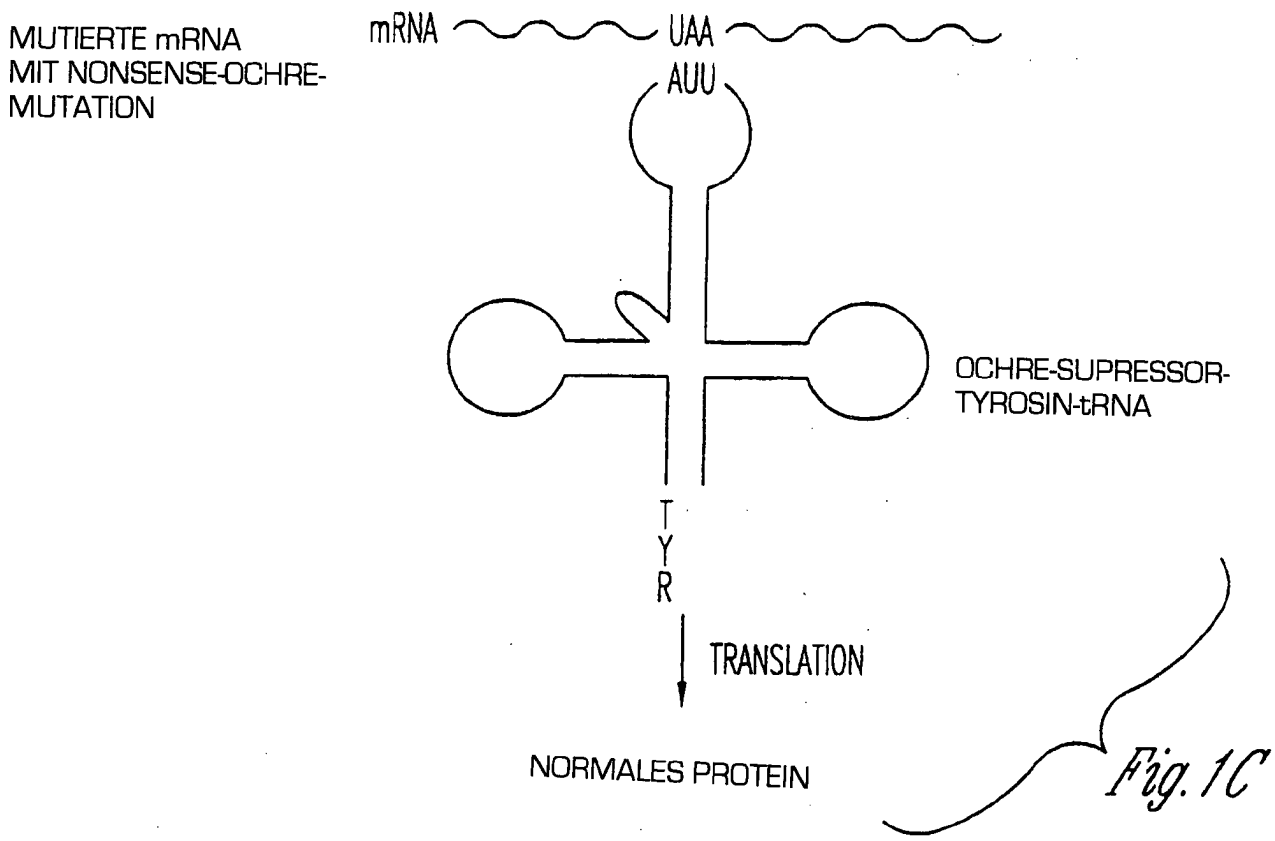

MUTIERTE mRNA
MIT NONSENSE-OCHRE-
MUTATION
mRNA
UAA
AUU
OCHRE-SUPRESSOR-
TYROSIN-tRNA
T
Y
R
TRANSLATION
NORMALES PROTEIN

Fig. 1C

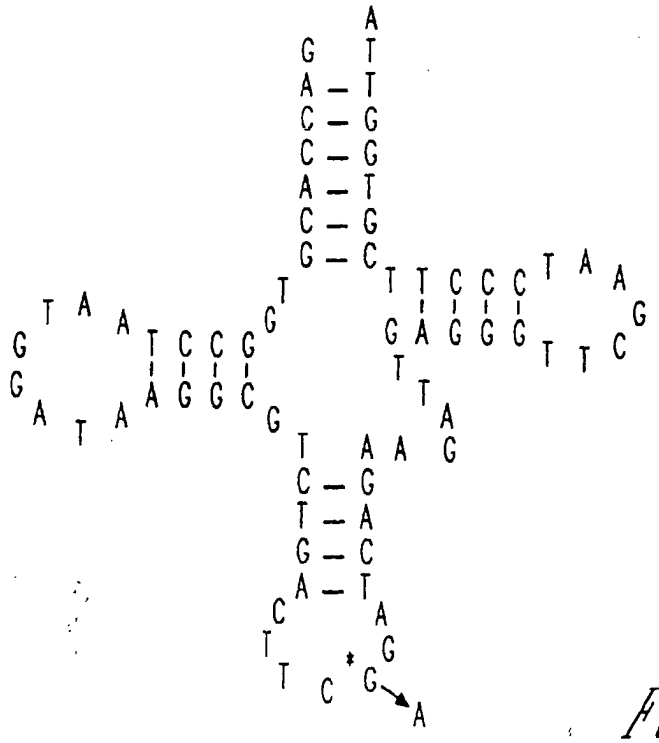


Fig. 2A

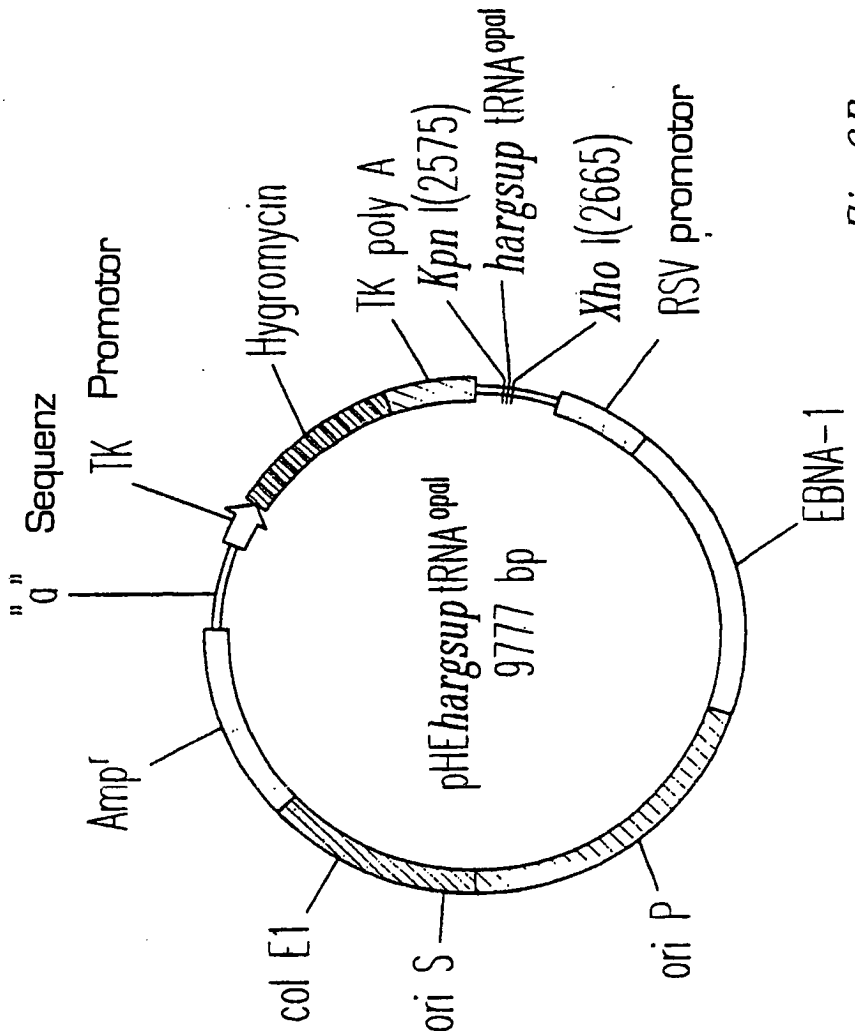
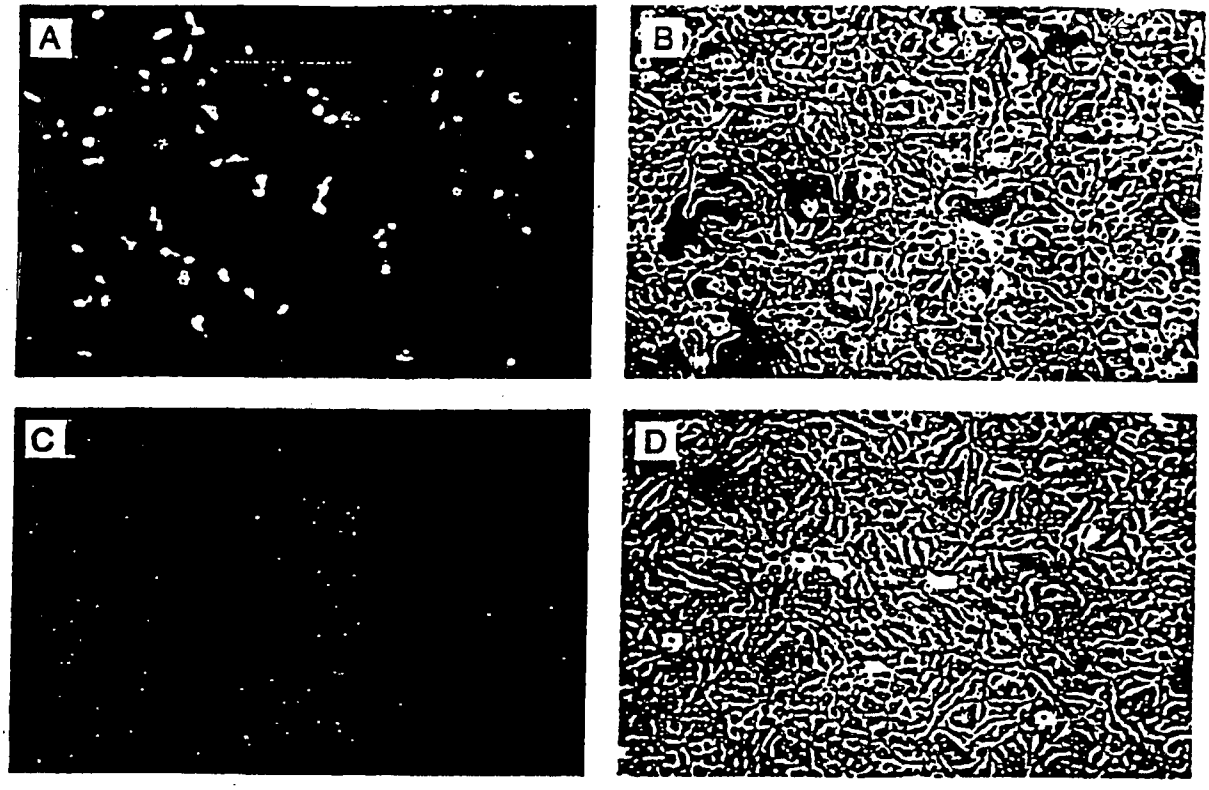

" " Sequenz
TK Promotor
Hygromycin
TK poly A
Kpn I(2575)
hargsup tRNA opal
Xho I(2665)
RSV promotor
EBNA-1
pHEhargsup tRNA opal
9777 bp
Ampr
col E1
ori S
ori P

Fig.2B



Figs. 3A-3D

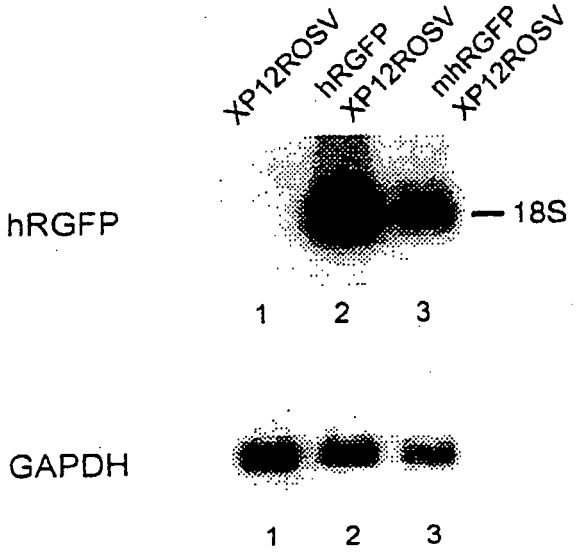

XP12ROSV
hRGFP XP12ROSV
mhRGFP XP12ROSV
hRGFP
18S
1 2 3
GAPDH
1 2 3

Fig. 4A

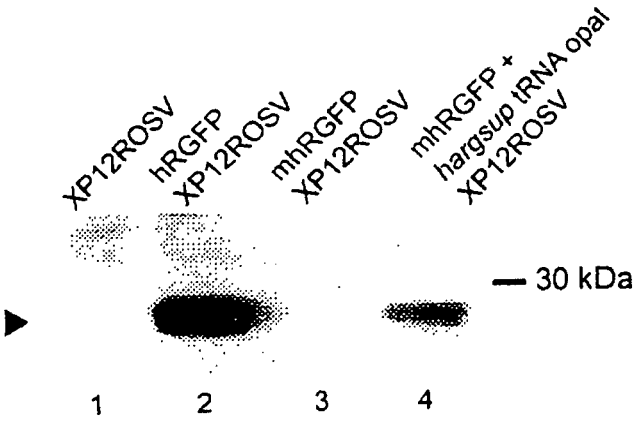

XP12ROSV
hRGFP XP12ROSV
mhRGFP XP12ROSV
mhRGFP + hargsup tRNA opal XP12ROSV
30 kDa
1 2 3 4

Fig. 4B

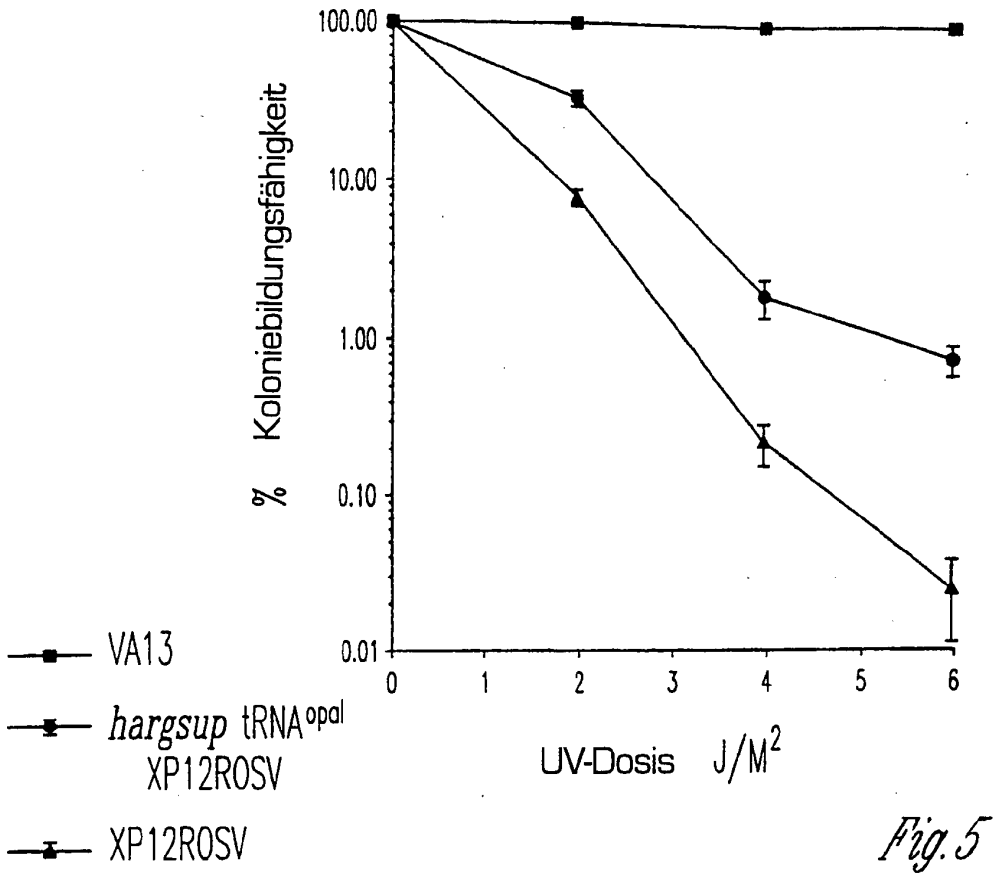

100.00
10.00
1.00
0.10
0.01
% Koloniebildungsfähigkeit
0
1
2
3
4
5
6
UV-Dosis J/M2
VA13
hargsup tRNAopal
XP12ROSV
XP12ROSV

Fig. 5

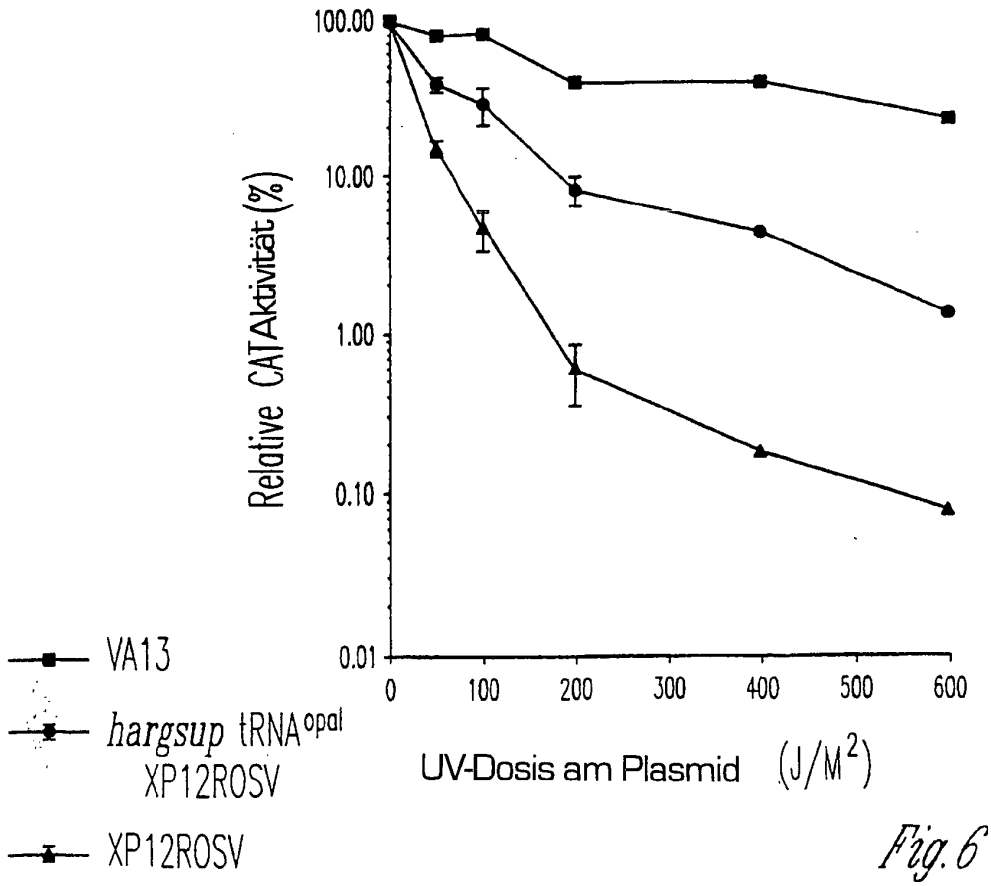

100.00
10.00
1.00
0.10
0.01
Relative CAT Aktivität (%)
0
100
200
300
400
500
600
UV-Dosis am Plasmid (J/M2)
VA13
hargsup tRNAopal
XP12ROSV
XP12ROSV

Fig. 6

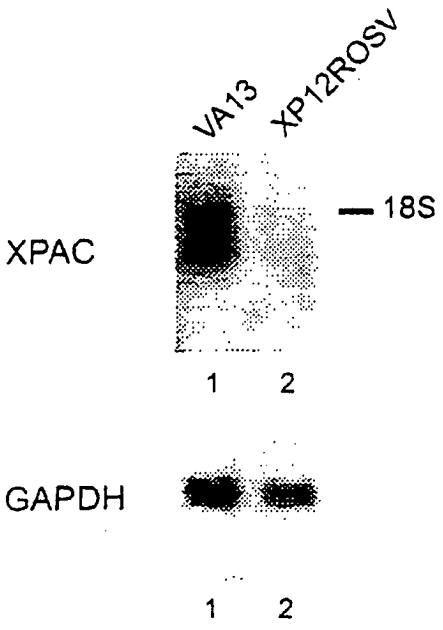

VA13
XP12ROSV
XPAC
18S
1
2
GAPDH
1
2

Fig. 7A

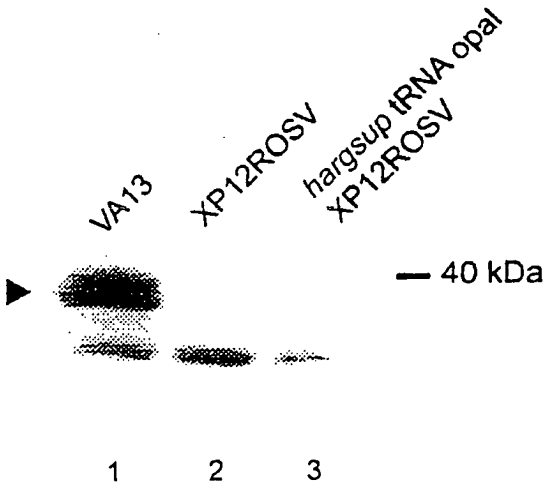

VA13
XP12ROSV
hargsup tRNA opal
XP12ROSV
40 kDa
1
2
3

Fig. 7B



Fig. 8A

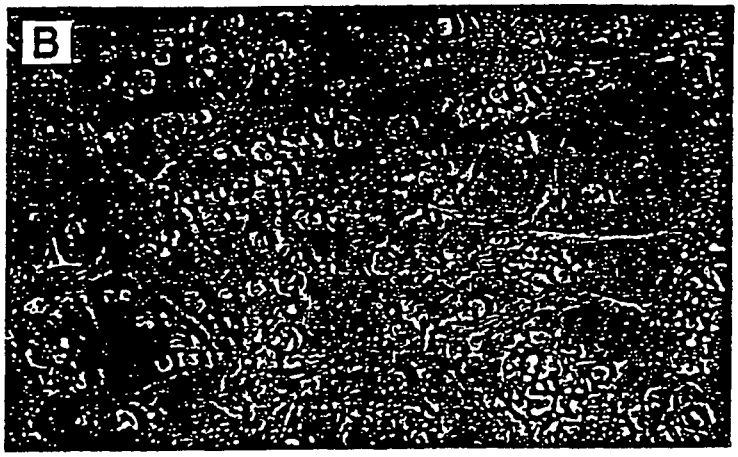


Fig. 8B

Menschliche Opal-Amber-Supressor Ser tRNA (del CCA bei dem 3' Ende)

pHE 850

Menschliche Opal-Supressor-Serin-tRNA (bei Verwendung von RgP 24/25)

5' gcgcGGTACCAGTAAAAAAAGCACGCCGTAGTCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGAGACCCCAATGGATTTGAAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTACCAGCTGgcgc

3' cgcgCCATGGTCATTTTTTTCGTGCGGCATCAGCCGTCCTAAGCTTGGACGCGCCCCTCTGGGGTTACCTAAACTTCAGGTAGCGGAATTGGTGAGCCGGTGCTGATGGTCGACcgcg

Kpn I — Pvu II

Menschliche Amber-Suppressor-Serin-tRNA (bei Verwendung von RgP 18/4)

5' gcgcCTCGAGAGTAAAAAAAGCACGCCGTAGTCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGAGACCCCAATGGATTTAGAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTACGGTACCgcgc

3' cgcgGAGCTCTCATTTTTTTCGTGCGGCATCAGCCGTCCTAAGCTTGGACGCGCCCCTCTGGGGTTACCTAAATCTCAGGTAGCGGAATTGGTGAGCCGGTGCTGATGCCATGGcgcg

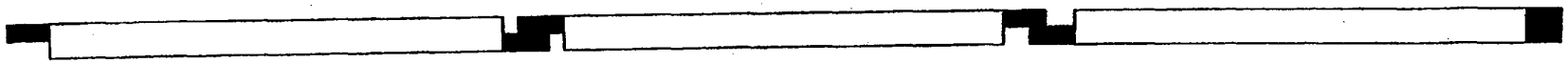
Xho I — Kpn I

Menschliche-Ochre-Suppressor-Serin-tRNA (bei Verwendung von RgP 73/74)

5' gcgcGCTAGCAGTAAAAAAAGCACGCCGTAGTCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGAGACCCCAATGGATTTAAAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTACCTCGAGgcgc

3' cgcgCGATCGTCATTTTTTTCGTGCGGCATCAGCCGTCCTAAGCTTGGACGCGCCCCTCTGGGGTTACCTAAATTTCAGGTAGCGGAATTGGTGAGCCGGTGCTGATGGAGCTCcgcg

Nhe I — Xho I



Ochre-Serin — Amber-Serin — Opal-Serin

Fig. 9

Menschliche Opal-Amber-Supressor Ser tRNA (del CCA bei dem 3' Ende)

pHE 850

Menschliche Opal-Supressor-Serin-tRNA (bei Verwendung von oligos RgP24/25)

5' gcgcGGTACCAGTAAAAAAAGCACGCCGTAGTCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGAGACCCCAATGGATTTGAAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTACCAGCTGgcgc

3' cgcgCCATGGTCATTTTTTTCGTGCGGCATCAGCCGTCCTAAGCTTGGACGCGCCCCTCTGGGGTTACCTAAACTTCAGGTAGCGGAATTGGTGAGCCGGTGCTGATGGTCGACcgcg

Kpn I — Pvu II

Menschliche Amber-Suppressor-Serin-tRNA (bei Verwendung von oligos 18/4)

5' gcgcCTCGAGAGTAAAAAAAGCACGCCGTAGTCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGAGACCCCAATGGATTTAGAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTACGGTACCgcgc

3' cgcgGAGCTCTCATTTTTTTCGTGCGGCATCAGCCGTCCTAAGCTTGGACGCGCCCCTCTGGGGTTACCTAAATCTCAGGTAGCGGAATTGGTGAGCCGGTGCTGATGCCATGGcgcg

Xho I — Kpn I



Amber-Serin Opal-Serin

Fig. 10

DE 699 26 052 T2 2006.04.27

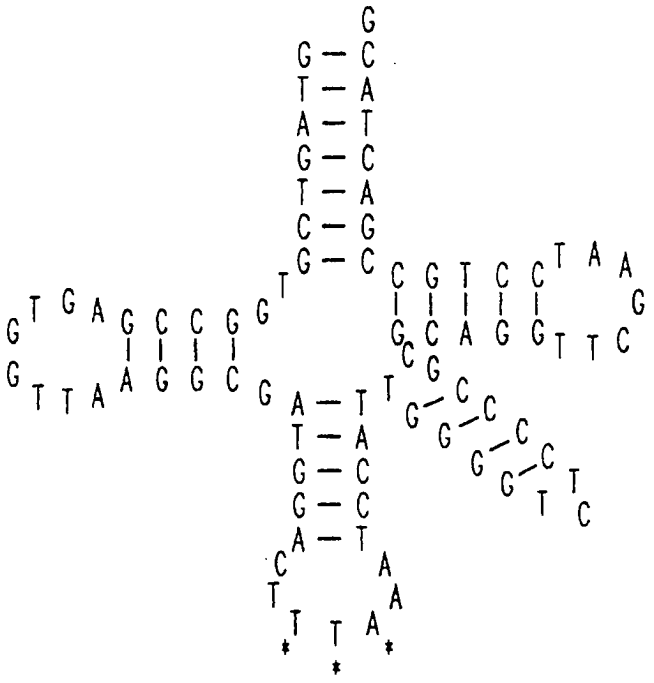


Fig. 11

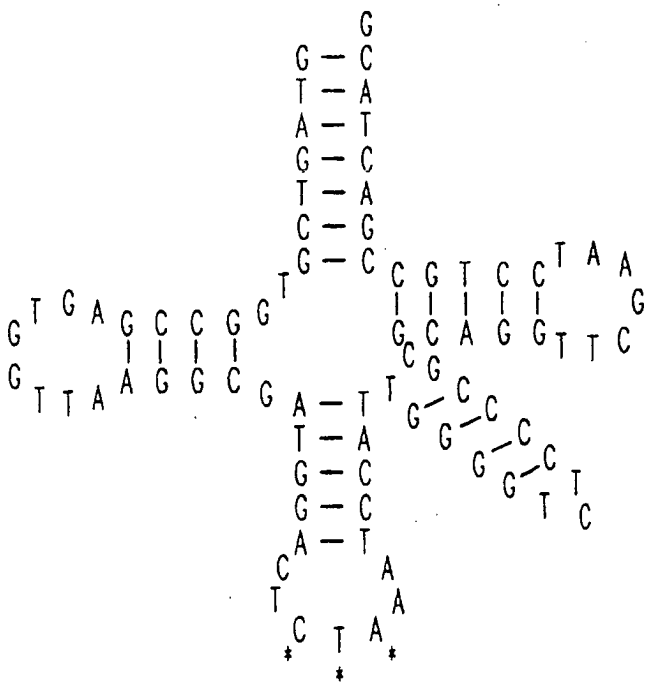


Fig. 12

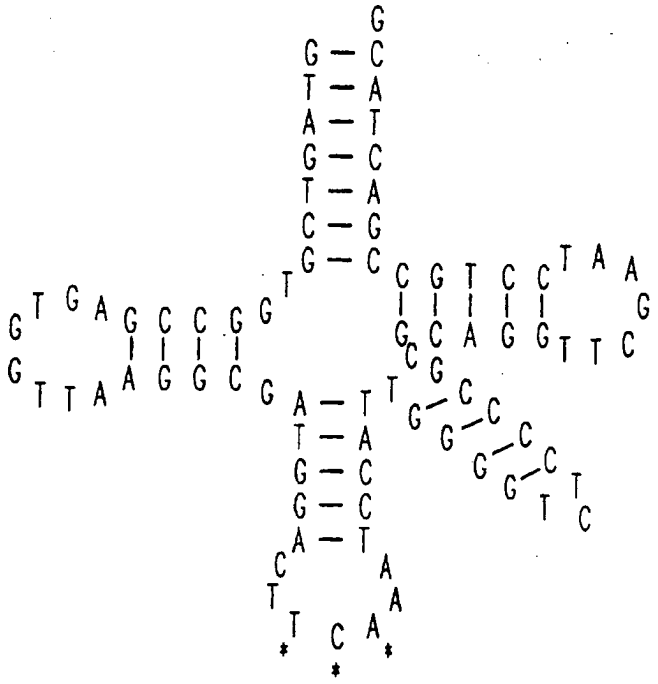


Fig. 13

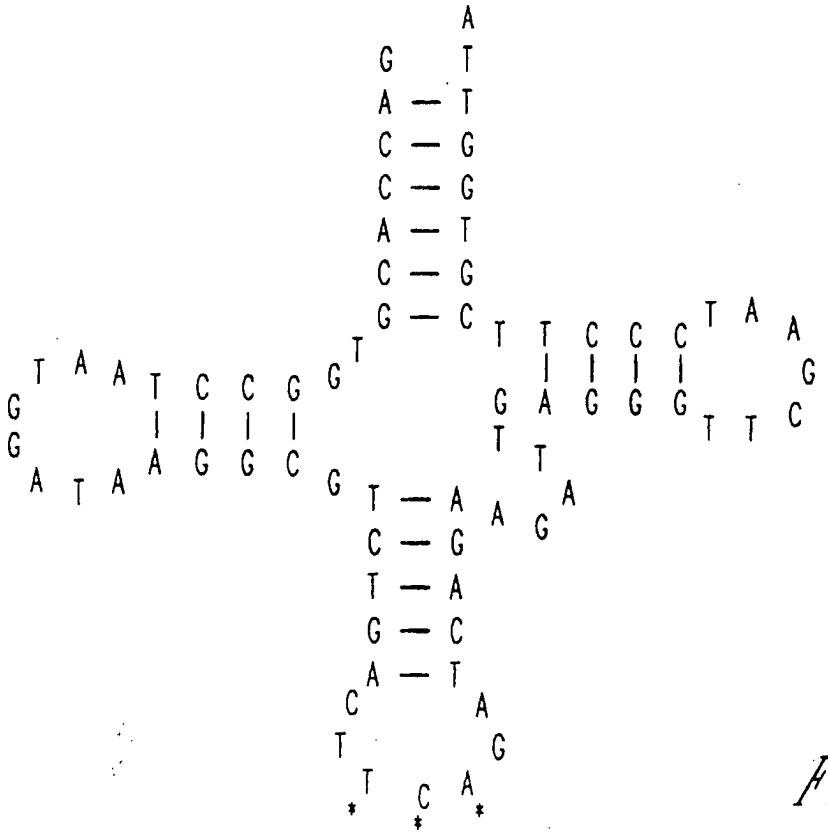


Fig. 14