(19)

SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 955509 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 955509

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/86
C12N 15/11
C12N 15/49
A61K 48/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **17.05.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.11.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.01.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **17.05.1994 PCT/US1994/005700**

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

17.05.1993 US 062465

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The Regengts of the University of,** 22nd Floor, 300 Lakeside-Drive Oakland, CA 94612-3550, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Wong-Staal, Flossie,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Yu, Mang,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Yamada, Osamu,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Ojwang, Joshua O.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • **Leavitt, Mark,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 • **Ho, Anthony,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

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

HIV-tartunnan ja AIDSin ribotsyymigeeniterapia

Ribozymgenterapi för HIV-infektion och AIDS

Ribotsyymigeeniterapia HIV-infektioon ja AIDS:iin

AIDS:ista, jonka nyt tiedetään olevan ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) aiheuttama, on tullut tärkein uhka kansanterveydelle maailmanlaajuisesti. Tämän sairauden lisäleviämisen estäminen on tärkein terveysprioriteetti Yhdysvalloissa ja monissa muissa maissa. Vaikka HIV varmistui AIDS:n aiheuttajaksi jo vuonna 1984, vain muutamia lääkeaineita tai rokotteita, jos niitäkään, on julkisesti saatavissa, joiden on osoitetty hoitavan tai estävän AIDS:ia. Tämä johtuu suureksi osaksi itse aiheuttajaviruksen monimuotoisuudesta.

HIV infektoi useita kehon kudoksia ja soluja. Lisäksi, tunkeuduttuaan soluun, virus voi "piileksiä" henkilön keskushermoston solussa usein vuosikausia ennenkuin sairauden oireet ilmaantuvat.

Kliininen taudinkulku HIV-infektoiduissa henkilöissä riippuu viruksen jatkuvasta ilmentymisestä uusissa infektoiduissa soluissa. Näin ollen jotkut tutkijat uskoivat, että tämä viruksen leviämisen etiologinen ilmenemismuoto voisi luoda perustan terapeuttisten anti-HIV-aineiden kehittämiselle. Itse asiassa nukleosidianalogit, jotka inhiboivat viruksen käänteistranskriptaasia, ovat osoittaneet jonkin verran kliinistä tehoa. Kuitenkin, näiden lääkeaineiden luontainen toksisuus ja lääkeresistenttien HIV-mutanttien väistämätön esiintulo hoidon aikana ovat poistaneet tämäntyyppisen lääkeaineen vakavasti otettavana terapeuttisena AIDS-lääkkeenä. Tutkimukset näin ollen jatkuvat uusien tehokkaiden terapeuttisten hoito-ohjelmien löytämiseksi.

Tämä keksintö koskee uutta terapeuttista anti-HIV-lääkettä ja siten AIDS-lääkettä, jolla poistetaan rajoitukset, jotka liittyvät tämänhetkisiin nukleotidipohjaisiin hoitomuotoihin AIDS:n estämiseksi ja hoitamiseksi.

Tämä keksintö koskee infektiivistä retrovirusta, johon on liitetty retroviruksen 5'- ja 3'-päiden pitkien toistosekvenssien (LTR-sekvenssien) väliin nukleiinihappo, joka

koodittaa anti-HIV-tyyppistä spesifistä ainetta pol III -promoottorin ohjauksessa. Keksintö koskee myös isäntäsoluja, jotka sisältävät tämän keksinnön mukaisia retrovirusvektoreita. Keksintö koskee lisäksi menetelmää HIV-viruksen replikaation häiritsemiseksi tai estämiseksi HIV:llä infektoidussa solussa. Menetelmä käsittää sen, että transduktoidaan infektoituneeseen soluun retrovirusvektori, joka sisältää nukleiinihappoa, joka koodittaa anti-HIV-tyyppistä spesifistä ainetta olosuhteissa, jotka suosivat vektorin transduktiota ja aineen pysyvää ilmentymistä solussa. Solut voidaan transduktoida retrovirusvektorilla myös ennen HIV-infektiota. Tämän suorituksen jälkeen HIV-infektio voidaan estää.

Kuvio 1. Kaavioesitys erilaisista plasmidi- ja retrovirusvektoreista, jotka sisältävät HIV-spesifisen ribotsyymigeenin "Rz-1" (ei piirretty oikeassa mitassa). Lähemmin yksityiskohtaisessa keksinnön kuvauksessa koskien kunkin plasmidin konstruointia.

Kuviot 2A-2C. anti-HIV-1-spesifisen ribotsyymin vaikutus HIV-1:n ilmentymiseen lyhytaikaisessa määrityksessä. Efektoriplasmidi (pHXB2gpt, jota kuvailee Ratner, L. *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses 3:57-69 (1987), sisällytetty tässä viitteenä) ja reportteriplasmidi (pC15CAT) kolmoistransfektoitiin HeLa-soluihin joko pUC19-plasmidin kanssa tai anti-HIV-1-ribotsyymin sisältävän plasmidin pβ-HR, pJT-HR tai pJV-HR kanssa erikseen suhteessa 1:10 μg (efektoriplasmidi:-ribotsyymiplasmidi). Kukin pylväistä on merkitty plasmidinsa mukaan. Kuvio 2A: Transfektoidut HeLa-solut otettiin talteen 48 tunnin kuluttua ja niille suoritettiin CAT-entsyymimääritys. TLC-palat laskettiin käyttäen nestetuikelaskuria ja tulokset on esitetty suhteessa kontrolliin. Kuvio 2B: Supernatantille suoritettiin p24-antigeenianalyysi ja arvot esitettiin suhteellisina osuuksina kontrollitasosta. Kuvio 2C: Kokonais-RNA eristettiin käyttäen pikaeristysmenetelmää (lähemmin jaksossa: keksinnön yksityiskohtainen kuvaus, jäljempänä). Kaksikymmentä mikrogrammaa kokonais-RNA:ta dot-blotattiin ja hybridisoitiin [α-^{32}P]UTP:llä sisäisesti leimatun HIV-1-spesifisen koettimen avulla. Kaista 1: RNA valmis-

tettuna pUC19/pHXB2gpt:llä transfektoiduista soluista ja kaista 2: RNA pJV-HR/pHXB2gpt:llä transfektoiduista soluista.

Kuvio 3. Riveittäin esitettynä HIV-1-isolaattien kohdejohtosekvenssit (SEKVENSSI ID NO:6- vastaavasti 12).

Kuviot 4A ja 4B. anti-HIV-1-spesifisen ribotsyymin vaikutus HIV-1 SF-2:n ilmentymiseen ja ribotsyymin ilmentyminen retrovirusvektoreissa. Kuvio 4A: Efektoriplasmidi (pSF-2) yhteistransfektoitiin kaksinkertaisesti tai kolminkertaisesti HeLa-soluihin ribotsyymin sisältävien retrovirusvektoreiden (0,5:10 µg, efektoriplasmidi:ribotsyymivektori) pMJF-1, pMJT, pMJV ja pMHR kanssa (pylväät 1, 3, 4 ja vastaavasti 5) tai ribotsyymigeenin sisältämättömän retrovirusvektorin pLRNL-2 kanssa (pylväs 2). 48 tunnin kuluttua solut otettiin talteen (lähemmin kohdassa keksinnön yksityiskohtainen kuvaus, jäljempänä) ja supernatantille suoritettiin p24-antigeenianalyysi. Kuvio 4B: Kokonais-RNA eristettiin HeLa-soluista, jotka oli transfektoitu plasmideilla pMJF-1, pLRNL-2 (vain vektori), pMJT, pMJV ja pMHR ja dot-blotattiin membraanille (lähemmin jaksossa keksinnön yksityiskohtainen kuvaus, jäljempänä) ja hybridisoitiin 5'-päästä radioleimatun ribotsyymispesifisen koettimen avulla. Dottien intensiteetti kvantitoitiin scan-yksikköinä "phosphori-imagerin" avulla (Molecular Dynamics, Kalifornia).

Kuviot 5A ja 5B. anti-HIV-1-spesifisen ribotsyymin vaikutus, ilmennettynä retrovirusvektoreissa, HIV-1 Eli - ja MN-kantojen ilmentymiseen lyhytaikaisessa määrityksessä. Efektoriplasmidi (pEli tai pMN) yhteistransfektoitiin kaksinkertaisesti tai kolminkertaisesti HeLa-soluihin ribotsyymin sisältävien retrovirusvektoreiden pMJT, pMJV ja pMHR kanssa (pylväät 2, 3 ja vastaavasti 4) tai retrovirusvektorin kanssa ilman ribotsyymigeeniä, pLRNL-2 (pylväs 1). Kuvio 5A: HIV-1 Eli:n kohdalla, 0,25:10 µg (efektoriplasmidi:ribotsyymivektori) yhteistransfektoitiin. Kuvio 5B: HIV-1 pMN:n kohdalla, 0,25:10 µg (efektoriplasmidi:ribotsyymivektori) yhteistransfektoitiin. 48 tunnin kuluttua solut otettiin talteen (lähemmin kohdassa keksinnön yksityiskohtainen kuvaus, jäljempänä)

ja supernatantille suoritettiin p24-antigeenianalyysi.

Kuviot 6A ja 6B esittävät HIV-1-spesifisen ribotsyymin ilmentymistä vakiintuneissa solulinjoissa 11 viikkoa (kuvio 6A) ja 25 viikkoa (kuvio 6B) transduktion jälkeen. Kokonais-RNA pysyvistä solulinjoista uutettiin hapan guanidiinitiosyanaatti-fenoli/kloroformi -uutolla käyttäen Chomczynski, P.:n ja Sacch, N.:n menetelmää, Anal. Biochem. 162:156 (1987), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Yksi µg kokonais-RNA:ta, käsittelyn jälkeen RNAasi vapaalla DNAasilla (RQ1 DNAasi:Promega), käytettiin templaattina käänteiskopiointiin. Käänteiskopiointiin yhdistetty PCR suoritettiin (94°C:ssa 1 minuutin ajan, 42°C:ssa 1 minuutin ajan, 72°C:ssa 1 minuutin ajan: 30 jaksoa) alukeparin Rib4 (5'-CAC, ACA, ACA, AGA, AGG-3') (SEKV. ID NO:1) ja Rib2 (5'-TAC, CAG, GTA, ATA, TAC, CAC-3') (SEKV. ID NO:2) kanssa Yamada, O. *et al.*:n menetelmän mukaisesti, J. Virol. Methods 27:203 (1990), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, paitsi että uuttovaihe lasijauheen kanssa jätettiin pois. PCR:n jälkeen käänteistranskription kanssa ja ilman sitä, 10 µg kutakin monistettua tuotetta elektroforesoitiin 3%:isilla alhaalla sulavilla agaroosigeeleillä (Boehringer) Tris-boraattipuskurissa (pH 7,2), ja Southern blottaus suoritettiin [^{32}P]-päätyleimatun Rib 3:n kanssa (5'-CAA, CCA, GAG, AAA, CAC, ACG, TT-3') (SEKV. ID NO:3). Ribotsyymin ilmentyminen infektoitumattomissa MLN6-, (ilman ribotsyymiä), MMJF-1-, MMJT-, JLNL6-, (ilman ribotsyymiä), JMJF-1- ja JMJT-soluissa osoitettiin. Ribotsyymin sisältävää retrovirusvektoriplasmidia (pMJT) käytettiin ribotsyymi-DNA:n positiivisena kontrollina. -RT:PCR suoritettiin ilman käänteistranskriptaasia. Monistetun tuotteen koko on 54 bp.

Kuvio 7 esittää Jurkat-solujen lisäkasvua, jotka ilmentävät HIV-1-spesifisen ribotsyymin. Parentaaliset Jurkat-solut (Jurkat-klooni 3.8) ja testisolulinjat jaettiin nelisarjaisiin, U-pohjaisten 96-kaivoisten levyjen kaivoihin tiheydessä 10^4 solua/100µl/kaivo. Kuhunkin kaivoon lisättiin sata µl RPMI 1640:tä, joka sisälsi lisäksi 10 % FBS:ää, joka sisälsi 1 µCi [^{3}H]-(metyyli)-tymidiiniä (NET-027, NEN). 48 tunnin

kuluttua solut otettiin talteen suodinpaperille. Suotimen radioaktiivisuus mitattiin tuikespektrometrissä (Beckman). Tulokset esitetään keskiarvoina ± keskihajonta (n=4).

Kuvio 8. Eri HIV-1-kantojen p24-antigeenin ilmentymisen inhibitio HIV-1-spesifisen ribotsyymin avulla. HIV-1-kantoja HXB2, MN, Eli tai J677-2 (kloonaamaton kliininen isolaatti) käytettiin infektoimaan Jurkat-soluja, jotka ilmensivät ribotsyymin (JMJF-1- ja JMJT-solut), ja Jurkat-kontrollisoluja, jotka oli transduktoitu retrovirusvektorilla ilman ribotsyymiä (JLNL6-solut) infektiotasolla M.O.I. 0,01 (tai 0,1 hitaammin kasvavalle kannalle J677-2). J677-2 siirrettiin kerran MT-4-soluihin eristämisen jälkeen PBMC:n yhteisviljelyllä AIDS-potilaasta ja normaalin PBMC:n kanssa. o JLNL6, ● JMJF-1, □ JMJT.

Kuvio 9. HIV-2-replikaation inhibition puuttuminen käytettäessä HIV-1-spesifistä ribotsyymiä. HIV-1 HXB2 tai HIV-2 KR tartutettiin Molt-4/8-soluihin, jotka ilmensivät ribotsyymiä (MMJF-1 ja MMJT) ja Molt-4/8-soluihin, jotka oli transduktoitu retrovirusvektorilla ilman ribotsyymiä (MLNL6) infektiotasolla M.O.I. 0,01 (HXB2) tai 0,001 nopeammin kasvavalle kannalla HIV-2 KR. o MLNL6, ● MMJF-1, □ MMJT. Näiden viruskantojen virusvalmisteiden infektiotiitteri ($TCID_{50}$) määritettiin käyttäen MT-2-soluja Yamada, O. *et al.*:n menetelmällä, AIDS Res. Hum. Retroviruses 4:287 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Soluja pestiin kahdesti RPMI 1640 -alustalla virusadsorption jälkeen 2 tunnin ajan ja ne suspendoitiin uudelleen RPMI 1640 -alustaan, johon oli lisätty 10 % FBS:ää, solutiheydessä 10^5 solua/ml. Näitä infektoituja soluja viljeltiin 6 päivää. Pieniä kasvuneste-eriä otettiin talteen 2 päivän välein ja p24- tai p26-antigeenien taso määritettiin HIV-1- tai SIV/HIV-2-antigeenipyynti-ELISA-testillä (Coulter).

Kuvio 10. Synsytiumin muodostuminen MLNL6- ja MMJF-1-soluissa 9. päivänä infektoinnin jälkeen. HIV-1 HXB2- tai MN-kantaa käytettiin tartuttamaan Molt-4/8-soluja, jotka ilmensivät ribotsyymiä (MLNL6 ja MMJF-1), M.O.I.-tasolla 0,01. Soluja

pestiin kahdesti RPMI 1640 -alustalla virusadsorption jälkeen 2 tunnin ajan ja ne suspendoitiin uudelleen RPMI 1640 -alustaan, johon oli lisätty 10 % FBS:ää, solutiheydessä 10^5 solua/ml. Solut jaettiin 2 päivän välein solutiheyteen $3x10^5$ solua/ml viidennestä päivästä lähtien infektoinnin jälkeen.

Kuvio 11. RT-aktiivisuuden inhibitio HIV-1/HXB2- tai HIV-1/MN-infektoiduissa Jurkat-soluissa, jotka ilmensivät HIV-1-spesifistä ribotsyymiä pitkäkestoisessa viljelyssä. HIV-1 HXB2 (A) tai MN (B) tartutettiin JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-soluihin M.O.I.-tasolla 0,01 vastaavasti. Soluja pestiin kahdesti RPMI 1640 -alustalla virusadsorption jälkeen 2 tunnin ajan ja ne suspendoitiin uudelleen RPMI 1640 -alustaan, johon oli lisätty 10 % FBS:ää, solutiheydessä 10^5 solua/ml. Viidentenä päivänä ja sen jälkeen solut jaettiin 2 päivän välein solutiheyden pitämiseksi tasolla $3x10^5$ solua/ml. Kasvustosupernatanteista testattiin HIV RT -aktiivisuus. Lyhyesti esitettynä, 0,5 ml supernatanttien rinnakkaiseriä sekoitettiin 0,24 ml:aan 30%:ista polyetyleeniglykoli 6000:a ja 20 ml:aan 4 M NaCl:a. Mikrosentrifugoinnin jälkeen nopeudessa 14000 rpm (kierrosta minuutissa) 30 minuutin ajan supernatantit poistettiin ja 10 ml kutakin TNE-liuosta (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) lisättiin putkiin. Sekoittamisen jälkeen lisättiin 40 ml seosta, joka sisälsi 250 mM Tris-HCl:a pH 7,8; 250 mM $MgCl_2$:a; 250 mM KCl:a; 25 mM ditiotreitolia; 1,25 mg/40 ml poly(rA) p(dT)12-18:a (Pharmacia); 2,5 mCi/0,25 nmoolia/40 ml [^{3}H]-dTTP:a (NEN), ja inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunti. Kymmenen ml 0,2 M EDTA:aa lisättiin. Seosnäyte (50 ml) sijoitettiin sen jälkeen DE81-paperille (Whatman), ilmakuivattiin, pestiin viisi kertaa 5%:isella natriumpyrofosfaatilla ja kahdesti vielä vedellä. Paperi kuivattiin sen jälkeen ja radioaktiivisuus mitattiin tuikespektrometrillä (Beckman). Radioaktiivisuutta ei havaittu, kun poly(dA)poly(dT):tä käytettiin poly(rA)poly(dT):n asemesta. o JLNL6, ● JMJF-1, □ JMJT.

Kuvio 11 (liite). HIV-1-spesifisen ribotsyymin ilmentyminen pysyvissä solulinjoissa infektoinnin jälkeen. Ribotsyymin ilmentymistä Jurkat-soluissa JMJT ja JMJF-1 23. päivänä

infektoinnin jälkeen HIV-1/MN:llä tutkittiin kuviossa 6 kuvaillun RT PCR:n avulla. Infektoimattomia JLNL6-soluja käytettiin negatiivisena kontrollina. PCR ilman käänteistranskriptiota suoritettiin myös eikä monistunutta tuotetta havaittu.

Kuvio 12. HIV-1-spesifistä ribotsyymiä ilmentävien Jurkat-solujen uudelleeninfektointi (tartutustestaus, challenge) "escape"-viruksella ("selviytyjä"viruksella). JMJF-1-solujen kasvustosupernatantteja, jotka solut oli infektoitu HIV-1 HXB2 - tai MN-kannoilla, otettuna talteen 35. ja vastaavasti 23. päivinä, kuviossa 11 esitetyssä kokeessa, käytettiin JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-solujen uudelleeninfektointiin. Infektointitaso M.O.I. oli 0,0004 ja 0,01 HXB2 :lla ja vastaavasti MN:llä. Koska HXB2:n tartuntakyky (infektiivisyys), joka oli kerätty 35. päivänä, oli hyvin alhainen, istutettavaa M.O.I.-tasoa ei voitu säätää 0,01:ksi. p24-taso määritettiin HIV-1-antigeenipyynti-ELISA-testillä (Coulter). o JLNL6, ● JMJF-1, □ JMJT.

Kuvio 13. HIV-1-spesifisen ribotsyymin vaikutus provirus-DNA:n synteesiin JMJT-soluissa varhain HIV-1:llä infektoinnin jälkeen. HIV-1-proviruksen DNA-taso HXB2-infektion aikaisessa vaiheessa JLNL6- ja JMJT-soluissa määritettiin puolikvantitatiivisesti sarjatoimisella kaksois-PCR:llä. Solujen genominen DNA uutettiin JLNL6- ja JMJT-soluista 18 tuntia infektoinnin jälkeen HIV-1 HXB2:lla menetelmällä, jossa käytetään proteinaasi K:ta ja fenoli/kloroformia. Yksi µg kutakin DNA-uutetta käytettiin templaattina 1. PCR:ään. Reaktioseoksen koostumus sekä ensimmäisessä että toisessa PCR:ssä oli 50 mM Tris-puskuria (pH 8,3); 6 mM $MgCl_2$:a; 40 mM KCl:a; 1 mM ditiotreitolia; 200 mM kutakin ryhmästä dATP, dGTP, dTTP ja dCTP; 2,5 yksikköä Taq-polymeraasia ja 1 mM kutakin aluketta (Promega). Alukepareja HIV-1 LTR:lle käytettiin HIV-1-DNA:n monistamiseksi (monistettu tuote sisältää kohdesekvenssin ribotsyymille). Ensimmäinen PCR suoritettiin (94°C:ssa 1 minuutti, 54°C:ssa 1 minuutti, 72°C:ssa 1 minuutti: 30 jaksoa) alukeparin SK29 ja GK2 kanssa (5'-CGG, CGG, ATC, CCG, GGC, GCT, TCA, GCA, AGC, CGA-3') (SEKV. ID NO:4). Alukepari

β-globiinille, joka on PC03/GH21 sisäisenä kontrollina, lisättiin samoihin reaktioputkiin ajanhetkellä, joka oli ensimmäisen PCR:n 10. jakson jälkeen. Toista PCR:ää varten lisättiin 1/10 tilavuus ensimmäistä PCR-tuotetta ja monistaminen suoritettiin (30 jaksoa) alukepareilla SK29/SK30, Ou, C-Y. *et al.*, Science 239:295 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, ja RS06 (Saiki, R. *et al.* Science 239:487 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä,/GH21. Kymmenen µl kutakin toisen PCR:n tuotetta otettiin talteen joka viidennellä jaksolla ja monistettu tuote ilmaistiin geelielektroforeesin ja Southern blot -analyysin avulla. Southern blot -analyysi suoritettiin erikseen hybridisaation avulla [^{32}P]-päätyleimatun SK31:n kanssa (Ou, C-Y. *et al.*, edellä, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) tai RS06:n kanssa HIV-1:n tai vastaavasti β-globiinin DNA:lle. Monistetun tuotteen koko erityisesti HIV-1:llä on 105 emäsparia ja β-globiinilla 204 emäsparia. Detektiotulokset eri jaksoissa kerätyille monistetuille tuotteille on esitetty.

Transduktoitujen/valikoitujen ihmisen perifeerisen veren lymfosyyttien HIV-1:llä tartuttaminen (challenge). Ihmisen PBMC:t eristettiin verestä Ficoll-Hypaque-sentrifugoinnin avulla ja maljattiin tiheydessä 1x10^6 solua/ml RPMI-alustoihin, jotka sisälsivät 10% vasikan sikiön seerumia, 5 µg/ml PHA-P:tä ja 20 U/ml IL-2:ta. Kahden päivän inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa, solut sentrifugoitiin ja pestiin ennen transduktiota. Suodatettuja supernatantteja pakkaavista PALNL-6- tai PAMJT-solulinjoista inkuboitiin 37°C:ssa 4-6 tuntia 3x10^6 stimuloitujen PBMC:iden kanssa 4 µg/ml polybreenin kanssa. PBMC:t pestiin ja viljeltiin yli yön alustassa RPMI + 10% FCS, 20 U/ml IL-2 tiheydessä 1x10^6/ml. Transduktio toistettiin päivittäin 3 päivän ajan. Solut valikoitiin alustassa RPMI + 10% FCS, 20 U/ml IL-2 400 µg/ml G418:n kanssa 8 päivän ajan, jota seurasi 3 päivän viljely ilman G418:ta. Kontrollisolut, joita ei oltu altistettu pakkaavan linjan supernatanteille, eivät selvinneet elossa tässä menettelyssä, määritettäessä trypansinivärieksluusion avulla. Valikoituja soluja (2x10^5) infektoitiin 2 tunnin ajan (M.O.I. = 0,01), pestiin kerran alustassa RPMI + 10% FCS, 20 U/ml IL-2 ti-

heydessä $1x10^6$/ml. Puolet kasvualustoista otettiin talteen ja korvattiin tuoreilla alustoilla 2 päivän välein. Virustuotantoa seurattiin antigeenipyynti (p24) -ELISA:n avulla (Coulter). LNL-6 ja MJT transduktoituja/valikoituja solulinjoja merkitään TLNL:llä ja vastaavasti TMJT:llä.

Kuvio 15. Kaavioesitys retrovirusvektorirakenteista, jotka ilmentävät monikohderibotsyymejä (ei piirretty oikeaan mittaan). Tarkemmin kohdassa keksinnön yksityiskohtainen kuvaus.

Kuvio 16. Ribotsyymin vaikutus proviruksen DNA:n synteesiin JMJT-soluissa infektion aikaisessa vaiheessa HIV-1 HXB2:lla. HIV-1:n proviruksen DNA-tasot 6 tuntia infektoinnin jälkeen HXB2:lla JLNL6- ja JMJT-soluissa määritettiin puolikvantitatiivisesti sarjatoimisella kaksois-PCR:llä. Detektiotulokset monistetuista tuotteista kerättynä 15, 20, 25 ja 30 jaksoista toisessa PCR:ssä esitettiin. Erilaisia pSF-2-määriä (0,05-5 fg) monistettiin käyttäen samoja alukkeita ja olosuhteita (läh. jäljempänä) HIV-1 DNA:n suhteellisten määrien arvioimiseksi.

Kuvio 17. RT-PCR-tuotteiden Southern blot -analyysi transduktoiduista/valikoiduista viljelmistä. - ja + osoittavat käänteistranskriptaasin läsnäolon RT-PCR-reaktiossa. RNA:t eristetään kohteista: MMJT, Molt4/klooni 8, joka on pysyvästi transduktoitu MJT:llä; MJT ja LNL, PBMC:t, jotka on transduktoitu joko MJT:llä tai LNL-6:lla, valikoitu G418:ta sisältävissä alustoissa 8 päivän kuluessa ja viljelty sen jälkeen 1 viikon ajan ilman G418:ta.

Kuviot 18A ja 18B. Valikoitujen viljelmien (donori 054) kasvu ja CD4/CD8-ominaisuudet. A: LNL-6:n kasvu △, ja MJT:n kasvu □, jotka ovat transduktoituja viljelmiä G418-valikoinnin jälkeen. B: CD4+□- ja CD8+■-solujen prosenttisuudet valikoinnin jälkeen määritettynä FACS:n avulla.

Kuviot 19A-19D. Transduktoitujen/valikoitujen viljelmien tartutus (challenge) HIV-1:llä ja HIV-2:lla. A,C: HIV-1HXB2 ja B: HIV-2KR virustuotannot transduktoiduissa/valikoiduissa

viljelmissä; LNL-6△, MJT□. Viljelmät paneeleissa A ja B (donori 054) infektoitiin rinnakkaisesti HIV-1:llä tai HIV-2:lla. Paneeli C edustaa transduktoitujen/valikoitujen viljelmien donorista 029 pitkäaikaista HIV-1-tartutusta. D: Kliinisen HIV-1-isolaatin tuotanto transduktoiduissa/valikoiduissa viljelmissä. Donori 052 + kliininen isolaatti F (LNL-6△, MJT□); donori 061 + kliininen isolaatti G (LNL-6▲, ja MJT■).

Kuviot 20A ja 20B. A: Kaavioesitys retrovirusvektorirakenteista. Vektorit, joissa ribotsyymiä ohjasivat sisäiset pol III -promoottorit, konstruoitiin seuraavasti: fragmentti, joka sisälsi ihmisen $tRNA_{val}$:n tai adenovirus VA1:n pol III -promoottori-ribotsyymikasetin (mukaan lukien lopetussignaalin) (lähemmin Ojwang *et al.* P.N.A.S., U.S.A. 89:10809 (1992), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) liitettiin retrovirusvektoriin pLNL6 HindIII-kohdassa, neo-geenin alapuolella kuten on osoitettu. Tuloksena saadut retrovirusvektorit merkittiin pMJT:llä (jossa on tRNA-promoottori) ja pMJV:llä (jossa on VA1-promoottori). Retrovirusvektorit pakattiin vakiomenetelmällä käyttäen ekotrooppista solulinjaa psi2 ja amfotrooppista solulinjaa PA317. Kaikkien kolmen vektorin tiitterit määritettiin tasolle suunnilleen 10^5 CFU/ml käyttäen 208F-soluja. B: Ribotsyymin ilmentämismääritys RNA:n PCR:n avulla. Kokonais-RNA kunkin näytteen 10 pesäkkeestä uutettiin hapan guanidiinitiosyanaatti-fenoli/kloroformi-uuttomenetelmällä. 0,1 μg kokonais-RNA:ta käsittelyn jälkeen deoksiribonukleaasi I:llä (RQ1 DNAasi; Promega) käytettiin templaattina käänteistranskriptioon (RT). Polymeraasiketjureaktio (PCR), RT:n kanssa, suoritettiin (94°C:ssa 1 minuutti, 45°C:ssa 1 minuutti, 72°C:ssa 1 minuutti; 30 jaksoa) alukeparilla Rib 4 (5′-CAC, ACA, ACA, AGA, AGG-3′) (SEKV. ID NO:1) ja Rib 2 (5′-TAC, CAG, GTA, ATA, TAC, CAC-3′) (SEKV. ID NO:2). PCR:n jälkeen RT:n kanssa tai ilman sitä, 10 μl kutakin monistettua tuotetta määritettiin dot blot -määrityksellä (pisteblottaus). Hybridisaatio suoritettiin [^{32}P]-päätyleimatun kolmannen oligonukleotidin Rib 3:n kanssa (5′-CAA, CCA, GAG, AAA, CAC, ACG, TT-3′) (SEKV. ID NO:3), joka oli peräisin ribotsyymin sisäisestä sekvenssis-

tä). a=MJT, b=MJV, c=LNL6. d=erilaisia kontrolleja: d1 ja d2, transduktoimattomia kanta/esisoluja; d3, yhdistelmä b1-b5 (ilman RT:tä); d4, yhdistelmä b6-b10 (ilman RT:tä); b5, yhdistelmä a1-a5 (ilman RT:tä); d6, yhdistelmä a6-a10 (ilman RT:tä). d9 ja d10, $2x10^3$ MJT transduktoituja Jurkat T-soluja positiivisina kontrolleina.

Kuvio 21. Retrovirusvektorilla transduktoitujen kanta/esisolujen pesäkesuhdevertailu. Pesäkesuhde laskettiin jakamalla muodostuneiden pesäkkeiden kokonaismäärä (määrät taulukon II alaosassa) maljattujen kantasolujen määrällä (5000). Virheviivat edustavat vaihtelua pesäkemäärissä saatuna kolmesta kokeesta käyttäen kanta/esisoluja, jotka on eristetty toisistaan riippumattomien luovuttajien napaverestä.

Kuviot 22A-22C. A: HIV-1:n replikaation inhibitio ribotsyymin vaikutuksesta kantasoluista peräisin olevissa makrofagisoluissa. Transduktoituja kanta/esisoluja säilytettiin 15 ml:n viljelyputkissa (delta culture) IMDM IL-3:n, IL-6:n, SCF:n kanssa 3 viikon ajan. Viljelmät asetettiin sen jälkeen ihmisen seerumeilla pinnoitetuille levyille (Costar 24-kaivoinen #3524) 2-4 tunniksi ja kiinnittymättömät solut poistettiin. Viljelmiä säilytettiin sen jälkeen RPMI-alustassa + 10% FCS, 10% ihmisen normaali seerumi ja GM-CSF (1 ng/ml). 3-4 jatkoviikon jälkeen kantasoluista kasvuolosuhteissa saadut makrofagi/monosyytit tartutettiin käyttäen makrofagitrooppista kantaa HIV-1/Bal. Soluviljelysupernatantit otettiin talteen esitettyinä ajankohtina ja standardi HIV p24 -ELISA suoritettiin. B: Transduktoitujen kantasolujen kasvukäyrät. LNL6, MJT ja MJV retrovirustransduktoituja kantasoluja viljeltiin olosuhteissa, joita on kuvailtu tämän kuvion selityksessä A. Solujen kokonaismäärät laskettiin osoitettuina eri ajankohtina. 0,4%:ista trypansinistä (Gibco BRL) käytettiin kuolleiden solujen poissulkemiseksi mikroskooppilaskennoissa. C: Ribotsyymin pitkäaikainen ilmentyminen transduktoiduista kantasoluista peräisin olevissa makrofageissa. Kokonais-RNA kustakin noin 10^4 makrofagisolua sisältävästä näytteestä (noin 2 kuukautta kan-

tasolutranduktion jälkeen) uutettiin hapan guanidiinitiosyanaatti-fenoli/kloroformi-uuttomenetelmällä. 0,1 µg kokonais-RNA:ta käytettiin templaattina käänteistranskriptioon (RT), kun läsnä oli joko Rib 4 (LTR transkripti-spesifinen, kaistat 2 ja 5) tai Rib 2 (pol III transkripti-spesifinen, kaistat 3 ja 6). PCR suoritettiin lisäämällä toinen aluke kuviossa 1B kuvailluissa reaktio-olosuhteissa. PCR:n jälkeen RT:n kanssa (kaistat 1, 2, 3, 5 ja 6) tai ilman RT:tä (kaistat 4 ja 7) 10 µl (10%) kutakin monistettua tuotetta elektroforesoitiin 3%:isilla alhaalla sulavilla agaroosigeeleillä (Boehringer) Tris-boraattipuskurissa (pH 7,2) ja Southern blot -analyysi suoritettiin käyttäen [^{32}P]-päätyleimattua kolmatta koetinta Rib 3, joka oli peräisin ribotsyymin sisäalueen sekvenssistä. Kaistat 2, 3, 4 = MJT; Kaistat 5, 6, 7 = MJV, kaista 1 = LNL-6, kaista 8 on DNA:n PCR-tuotteen positiivinen ribotsyymin kokokontrolli käyttäen plasmidia pMJT templaattina. Kaikilla kontrollikaistoilla (1, 4, 7 ja 8) sekä Rib 2- että Rib 4 -alukkeet lisättiin samaan aikaan käänteistranskriptiovaiheessa.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Geeniterapia on kiinnostava uusi modaliteetti ihmisen sairauksien hoitamiseksi. Geenivirheiden korjaamisen lisäksi, liittämällä toiminnallisia sellulaarisia geenejä, geeniterapia voi myös pyrkiä stimuloimaan immuunivastetta tuumorisoluja tai virusinfektoituneita soluja vastaan, tai inhiboimaan tartuntakykyisten patogeenisten agenssien ilmentymistä/toimintaa.

Ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) identifioinnista lähtien, hankitun immuunikatosyndrooman (AIDS) aiheuttavana agenssina, on ollut yhteisenä pyrkimyksenä kehittää toimintamalleja, jotka inhiboivat viruksen replikaation. Teoriassa HIV-replikaation inhibition tulisi olla saavutettavissa häiritsemällä erilaisia ratkaisevia vaiheita viruksen elinkierrossa, mukaan lukien viruksen tunkeutuminen, käänteistranskriptio, integroituminen, transkriptio, RNA:n prosessointi, trans-aktivaatio, translaatio, pakkaantuminen ja viruspartikkeleiden

vapautuminen. Tosiasiassa HIV:n elinkierto antaa käyttöön monia houkuttelevia vaiheita mahdolliseen puuttumiseen geeniterapian avulla, mukaan lukien se, että liitetään HIV-infektoituneisiin soluihin transdominantteja mutanttisia gag- ja vaippageenejä, jotka voisivat häiritä HIV-viruksen tunkeutumista, TAR-ansoja HIV:n transkription ja trans-aktivaation inhiboimiseksi, RRE-ansoja ja transdominantteja REV-mutantteja HIV RNA:n prosessoitumisen estämiseksi, muutamia esimerkkejä esittäen.

Antisense (RNA tai DNA)-nukleotideja on käytetty virus-mRNA:n hyväksikäytön kohdistamiseksi ja estämiseksi HIV-1:n elinkierrossa. Antisense-inhibition stoikiometrinen luonne asettaa kuitenkin rajoituksia tähän lähestymistapaan intrasellulaarisen HIV-infektion ja -replikaation inhiboimiseksi.

HIV-tyyppispesifisten ribotsyymien osoitetaan tässä yhteydessä voittavan perinteisen antisense-tekniikan rajoitukset tuhota HIV-infektio ja -replikaatio soluissa. Ribotsyymit ovat RNA-molekyylejä, joilla on RNA:n katalyyttistä aktiivisuutta. Katalyyttinen kohta katkaisee spesifisen kohdan kohde-RNA:ssa; katkaistujen RNA-molekyylien määrä on suurempi kuin mitä on ennustettu perustuen stoikiometriaan.

Tässä yhteydessä käytettynä, "ribotsyymien" on tarkoitus sisältää RNA-molekyylejä, jotka sisältävät antisense-sekvenssejä spesifistä tunnistusta varten ja RNA:ta pilkkovaa entsymaattista aktiivisuutta. Katalyyttinen juoste katkaisee spesifisen kohdan kohde-RNA:ssa suuremmalla kuin stoikiometrisellä pitoisuudella.

Kaksi ribotsyymi"tyyppiä" ovat tässä keksinnössä erityisen käyttökelpoisia, vasaranpääribotsyymi (Rossie, J.J. *et al.*, Pharmac. Ther. 50:245-254 (1991) sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, ja hiusneularibotsyymi (Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res. 18:299-304 (1990) ja US-patentti 5 254 678, julkaistu 19. lokakuuta, 1993, kumpikin sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä). Koska sekä vasaranpää- että hiusneularibotsyymit ovat katalyyttisiä molekyylejä, joilla on an-

tisense- ja endoribonukleotidaasiaktiivisuutta, ribotsyymiteknologiasta on tullut potentiaalisesti vahva lisä antisense-lähestymiselle geenin inaktivaatioon. Kuten jäljempänä yksityiskohtaisesti esitetään, vasaranpääribotsyymien ja hiusneularibotsyymin, jotka on kohdistettu HIV-1 RNA:ta vastaan, intrasellulaarisen ilmentymisen on osoitettu antavan merkittävän resistenssin HIV-1-infektiolle.

Tämä ribotsyymi voi olla vasaranpääribotsyymi (esimerkiksi, jota Forster ja Symons (1987) Cell 48:211-220; Haseloff ja Gerlach (1988) Nature 328:596-600; Walbot ja Bru ening (1988) Nature 334:196; Haseloff ja Gerlach (1988) Nature 334:585, kukin sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, ovat kuvailleet, tai hiusneularibotsyymi (jota esimerkiksi ovat kuvailleet Haseloff *et al.*, US-patentti 5 254 678, julkaistu 19. lokakuuta, 1993 ja Hempel *et al.*, EP-patentti 0 360 257, julkaistu 26. maaliskuuta, 1990, kukin sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä), joilla on kyky spesifisesti kohdentaa, pilkkoa ja inaktivoida HIV RNA.

Sekvenssitarve hiusneularibotsyymille on mikä tahansa RNA-sekvenssi, joka käsittää jakson NNNG/CN*GUCNNNNNNNN (SEKV. ID NO:15) (jossa N*G on pilkkomiskohta, ja jossa N on jokin ryhmästä G, U, C tai A). Sekvenssitarve pilkkomiskohdassa vasaranpääribotsyymille on mikä tahansa RNA-sekvenssi, joka käsittää jakson NUX (jossa N on jokin ryhmästä G, U, C tai A ja X on C, U tai A), joka voidaan kohdentaa. Sen mukaisesti, sama kohde hiusneulajohtosekvenssin GUC alueella on käyttökelpoinen vasaranpääribotsyymille. Lisänukleotidit vasaranpääribotsyymille tai hiusneularibotsyymille määräytyvät reunakohdenukleotidien ja vasaranpääkonsensussekvenssin kautta.

Cech *et al.* (US-patentti 4 987 071, julkaistu 22. tammikuuta, 1991) on esittänyt tiettyjen synteettisten ribotsyymien valmistuksen ja käytön, joilla on endoribonukleaasiaktiivisuutta. Nämä ribotsyymit pohjautuvat Tetrahymenan ribosomaalisen RNA:n itsesilmukoitumisreaktion ominaisuuksiin ja edellyttävät kahdeksan emäsparia sisältävää kohdepaikkaa.

Endoribonukleaasiaktiivisuuden optimilämpötilaksi ilmoitetaan 50°C. Pilkonnasta syntyvät fragmentit sisältävät 5'-pään fosfaattiryhmiä ja 3'-pään fosfaattiryhmiä ja vapaan guanosiininukleotidin liitettynä katkaistun RNA:n 5'-päähän. Päinvastaisesti, tämän keksinnön mukaiset ribotsyymit hybridisoituvat tehokkaasti kohdesekvensseihin fysiologisissa lämpötiloissa, mikä tekee niistä sopivia in vivo -käyttöön, ei pelkästään tutkimusvälineinä (lähemmin palsta 15, rivit 18-42 julkaisussa Cech *et al.*, US-patentti 4 987 071).

Tämän keksinnön mukaisia ribotsyymejä ja ribotsyymejä koodittavaa DNA:ta, joita jäljempänä kuvaillaan yksityiskohtaisemmin, voidaan syntetisoida kemiallisesti käyttäen alalla hyvin tunnettuja menetelmiä. (Esimerkiksi Promegan suosittamien toimintaohjeiden mukaisesti, Madison, Wis., USA, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä). Ribotsyymit voidaan valmistaa myös DNA-molekyylistä (joka transkriptiossa tuottaa RNA-molekyylin), joka on toimivasti kytketty RNA-polymeraasin promoottoriin, esim., T7 RNA -polymeraasin tai SP6 RNA -polymeraasin promoottoriin. Tämä keksintö koskee sen mukaisesti myös nukleiinihappomolekyyliä, so., tämän keksinnön mukaisia ribotsyymejä koodittavaa DNA:ta tai cDNA:ta. Kun vektori sisältää myös RNA-polymeraasipromoottorin toimivasti kytkettynä DNA-molekyyliin, ribotsyymi voidaan valmistaa in vitro inkuboitaessa RNA-polymeraasin ja nukleotidien kanssa. Erillisessä suoritusmuodossa DNA liitetään ekspressiokasettiin tai transkriptiokasettiin, joita ovat kuvailleet Cotten ja Birnstiel (1989) EMBO J. 8(12):3861-3866 ja Hempel *et al.*, Biochemistry 28:4929-4933 (1989) tai Yu *et al.*, P.N.A.S. 90:6340-6344 (1993), kukin sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Molekyylibiologian menetelmien yksityiskohtaisempi käsittely on esitetty julkaisussa Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Synteesin jälkeen RNA-molekyyli voidaan modifioida ligaation avulla DNA-molekyyliin, jolla on kyky stabiloida ribotsyymi ja tehdä se resistentiksi RNAasille. Ribotsyymi voidaan vaihtoehtoisesti modifioida fosfotioanalogiksi käytettäväksi liposomiluovutussysteemeissä. Tämä modifikaatio tekee ribotsyymistä

resistentin myös endonukleaasiaktiivisuudelle.

DNA voi olla myös prokaryoottisessa tai eukaryoottisessa soluviljelmässä tai organismin soluissa. Sopivia prokaryoottisia ja eukaryoottisia soluja voidaan transfektoida sopivan siirtovektorin avulla, joka sisältää tämän keksinnön mukaista ribotsyymiä koodittavan DNA-molekyylin. Kun DNA-molekyyli on toiminnallisesti liitetty promoottoriin RNA:n kopiointia varten, RNA voidaan valmistaa isäntäsolussa, kun isäntäsolua viljellään sopivissa olosuhteissa, jotka suosivat DNA-molekyylin kopiointia. Vektori voi olla, niihin rajoittumatta, plasmidi, virus, retrotransposoni tai kosmidi. Esimerkkejä sellaisista vektoreista esitetään US-patentissa 5 166 320, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Sopiva adenovirusvektori kuten adenokytkeinen vektorityyppi 1 ("AAV-1") tai adenokytkeinen vektorityyppi 2 ("AAV-2") (lähemmin Chatterjee *et al.*, (1992) Science 258:1485-1488, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) on erityisen käyttökelpoinen. Geeniterapiamenetelmät ovat alalla hyvin tunnettuja, lähemmin esimerkiksi, Larrick, J.W. ja Burck, K.L. Gene Therapy: Application of Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York (1991) ja Kreigler, M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1990), kukin sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Tämä keksintö koskee myös pol III -transkriptiokasettia, joka sisältyy vektoreihin pMJV ja pMJT. Näissä kaseteissa on jäljempänä luetellut sekvenssit:

pMJT

5'-AAG CTT TGT AAC CGT TGG TTT CCG TAG TGT AGT GGT TAT CAC GTT CGC CTC ACA CGC GAA CGG TCC CCG GTT CGA AAC CGG GCG GAA ACA GGA TCC ... (vieras geeni.insertti) ... ACG CGT TTT TGC ATT TTT CTG CAG GCA TGC AAG CTT-3' (SEKV. ID NO:17); ja

pMJV

5'-ATC GAT AAG CTA ATT CGA GAG CCT GTA AGC GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG ATA AAT TCG CAA GGG TAT CAT GGC GGA CGA CCG GGG TTC GAA CCC CGG ATC C ... (vieras geeni-insertti) ... ACG CGT TTT TGC ATT TTT CTG CAG GCA TGC AAG CTT-3' (SEKV. ID NO:18).

Keksintö koskee tässä yhteydessä myös vektoria, joka sisältää pol III -transkriptiokasetin ja vieraan geenin. Tässä yhteydessä käsitellään myös isäntäsoluja ja ilmentämismenetelmiä, joissa käytetään näitä transkriptiokasetteja. Tämä transkriptiokasetti on käyttökelpoinen geenien tai DNA-sekvenssien ilmentämiseen eikä sitä ole tarkoitettu rajoittumaan tässä esille tuotujen HIV-ribotsyymien ilmentämiseen.

Ribotsyymien tuottamiseksi vektorin avulla, ribotsyymejä koodittavat nukleotidisekvenssit asetetaan voimakkaan promoottorin ohjaukseen, esim., lav-, myöhäinen SV40-, aikainen SV40- tai lambda-promoottoreiden ohjaukseen. Ribotsyymejä tuotetaan sitten suoraan siirtovektorista <u>in vivo</u>.

Erillisessä suoritusmuodossa virusvektori on retrovirus, kuten ei-virulentti vaccinia-pohjainen virusvektori tai Moloneyn hiirileukemiavirus. Sopiva retrovirusvektori sellaiseen geeniterapiaan on itsereplikoituva retrovirus, jonka 3'- ja 5'-päiden välisten pitkien terminaalisten retrovirustoistosäätelyjaksojen (LTR, long terminal repeat) väliin on liitetty vieras nukleiinihapposekvenssi (DNA tai cDNA) promoottorin ohjauksessa, esimerkiksi retroviruksen LTR-promoottorin tai liitetyn pol III -promoottorin ohjauksessa, kuten ihmisen $tRNA^{Val}$-promoottorin tai adenoviruksen VA1-promoottorin. Retrovirusvektori ilmentää sen jälkeen pysyvästi ribotsyymin isäntäsolussa.

Eräs tämän keksinnön mukainen näkökohta koskee retrovirusvektoria, jota voidaan käyttää HIV:n läsnäolon ilmaisuun <u>in vitro</u> potilasnäytteestä, tai kudosnäytteiden puhdistamiseksi HIV:stä ennen infuusiota potilaaseen. Käytettäessä <u>in vitro</u> detektiosysteeminä, solunäyte, jonka epäillään sisältävän viruksen, poistetaan nisäkkäästä. "Nisäkkäällä" tarkoitetaan,

niihin rajoittumatta, kädellisiä, hiiriä ja rottia ja ihmispotilaita. Retrovirusvektorit transduktoidaan soluihin ja soluja kasvatetaan sen jälkeen. Soluista eristetystä nukleiinihaposta tutkitaan sen jälkeen (hybridisaatioanalyysin avulla) HIV-fragmentin läsnäolo, joka ei ole läsnä, kun solu ei ole kosketuksissa ribotsyymin sisältävän retrovirusvektorin kanssa. Ribotsyymispesifisen fragmentin läsnäolo on positiivinen osoitus HIV:n läsnäolosta. Tämä voidaan ilmaista käyttämällä määrityksessä leimoja kuten radioisotooppeja tai entsyymejä. In vivo retrovirusvektoreita voidaan käyttää geeniterapiassa HIV-infektiota ja -replikaatiota vastaan. Tämän keksinnön mukainen retrovirusvektori on tartuntakykyinen retrovirusvektori, jonka 5'- ja 3'-päiden pitkien terminaalisten retrovirustoistosäätelyalueiden (LTR) väliin on liitetty vieras nukleiinihapposekvenssi (DNA, RNA tai cDNA), pol III -promoottorin ohjauksessa. Retrovirusvektori ilmentää sen jälkeen pysyvästi vieraan geenituotteen isäntäsolussa. Tässä yhteydessä käytettynä ilmaus "tartuntakykyinen" tarkoittaa, että retrovirusvektorilla on kyky infektoida, integroida ja ilmentää vieras nukleotidisekvenssi. Vain kuvaamistarkoitusta varten, tämän keksinnön mukaiseen retrovirusvektorirakenteeseen käyttökelpoinen retrovirus käsittää Moloneyn hiiri/rottaleukemiaviruksen, HIV-1:n ja HIV-2:n sisältävät retrovirusvektorit. Vieras nukleiinihappo käsittää, mutta ei ole rajoittunut siihen, nukleiinihaposekvenssin, joka koodittaa anti-HIV-tyyppistä spesifistä agenssia kuten anti-HIV-anti-sensemolekyyliä tai ribotsyymiä, joka pilkkoo spesifisesti HIV:n tai HIV:n säätelysekvenssejä kuten TAR:n.

Yhdessä suoritusmuodossa nukleiinihapposekvenssi koodittaa ribotsyymiä, joka on spesifinen HIV-tyypin 1 tai HIV-tyypin 2 virukselle. Yhdessä erityisessä suoritusmuodossa retrovirusvektorin osoitetaan ilmentävän ribotsyymiä, joka pilkkoo spesifisesti erilaisia HIV-tyypin 1 kantoja. Yksi HIV-1-tyypin spesifinen ribotsyymi pilkkoo spesifisesti konservoituneen sekvenssin HIV-1-viruksessa, joka tavataan erilaisten HIV-1-kantojen johtosekvenssin alueella mutta ei HIV-2-kantojen.

Toinen HIV-1-tyypin spesifinen ribotsyymi kohdentuu HIV-genomin 3'-päähän. Yksi esimerkki 3'-pääspesifisestä ribotsyymistä on sekvenssi:

5'-ACUGGGUCUCUCUGGUUA-3'.

(SEKV. ID NO:5, merkitty "Rz-2":lla)

Tämä sekvenssi käsittää suunnilleen nukleotidit 9079-9097 mRNA:n lähtöreunasta U3/R. Toinen esimerkki on HIV-genomin Rev/ENV-alue. Tämä sekvenssi on 5' TTGGAGTCAGGAACTA 3' (SEKV. ID NO:16). Tämä sekvenssi käsittää HBX2:n nukleotidit 8629-8644. Tämän keksinnön piiriin luetaan myös sekvenssit, jotka vastaavat olennaisesti näitä sekvenssejä. "Olennaisesti vastaava" tai "olennaisesti samanlainen" käsittää ne ribotsyymisekvenssit, joilla on kyky kohdentua ja estää HIV:n tartuntakyky kuten edellä esitetyillä sekvensseillä. Olennaisesti vastaavia sekvenssejä ovat ne, jotka kykenevät hybridisoitumaan sekvenssiin tai sen vastasekvenssiin tiukoissa olosuhteissa. Alaa tuntevat henkilöt tuntevat hyvin hybridisaatiomenetelmät, lähemmin Sambrook *et al.*, jäljempänä, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Ribotsyymit, jotka katkaisevat spesifisesti konservoituneita sekvenssejä eri HIV-2-kannoissa, voidaan vaihtoehtoisesti konstruoida ja ilmentää myös <u>in vivo</u>, käyttäen jäljempänä esitettyjä malleja.

Tämä keksintö koskee edelleen retrovirusvektoreita, joiden 5'-pään ja 3'-pään LTR:ien väliin on liitetty useampi kuin yksi vieras geenisekvenssi, kukin vieras geenisekvenssi erillisen pol III -promoottorin ohjauksessa tai vaihtoehtoisesti, yhden pol III promoottorin ohjauksessa. Vieraat geenisekvenssit voivat koodittaa samoja tai erilaisia geenituotteita, esimerkiksi anti-HIV-1-antisense-molekyyliä koodittava nukleiinihappo voidaan liittää samaan retrovirusvektoriin kuten nukleiinihapposekvenssi, joka koodittaa HIV-1-spesifistä ribotsyymiä. Sellaisten retrovirusvektoreiden etuna on se, että ne antavat monifunktionaalisen hoidon HIV-infektiota

vastaan, kunkin spesifisen hoidon toimiessa synergistisesti. Lisäksi, koska vain rajoitettua vektorimäärää käytetään, integraatiokohtien määrä isäntäsolussa on vähentynyt, mikä siten pienentää isännän sellulaaristen DNA-sekvenssien aktivaatiomahdollisuutta liitetyn retrovirusvektorin toimesta.

Tämä keksintö koskee myös edellä kuvailluilla retrovirusvektoreilla pysyvästi transduktoituja isäntäsoluja. Sopivia isäntäsoluja ovat nisäkässolut kuten ihmisen tai kädellisten fibroblastit, perifeerisen veren lymfosyytit, perifeerisen veren mononukleaariset solut, $CD4^+$ T -solut tai hematopoeettiset kantasolut. Tämän keksinnön piiriin kuuluvat myös valmis, erilaistunut kantasolu tai sikiövaiheen napanuoraverisolu, joihin on liitetty ennen kypsymistä edellä kuvailtu retrovirusvektori. Tämä erilaistunut kantasolu ilmentää sen jälkeen konstitutiivisesti ja pysyvästi vieraan geenituotteen. Alaa tuntevat henkilöt tuntevat hyvin menetelmät retrovirusvektoreiden transduktoimiseksi. Lähemmin esimerkiksi, Larrick, J.W. ja Burck, K.L. Gene Therapy: Application of Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York (1991), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Tämä keksintö koskee menetelmää HIV-virusreplikaation häiritsemiseksi tai estämiseksi HIV:llä infektoituneessa solussa. Tämä menetelmä edellyttää solun transduktoimista retrovirusvektorilla, jonka 3'-pään ja 5'-pään retrovirus-LTR:ien väliin on liitetty nukleiinihapposekvenssi, joka koodittaa anti-HIV-tyypin spesifistä agenssia kuten edellä kuvailtua ribotsyymiä, pol III -promoottorin ohjauksessa. Kohdesolu transduktoidaan olosuhteissa, jotka suosivat vektorin liittymistä kohdesoluun ja HIV-tyyppispesifistä ribotsyymiä koodittavan nukleiinihapon pysyvää ilmentymistä. Kohdesolu voi olla nisäkässolu, niihin rajoittumatta. Sopivia nisäkässoluja ovat rajoittamatta kädellisten tai ihmisen solut kuten fibroblastit, $CD4^+$ T -solut, perifeerisen veren lymfosyytit, sikiövaiheen napanuoraverisolut, perifeerisen veren mononukleaarisolut tai hematopoeettiset kantasolut. Jos solu transduktoidaan ennen HIV-infektiota, kohdesolun tai sen jälkeläisten

infektoituminen voidaan estää.

Sikiövaiheen napaverta voidaan kerätä normaalilta vastasyntyneeltä, HIV-infektoidun henkilön vastasynnytetystä tai äidistä synnytyksen aikana. Veri voidaan jäädyttää käyttäen ohjelmoitua jäädytystä maksimaalisen elinkykyisyyden varmistamiseksi.

Tässä yhteydessä käytettynä, ilmauksella HIV-virusreplikaation "häiritsemisellä tai estämisellä" solussa tarkoitetaan HIV-replikaation tai HIV-komponenttituotannon vähentämistä, joita tarvitaan uusiin viruksiin solussa, verrattuna soluun, jota ei ole lyhytaikaisesti tai pysyvästi transduktoitu retrovirusvektorilla. Tämä ilmaus käsittää lisäksi vähenemisen infektiivisten virionien suhteellisessa tuotannossa, jota voi esiintyä pakatun, muodostuneen RNA:n jakautumisen kautta. Yksinkertainen ja tarkoituksenmukainen määritys sen määrittämiseksi, onko HIV-virusreplikaatio vähentynyt, on ELISA-määritys HIV p24 -antigeenille (gag-geenituote). Kokonais-RNA transduktoiduista ja infektoiduista "kontrolli"soluista voidaan vaihtoehtoisesti eristää ja analysoida dot blottauksella ja tutkia HIV-spesifisellä DNA:lla sen määrittämiseksi, onko HIV-replikaatio vähentynyt. Suurempi kuin viidenkymmenen prosentin vähentymä HIV-replikaatiossa, verrattuna kontrollisoluihin, kvantitoi HIV-replikaation estymisen.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten HIV:n on tarkoitus käsittää minkä tahansa HIV-variantin, esim., HIV-1:n, HIV-2:n tai luokittelemattomia kliinisiä isolaatteja. Tämän keksinnön odottamaton etu on sen tehokkuus minkä tahansa HIV-variantin tai -tyypin eri kantoja vastaan.

Tämän keksinnön mukaisessa yhdessä suoritusmuodossa kohdesolut voidaan poistaa nisäkkäästä, esim., kädellisestä tai ihmispotilaasta käyttäen alaa tuntevien hyvin tuntemia menetelmiä, ja jotka on transduktoitu kuten edellä on selitetty. Transduktoidut kohdesolut voidaan sen jälkeen siirtää takaisin samaan eläimeen tai saman lajin eri eläimeen.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu valaisemaan keksintöä vaan ei rajoittamaan sitä.

Koe n:o 1

Entsyymit ja kemikaalit. Kaikki käytetyt restriktioentsyymit olivat joko Bethesda Laboratories'lta (BRL) tai Boehringer Mannheim Biochemicals'lta. Valmistajat toimittivat restriktioentsyymien puskurit. T4 DNA -ligaasi ja sekvensointipakkaus saatiin Pharmacialta. In vitro transkriptiopakkaus ja siihen liittyvät entsyymit saatiin Promegalta. Naudan vasikan seerumi, antibiootit (penisilliini ja streptomysiini), L-glutamiini, natriumpyruvaatti, fosfaattipuskuroitu saliini (PBS) ja Dulbeccon modifioitu Eaglen alusta (DMEM) ostettiin Gibcolta. HIV-1 p24 -antigeenin detektointipakkaus saatiin Coulterilta ja sitä käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

pol III:n ohjaamien ribotsyymiplasmidien konstruointi. Ellei toisin ole mainittu, kaikki yhdistelmä-DNA-tekniikat suoritettiin kuten on kuvaillut Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. HIV-1:n 5'-pään johtosekvenssispesifinen hiusneularibotsyymi (5'-ACA, CAA, CAA, GAA, GGC, AAC, CAG, AGA, AAC, ACA, CGT, TGT, GGT, ATA, TTA, CCT, GGT, A-3' (SEKV. ID NO:13) kloonattiin seuraavasti: kemiallisesti syntetisoidut kaksijuosteiset deoksiribonukleotidit, jotka vastasivat ihmisen $tRNA^{val}$-promoottoria (138 bp) ja adenoviruksen VA1-promoottoria (104 bp), kloonattiin pHR- ja pdHR-plasmideihin (Ojwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10802-10806 (1992), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) (jotka sisälsivät aktiiviset ja vastaavasti toimimattomat ribotsyymit) ribotsyymin kooditussekvenssin yläpuolelle EcoRI-BamHI-kohdassa (kuvio 1). Tuloksena saadut plasmidit, jotka sisälsivät pol III -promoottorit, pilkottiin MluI:llä ja PstI:llä autokatalyyttisen kasetin poistamiseksi ja sen korvaamiseksi pol III -lopetussekvensseillä kuten on esitetty julkaisussa Geiduschek, E.P., Ann. Rev. Biochem. 57:873-914 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Kloonien sekvenssit varmistettiin DNA:n sekvensoinnin avulla. Plasmidivektorit merkittiin pJT-HR:llä sen plasmidin osalta, joka sisälsi $tRNA^{val}$-promoottorirakenteen, ja pJV-HR:llä sen plasmidin osalta, joka sisälsi VA1-promoottorirakenteen (kuvio 1).

HIV-1-spesifinen ribotsyymi pilkkoo kahden, kohdissa 111/112 todettujen emästen välistä, laskettuna 5'-pään cap-kohdasta.

Retrovirusvektoreiden konstruointi. Vektorit, joissa ribotsyymiä ohjasivat sisäiset pol III -promoottorit, konstruoitiin seuraavasti: fragmentti, joka sisälsi ihmisen $tRNA^{val}$- tai adenoviruksen VA1 pol III -promoottori-ribotsyymi (Rz)-kasetin (mukaan lukien pol III lopetussignaali), poistettiin pJT-HR:stä tai pJV-HR:stä (plasmidi, johon konstruoitiin synteettinen tRNA- tai VA1-promoottori ohjaamaan HIV-johtosekvenssin hiusneularibotsyymiä, (Yu *et al.*, P.N.A.S. (1993), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä), pilkkomalla HindIII:lla, ja liitettiin retrovirusvektorin pLNL6 HindIII-kohtaan (Toht. Fred Levineltä, Kalifornian yliopisto, San Diego). Sisäinen promoottoritranskriptiokasetti on nyt vastakkaisessa orientaatiossa vektorin LTR:n suhteen. Tuloksena saatuja retrovirusvektoreita merkittiin pMJT:llä (sisäisen $tRNA^{val}$-promoottorin osalta) ja pMJV:llä (sisäisen VA1-promoottorin osalta, kuvio 1).

Sisäisen β-aktiinin promoottorin sisältävä retrovirusvektori konstruoitiin käyttäen samaa vektoria ottaen EcoRI-BamHI-insertti pβ-HR:stä (Ojwang *et al.*, edellä). Autokatalyyttinen hiusneulakasetti (Ojwang *et al.*, edellä) sisältyy jälkimmäiseen inserttiin. Tuloksena saatua retrovirusvektoria nimitettiin ligaation jälkeen pMHR:ksi (kuvio 1). Ribotsyymin ilmentymisen vertaamiseksi sisäisistä promoottoreista retrovirus-LTR:ää vastaan, käytettiin toista vektoria (pLRNL-2, toht. Jiing-Kuan Yee:ltä Kalifornian yliopistosta, San Diego). Ribotsyymisekvenssi leikattiin pHR:stä EcoRI- ja HindIII-pilkonnalla ja liitettiin HindIII-kloonauskohtaan sen jälkeen kun sekä insertti että linearisoitu vektori oli tehty tasapäisiksi. Ribotsyymisekvenssi asetettiin välittömästi RSV-

promoottorin yläpuolelle, joka ei ohjaa neo-geeniä (kuvio 1).

Näytteet retrovirusvektoreista pMJV ja pMJT talletettiin the American Type Culture Collection'iin (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852. Nämä näytteet talletettiin 17. toukokuuta, 1993, the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure -sopimuksen mukaisesti ja niille annettiin ATCC-talletusnumerot 75471 ja vastaavasti 75470.

Monikohteiset ribotsyymin ilmentämisvektorit. Ribotsyymigeeniterapian tehokkuuden varmistamiseksi HIV-infektiota varten konstruoitiin monikohteisia ribotsyymin ilmentämisvektoreita (kuvio 15). Käytössä oli disistroninen retrovirusvektori, pLPONL (Jiing-Kuan Yee, Kalifornian yliopisto, San Diego). anti-johtosekvenssiribotsyymigeeni (Rz-1), joka sisältää $tRNA^{val}$- tai VA1-promoottorin, poistetaan pMJT:stä tai pMJV:stä (kuvio 1). Ribotsyymigeeni (Rz-2), joka kohdentuu osaan HIV-1:n 3'-sekvenssistä, kloonattiin sisäisen translaation aloituskohdan (PO) eteen polioviruksen ei-luettavasta alueesta. Lyhytaikaisen yhteistransfektion tulokset osoittavat näiden rakenteiden estävän vaikutuksen HIV-1:n ilmentymiseen osoitettuna vähentyneenä p24-tuotantona. Jurkat-solulinjat voivat ilmentää pysyvästi kumpaakin näistä ribotsyymeistä. Muita ribotsyymejä ja/tai antisense-sekvenssejä voidaan myös liittää näihin rakenteisiin.

Solut ja transfektoinnit. HeLa-soluja kasvatettiin DMEM-alustassa, joka sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 100 µg/ml penisilliiniä-streptomysiiniä, 2 mM L-glutamiinia ja 1 mM natriumpyruvaattia. Soluja kasvatettiin noin 70%:n yhteensulautumisasteeseen 12-kaivoisella levyllä (1×10^5 solua/kaivo), jotka siirrostettiin yhtä päivää ennen transfektiota. Ennen transfektointia alustasta korvattiin 2 ml tuoreella DMEM:llä, joka sisälsi samat lisäaineet. Soluihin lisättiin kalsiumfosfaattisaostettua plasmidi-DNA:ta. 12-24 tunnin kuluttua alusta poistettiin ja solut pestiin kaksi tai kolme kertaa 1X PBS:llä. Viljelmiä säilytettiin sen jälkeen 2 ml:ssa DMEM-alustaa, joka sisälsi 10 % FBS:ää, 100 µg/ml

penisilliiniä-streptomysiiniä, 2 mM L-glutamiinia ja 1 mM natriumpyruvaattia.

Pysyvät solulinjat. Retroviruspartikkeleiden muodostamiseksi, amfotrooppinen pakkaava solulinja PA317 transfektoitiin kalsiumfosfaattimenetelmällä, Sambrook *et al.*, (1989) edellä, seuraavasti: vielä konfluoitumattomat PA317-viljelmät transfektoitiin 20 µg:lla kutakin kalsiumfosfaattisaostettua pLNL6:a, pMJF-1:a tai pMJT:a 12 tunnin ajan Dulbeccon modifioidussa Eaglen alustassa (Gibco), johon oli lisätty 1 mM natriumpyruvaattia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 13 µg/ml hypoksantiinia, 3,9 µg/ml tymidiiniä, 18 ng/ml aminopteriiniä ja 10% naudan sikiön seerumia (FBS; Gemini Bioproducts) 100 mm:n kudosviljelymaljoilla. Solut pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla saliinilla (pH 7,4, Ca^{2+}- ja Mg^{2+}-vapaa) ja inkuboitiin sen jälkeen vielä 24 tuntia tuoreessa alustassa. Kasvustojen supernatantteja käytettiin infektoitaessa ihmisen $CD4^+$-lymfosyyttiperäisiä Jurkatsoluja tai Molt-4-kloonin 8 soluja (Molt-4/8) (Kikukawa, R., *et al.*, J. Virol. 57:1159-1162 (1986)). Jurkat- ja Molt-4/8-solut (1 x 10^6 solua) suspendoitiin 5 ml:aan kutakin supernatanttia. Neljän tunnin kuluttua supernatantit poistettiin ja soluja viljeltiin RPMI-1640-alustassa (Gibco), johon oli lisätty 100 yksikköä/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 10 % FBS:ää ja 400 µg/ml G418:a (Gibco). Resistentit solut valikoitiin kasvattamalla G418-pitoisessa alustassa 3-4 viikkoon saakka. G418-resistenttejä Jurkat- ja Molt-4/8-soluja, jotka oli transduktoitu pLNL6:lla, pMJF-1:llä ja pMJT:llä, merkittiin JLNL6:lla, JMJF-1:llä tai vastaavasti MLNL6:lla, MMJF-1:llä ja MMJT:llä.

Ribotsyymin ilmentäminen pysyvissä solulinjoissa. Pysyvän solulinjan kokonais-RNA uutettiin hapan guanidiinitiosyanaatti-fenoli/kloroformiuuttomenetelmällä kuten Chomczynski ja Sacchi ovat kuvailleet, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Yksi µg kokonais-RNA:sta, käsittelyn jälkeen deoksiribonukleaasi I:llä (RQ1 DNAasi; Promega) käytettiin templaattina käänteiskopiointiin (RT). RT:hen yhdistetty polymeraasiketjureaktio (PCR) suori-

tettiin (94°C:ssa 1min., 45°C:ssa 1 min., 72°C:ssa 1 min.; 30 jaksoa) alukeparin Rib 4 (5'-CAC, ACA, ACA, AGA, AGG-3' (SEKV. ID NO:1) ja Rib 2 (5'-TAC, CAG, GTA, ATA, TAC, CAC-3'(SEKV. ID NO:2)) kanssa edellä kuvaillun menetelmän mukaisesti, paitsi että uuttovaihe lasijauheen kanssa jätettiin pois. Lähemmin Yamada, O., *et al.*, J. Virol. Methods 27:203-210 (1990), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. PCR:n jälkeen RT:n kanssa tai ilman sitä 10 µl kutakin monistettua tuotetta elektroforesoitiin 3%:isilla alhaalla sulavilla agaroosigeeleillä (Boehringer) Tris-boraatti-puskurissa (pH 7,2) ja Southern blot -analyysi suoritettiin [^{32}P]-päätyleimatun Rib 3:n kanssa (5'-CAA, CCA, GAG, AAA, CAC, ACG, TT-3'(SEKV. ID NO:3) kuten edellä on kuvailtu. Lähemmin Yamada, O., *et al.*, (1990) edellä, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Pysyvien solulinjojen kasvattaminen. Solukasvu määritettiin [^{3}H]-tymidiinin inkorporaation avulla soluissa. Lyhyesti esitettynä, parentaaliset Jurkat-solu- ja testisolulinjat jaettiin U-pohjaisten 96-kaivoisten levyjen nelinkertaisiin kaivoihin tasolla 10^4 solua/100 µl/kaivo. Kuhunkin kaivoon lisättiin sata mikrolitraa RPMI-1640-alustaa, johon oli lisätty 10 % FBS:ää, joka sisälsi 1µCi[^{3}H-metyyli]tymidiiniä (NET-027; NEN). 48 tunnin kuluttua solut otettiin talteen suodinpaperille. Suotimen radioaktiivisuus mitattiin tuikespektrometrissä (Beckman).

HIV-infektointi. HIV-1-kannat HXB2, MN ja Eli tuotettiin kloonatusta HIV-1 pHXB2:sta (kuvailtu julkaisussa Starcich, B., *et al.*, Science 227:538-540 (1985)), pMN:stä (Gurgo, C., *et al.*, Vir. 164:531-540 (1988)) ja vastaavasti pEli:stä (Alizon, M., Cell 46:63-74 (1986)), joista kukin on sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Kloonaamaton HIV-1 J677-2 eristettiin alunperin sekaviljelemällä AIDS-potilaan perifeerisen veren mononukleaarisia soluja (PBMC) normaalien PBMC:iden kanssa, ja siirtämällä kertaalleen MT-4:n kautta, ihmisen CD4^{+}-solulinjan, joka on isäntänä ihmisen T-soluleukemiavirukselle tyyppi-I (HTLV-I). Näiden viruskantojen virusvalmisteiden infektiivinen tiitteri ($TCID_{50}$) määritet-

tiin käyttäen MT-2:ta, HTLV-I-infektoitua $CD4^+$ T-solulinjaa, Yamada, O., *et al.*'n kuvailemalla menetelmällä, AIDS Res. Hum. Retroviruses 4:287-294 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Lyhytkestoisissa viljelykokeissa näitä viruskantoja käytettiin infektoimaan ribotsyymin ilmentäviä Jurkat-soluja (JMJF-1 ja JMJT) ja Jurkat-kontrollisoluja (JLNL6) infektiotasolla m.o.i. 0,01 tai 0,1 hitaammin kasvavalle kannalle J677-2. Pitkäkestoisissa viljelykokeissa käytettiin HBX2:ta ja MN:ää infektoimaan JMJF-1, JMJT ja JLNL6 infektiotasolla m.o.i. 0,01. HIV-2:n KR-kanta tuotettiin tartuntakykyisestä molekulaarisesta kloonista, jota Talbott, R-, *et al.* kuvailevat julkaisussa P.N.A.S., USA 90:4226-4230 (1993), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. HIV-2 KR -valmisteen $TCID_{50}$-arvo Molt-4/8-soluinfektiolle määritettiin Yamada, O. *et al.*'n menetelmän mukaisesti, viite edellä. Lyhytkestoisissa viljelykokeissa käytettiin HBX2:ta ja HIV-2 KR:ää infektoimaan Molt-4/8-soluja, jotka ilmentävät ribotsyymin (MMJF-1 ja MMJT) ja Molt-4/8-soluja, jotka oli transduktoitu kontrolliretrovirusvektorilla (MLNL6) infektiotasolla m.o.i. 0,01 ja vastaavasti 0,001. Solut pestiin kahdesti RPMI-1640:lla 2 tunnin virusadsorption jälkeen ja suspendoitiin uudelleen RPMI-1640-alustaan, johon oli lisätty 10 % FBS:ää, pitoisuudessa 10^5 solua/ml. Lyhytkestoisissa viljelykokeissa infektoituja soluja viljeltiin 6 päivän ajan, pieniä viljelyliemieriä kerättiin talteen joka toinen päivä ja HIV-1 p24 -antigeenitaso tai HIV-2 p26 -antigeenitaso määritettiin HIV-1- tai SIV/HIV-2-antigeenipyynti-ELISA-testin avulla (Coulter). Pitkäkestoisissa kokeissa, viidentenä päivänä ja sen jälkeen, infektoidut solut jaettiin osiin joka toinen päivä solutason 3 x 10^5 säilyttämiseksi. Viljelmien supernatanteista testattiin HIV:n käänteistranskriptaasin (RT) aktiivisuus. Lyhyesti esitettynä, 0,24 ml 30%:ista polyetyleeniglykolia 6000 ja 20 µl 4 M NaCl:a lisättiin 0,5 ml:aan supernatantteja rinnakkaisina. Supernatantit poistettiin mikrosentrifugoinnin jälkeen nopeudessa 14000 x g 30 min. ajan, ja 10 µl kutakin TNE-liuosta lisättiin putkiin (0,1 % Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Sekoittamisen jälkeen lisättiin 40 µl seosta, joka sisälsi 62,5 mM Tris-HCl:a pH 7,8, 25 mM $MgCl_2$:a, 25 mM

KCl:a, 2,5 mM ditiotreitolia, 31,25 µg/ml poly(rA)p(dt)$_{12-18}$:a (Pharmacia), 62,5 µCi/6,25 nmoolia/ml [^{3}H]dTTP (NEN):a, ja inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunnin ajan. 0,2 M EDTA:a lisättiin kymmenen µl. Seosnäyte (50 µl) täplättiin sen jälkeen DE81-paperille (Whatman), ilmakuivattiin, pestiin kolme kertaa 5%:isella natriumpyrofosfaatilla ja kahdesti vielä vedellä. Paperi kuivattiin sen jälkeen ja radioaktiivisuus mitattiin tuikespektrometrillä (Beckman).

Pitkäkestoisen viljelyn jälkeen talteenotetun viruksen uudelleentartutus. HIV-1:n HBX2- tai MN-kannoilla infektoitujen JMJF-1-solujen kasvustosupernatanttia, kerättynä 35. päivänä tai vastaavasti 23. päivänä kuviossa 12 esitetyssä kokeessa, käytettiin uudelleeninfektoimaan JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-soluja. Infektointitaso oli 0,0004 ja 0,01 HBX2:lla ja vastaavasti MN:llä (koska HBX2:n infektiivisyys oli hyvin alhainen kerättynä 35. päivänä, infektiotasoa m.o.i. ei voitu säätää 0,01:een). Näitä infektoituja soluja viljeltiin 6 päivän ajan. Pieniä näyte-eriä kasvuliemestä kerättiin talteen joka toinen päivä ja p24-antigeenitaso määritettiin HIV-1-antigeenipyynti-ELISA-testillä (Coulter).

Virus-DNA:n puolikvantitatiivinen kaksois-PCR. Sellulaarista genomista DNA:ta uutettiin JLNL6- ja JMJT-soluista 6 tuntia infektoinnin jälkeen HIV-1 HBX2:lla menetelmällä, jossa käytettiin proteinaasi K:ta ja fenoli/kloroformia, kuten Sambrook *et al.*, edellä on kuvaillut. Yhtä µg:aa kutakin DNA-uutosta käytettiin templaattina ensimmäiseen PCR:ään. Reaktioseoksen koostumus ensimmäiseen ja toiseen PCR:ään oli 50 mM Tris:a pH 8,3, 6 mM $MgCl_2$:a, 40 mM KCl:a, 1 mM ditiotreitolia, 200 mM kutakin ryhmästä dATP, dGTP, dTTP ja dCTP, 1 mM kutakin aluketta ja 2,5 yksikköä Taq-polymeraasia (Promega). Alukepareja HIV-1:n LTR:lle käytettiin HIV-1-DNA:n monistamista varten (monistettu tuote sisältää kohdesekvenssin ribotsyymille). Ensimmäinen PCR suoritettiin (94°C:ssa 1 min., 54°C:ssa 1 min., 72°C:ssa 1 min., 30 jaksoa) alukepareilla SK29, lähemmin Talbott, R., *et al.*, P.N.-A.S. (1993), edellä, ja GK2 (5′-CGG, CGG, ATC, CCG, GGC, GCT, TCA, GCA, AGC, CGA-3′ (SEKV. ID NO:14)). Alukepari PC03/GH21 β-glo-

biinille, lähemmin Saiki, R., *et al.*, Science239:487-491 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, lisättiin samoihin reaktioputkiin ensimmäisen PCR:n kymmenennen jakson jälkeen sisäiseksi kontrolliksi. Toiseen PCR:ään lisättiin kymmenesosatilavuus ensimmäisen PCR:n tuotetta ja monistaminen suoritettiin (30 jaksoa) kummallakin alukeparilla SK29/SK30, (lähemmin Talbott, R., *et al.*, edellä), ja RS06/GH21, (lähemmin Saiki, R., *et al.*, (1988), edellä). Kymmenen µl kutakin toisen PCR:n tuotteista otettiin talteen joka viidennen jakson jälkeen ja monistetut tuotteet detektoitiin geelielektroforeesin ja Southern blottauksen avulla. Southern blot -analyysi suoritettiin erikseen hybridisoimalla [^{32}P]-päätyleimatun SK31:n kanssa (Talbott, R., *et al.*, (1993), edellä) tai RS06:n kanssa HIV-1:lle tai vastaavasti β-globiinille. Suhteellisten HIV-1 DNA -määrien arvioimiseksi sellulaarisissa DNA-uutteissa, erilaisia pitoisuuksia (0,05-500 fg/ml) HIV-1 SF-2:ta sisältävää plasmidi-DNA:ta (lähemmin Sanchez-Peseador, R., *et al.*, Science 227:484-492 (1985), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) monistettiin käyttäen samoja alukkeita ja olosuhteita.

p24-antigeenin kvantitointi. Coulterin HIV-1-p24-ELISA-pakkausta käytettiin ydinantigeenin määrän määrittämiseksi valmistajan ohjeiden mukaisesti. Optinen tiheys mitattiin 450 nm:ssä käyttäen ELISA-levylukijaa. Virusproteiinin (p24) pitoisuus viljelmän supernatantissa, talteenotettuna 40-48 tuntia transfektion jälkeen, määritettiin absorbanssista käyttäen standardikäyrää. Arvot ilmaistiin sitten aktiivisuusproentteina tai suoraan p24-proteiinipitoisuutena. HIV-1 p24:n ilmentymisen inhibitioprosenttimäärää käytettiin ribotsyymin tehokkuuden määrittämiseksi HIV-1:n replikaation ja ilmentymisen inhibiittorina. HIV-2 p26 kvantitoitiin käyttäen vastaavaa menetelmää (Coulter).

Dot blot -analyysi. Kokonais-RNA HeLa-soluista, jotka oli transfektoitu erilaisilla DNA-näytteillä, eristettiin käyttäen menetelmää, jota edellä on kuvaillut Ojwang *et al.*, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Lyhyesti esitettynä, solut pestiin kahdesti jääkylmällä 1X PBS:llä ja hajotettiin

sen jälkeen lisäämällä 10 mM EDTA:a (pH 8,0), 0,5 % SDS:a, 0,1 M natriumasetaattia (pH 5,2). Kokonais-RNA otettiin talteen solulysaateista yksinkertaisella uutolla vesikylläs-teisellä fenolilla ja etanolisaostuksella. Templaatti-DNA:n poistamiseksi, eristettyä RNA:ta käsiteltiin DNAasi I:llä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 10 mM EDTA:a ja 0,2 % SDS:a, ja RNA uutettiin fenoli:kloroformikäsittelyllä ja saostettiin lopuksi etanolilla. Talteenotettu kokonais-RNA liuotettiin uudelleen DEPC-käsiteltyyn veteen ja 20 µg immobilisoitiin GeneScreen Plus -membraaniin (Dupont) kevyen imun avulla blottausimusarjan avulla (Bethesda Research Laboratory). Membraani tutkittiin sen jälkeen 5'-päästä radioaktiivisesti leimatun synteettisen DNA-koettimen kanssa, joka oli komplementaarinen ribotsyymi-RNA:n suhteen, tai <u>in vitro</u> kopioitiin ja sisäisesti radioleimatun RNA-koettimen kanssa, joka oli komplementaarinen HIV-1:n RRE RNA:lle. Täplien intensiteetti kvantitoitiin fosfori-imager-laitteella (Molecular Dynamics, Kalifornia).

pol III -promoottoreiden ohjaan ribotsyymin vaikutukset HIV-1:n ilmentymiseen. Ihmisen $tRNA^{VAL}$- ja VA1-promoottorit liitettiin HIV-1:n 5'-pään johtosekvenssispesifisen ribotsyymigeenin yläpuolelle. pol III -lopetuskohta liitettiin ribotsyymigeenin alapuolelle käyttäen Ratnerin *et al.* esittämää menetelmää, AIDS Res. Hum. Retroviruses <u>3</u>:57-69 (1987), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Ribotsyymin ilmentyminen näillä plasmideissa transfektoiduissa HeLa-soluissa määritettiin RNA:n dot blot -analyysillä. Verrataessa aikaisemin kuvailtuun ihmisen β-aktiinin pol II -promoottoriin (kuvailtu julkaisussa Chang *et al.*, Clinical Biotech. <u>2</u>:23-31 (1990), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä, pol III -promoottoreiden ohjaaman ribotsyymin ilmentyminen oli 88 % suurempi.

HIV-ilmentymisen ribotsyymivälitteisen inhibition tehokkuuden määrittämiseksi lyhytaikaisessa määrityksessä, efektoriplasmidi (pHBX2gpt) ja reportteriplasmidi (pC15CAT) (Arya *et al.*, Science <u>229</u>:69-73 (1985), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) yhteistransfektoitiin HeLa-soluihin, ribotsyymin

sisältävät plasmidit (pJT-HR ja pJV-HR) tai pUC19 kontrollina, kalsiumfosfaattimenetelmällä, jota Ojwang *et al.*, edellä, on kuvaillut. Vertailun vuoksi rinnakkaisena käytettiin samaa ribotsyymiä, jota ohjasi β-aktiinin promoottori, josta Ojwang *et al.*, edellä, on raportoinut. Solulysaateille suoritettiin CAT-määritys ja HIV-1 p24 -antigeenitasot (gag-geenituote) viljelmän supernatantissa analysoitiin entsyymikytkeisellä immuno-absorbenttimäärityksellä (ELISA). Saadut tulokset esitettiin graafisesti suhteellisina osuuksina kontrolliarvosta 100 % (kuviot 2A ja 2B). pol III -promoottoreiden ilmentämä HIV-1-ribotsyymi inhiboi HIV-1:n ilmentymistä ja virustuotantoa merkittävästi (kaikkiaan 70-95 %). Tat-proteiiniaktiivisuusmäärityksessä (kuvio 2A), $tRNA^{val}$-promoottorin ohjaama ribotsyymi inhiboi yli 10 % enemmän kuin β-aktiinin promoottorin ohjaama ribotsyymi. p24:n ilmentymisen osalta (kuvio 2B), molemmat pol III -promoottorien ohjaamat ribotsyymit inhiboivat 15-25 % enemmän kuin β-aktiinin ohjaama ribotsyymi. SEn lisäksi, ribotsyymin sisältämien pol III -promoottoriplasmien vaikutus HIV-1-ilmentymisen inhibitioon oli DNA-annoksesta riippuvainen.

Ribotsyymin aiheuttama lohkaisu ja kohdespesifisyys. β-aktiini-promoottorin ohjaama ribotsyymi inhiboi HIV:tä katalyyttisten vaan ei antisense-ominaisuuksien johdosta. Sen toimintaan vaikuttaa lisäksi kohdesekvenssin läsnäolo. Vastaava funktio ja spesifisyys on nyt havaittu koskien pol III -promoottorin ohjaamia ribotsyymejä. Katalyyttisen/antisense-aktiivisuuden vaikutuksen määrittämiseksi HIV-1-ilmentymisen inhibitioon, toimimaton ribotsyymi (Ojwang *et al.*, edellä), jossa oli kolme pistemutaatiota (22-AAA-24:stä 22-UGC-24:ään) konstruoitiin pol III -promoottoriplasmideihin. Pistemutaatiot tekivät ribotsyymistä inaktiivisen mutta eivät vaikuttaneet sen sitoutumiseen kohde-RNA:han. Villityypin ja toimimattomat ribotsyymit ilmentyivät samantasoisesti transfektoiduissa soluissa mutta toimimaton ribotsyymi inhiboi vain ~10 % HIV-1-ilmentymistä. HIV-1:n replikaation ja ilmentymisen havaittu inhibitio johtuu sen vuoksi pääasiassa ribotsyymin katalyyttisestä ominaisuudesta eikä sen antisense-ominaisuuksista. Kun $pHBX2_{gpt}$:tä korvaamaan käytettiin pTAT:a

Tat-proteiinin toimitamiseksi in trans, eivät pJT-HR eikä pJV-HR inhiboineet CAT-aktiivisuutta. Tämä vahvistaa sen, että HIV-1-ribotsyymi inhiboi vain lähettien ilmentymistä, jotka sisältävät kohdesekvenssin.

Yhtä suuret määrät kokonais-RNA:ta HeLa-soluista, jotka oli transfektoitu pHBX2gpt/pJV-HR:lla (1:10 µg) ja pHBX2gpt/pUC19:lla, analysoitiin dot blottauksella ja tutkittiin HIV-1-spesifisen DNA:n kanssa sen määrittämiseksi, johtuiko HIV-1-proteiinien vähentynyt ilmentyminen suoraan HIV-1-mRNA:n vähentyneestä määrästä. Kuviossa 2C esitetty tulos osoittaa, että ribotsyymin läsnäolo vähensi HIV-1-transkriptia 71%:lla. Virusproteiini p24:n inhibitiotaso, joka havaittiin in vivo (80-90 %, kuvio 2C), voi johtua siitä seikasta, että osa viruksen mRNA:sta pilkkoutuu vain osittain ja on yhä ilmaistavissa dot blottauksella muttei luettavissa proteiineiksi.

Johtosekvenssiribotsyymi inhiboi monenlaisia HIV-1-kantoja. Välttämätön ominaispiirre millä tahansa tehokkaalla terapeuttisella aineella HIV-infektiota ja AIDS:ia vastaan on sen kyky inhiboida erilaisia HIV-1-kantoja. Tämä tärkeä kysymys osoitettiin käyttämällä erilaisia retrovirusvektoreita, jotka sisälsivät ribotsyymin (kuvio 1), yhteistransfektoitaessa DNA-rakenteiden kanssa, jotka olivat peräisin useista eri HIV-1-kannoista. Valittiin kolme kantaa, MN, SF-2 ja Eli, joiden geneettiset etäisyydet HBX2:sta vaihtelevat, Eli:n, zairelaisen kannan ollessa etäisin. Mikä mielenkiintoista, tutkittavan ribotsyymin avulla kohdennettu johtosekvenssi on täysin konservoitunut tunnetuissa HIV-1-kannoissa, lukuunottamatta MN:n sekvenssiä, jossa on yhden emäksen mutaatio (lähemmin Myers *et al.*, Human Retroviruses and AIDS 1992, Theoretical Biology and Biophysics, New Mexico, sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) (kuvio 3). Kuten kuviosta 4A havaitaan, kaikki kolme retrovirusvektoria, joissa ribotsyymigeeniä ohjaavat sisäiset promoottorit (kuvio 1), inhiboivat merkittävästi SF-2:n ilmentymistä (verrattaessa kolmea pylvästä kontrollipylvään oikealla puolella toisesta pylväästä vasemmalta). Näitä sisäisiä promoottoreita ovat edellä rapor-

toidut pol II -β-aktiinipromoottori (pMHR:ssä) ja tässä raportoidut pol III -promoottorit $tRNA^{val}$ ja VA1 (pMJT:ssä ja pMJV:ssä). Toisaalta, retrovirusvektori pMJF-1, jossa ribotsyymigeeniä ohjaa suoraan MoMLV LTR (kuvio 1), ei inhiboinut HIV-1:n ilmentymistä (kuvio 4A, verrattaessa kahta ensimmäistä pylvästä vasemmalta). Sen määrittämiseksi, johtuiko pMJF-1:n kyvyttömyys inhiboida SF-2:ta ribotsyymin ilmentymisen puuttumisesta tässä vektorissa, suoritettiin dot blottaus (kuvio 4B). Ribotsyymisekvenssien ilmentyminen havaittiin kaikissa retrovirusvektoreissa, jotka sisälsivät ribotsyymigeenin, mukaan lukien pMJF-1. Päinvastaisesti, pelkkä vektori (pylväs #2) ei tuottanut ribotsyymiä. Tosiasiassa pMJF-1, joka ei inhiboinut HIV-1:n ilmentymistä, on yksi korkean ekspressiotason vektoreista. Yksi selitys tämän vektorin kyvyttömyydelle inhiboida viruksen ilmentymistä on se, että ribotsyymin kloonauskohta usean sadan emäsparin päässä transkription aloituskohdasta. Poikkeuksellisen pitkä käsivarsi, joka on kiinnittynyt ribotsyymin 5'-päässä, voi olla vuorovaikutuksessa sellulaaristen nukleiinihappojen tai proteiinien kanssa, jotka vaikuttavat sen päästävyyteen substraatin luo.

pMJT:n, pMJV:n ja pMHR:n vaikutus Eli:iin ja MN:ään tutkittiin. Kuten kuviossa 5A on esitetty, samanlainen inhibitiotaso todettiin kannoille SF-2 ja Eli (kuvio 4A ja kuvio 5A). Jonkin verran pienempi mutta silti merkittävä inhibitio todettiin MN-kannalla (kuvio 5B), mikä viittaa siihen, että yhden emäksen substituutiolla kohdesekvenssissä on jonkin verran vaikutusta ribotsyymiaktiivisuuteen, ja vielä merkittävämmin siihen, että hiusneularibotsyymi kykenee kestämään tiettyjä mutaatioita substraateissa.

Koe n:o 2

Ribotsyymiä konstitutiivisesti ilmentävien T-solulinjojen kehittäminen. Retrovirusvektorit pMJF-1 ja pMJT (kuvio 1) konstruoitiin parentaalisista vektoreista LNL-6 ja LRNL-2 kuten edellä on kuvailtu. Nämä plasmidi-DNA:t sekä pLNL6-vektorin kontrolli-DNA transfektoitiin amfotrooppiseen

pakkaavaan solinjaan PA317 ja viljelmien supernatantteja käytettiin infektoimaan ihmisen $CD4^+$ T -solulinjoja Jurkat ja Molt-4/8. G418-resistenttejä Jurkat- tai Molt-4/8-soluja, jotka oli transduktoitu LNL6:lla, MJF-1:llä ja MJT:llä, merkittiin JLNL6:lla, JMJF-1:llä ja JMJT:llä tai vastaavasti MLNL6:lla, MMJF-1:llä ja MMJT:llä. Ribotsyymien ilmentymistä näissä solulinjoissa tutkittiin polymeraasiketjureaktion avulla yhdessä käänteistranskription kanssa (RT-PCR) käyttäen ribotsyymisekvenssiin sisältyviä alukkeita (kuvio 6). Monistunut tuote havaittiin vain JMJF-1:ssä, JMJT:ssä, MMJF-1:ssä ja MMJT:ssä eikä pelkissä vektorikontrolleissa (JLNL6 ja MLNL6). Tuote oli sen liäksi peräisin RNA:sta eikä DNA:sta, koska monistumista ei havaittu ilman käänteistranskriptiota. Vaikka PCR-määritystä ei oltu suunniteltu kvantitatiiviseksi, ribotsyymin ilmentymistasot JMJT:ssä ja MMJT:ssä näyttivät johdonmukaisesti korkeammilta kuin tasot JMJF-1:ssä ja MMJF-1:ssä, mikä viittaisi siihen, että sisäinen $tRNA^{val}$-promootori on voimakkaampi ilmentymisen ohjaaja. Ribotsyymin konstitutiivisella ilmentymisellä ei ollut haitallista vaikutusta solujen lisäkasvuun arvioituna tymidiinin sisäänoton (kuvio 7) tai solumäärän perusteella. Transduktoidut ja transduktoimattomat (parentaalit) solut olivat lisäksi erottumattomat elinkykyisyyden suhteen (≥99 %) siirrettäessä joka neljäs päivä 3 kuukauden ajan.

Ribotsyymin ilmentyminen pysyvissä T-solulinjoissa inhiboi erilaisten HIV-kantojen infektiota. Tärkein peruste kehitettäessä anti-HIV-hoitoa on varmistaa tehokkuus laajaa virusisolaattivalikoimaa vastaan. Tässä käytetyssä hiusneularibotsyymissä identifioitu kohdesekvenssi on hyvin konservoitunut pohjoisamerikkalaisissa/eurooppalaisissa ja afrikkalaisissa isolaateissa. Vain MN-kannalla on yhden emäksen käsittävä substituutio tässä sekvenssissä (Myers *et al.*, edellä). p24-antigeenin ilmentyminen kloonatusta HBX2-, MN SF2 - ja Eli-DNA:sta inhiboitui HeLa-soluissa, jotka oli lyhytaikaisesti yhteistransfektoitu ribotsyymigeenillä. Lyhytaikaista transfektointia ei kuitenkaan voi käyttää inhibitiovaikutuksen arvioimiseksi kloonaamattomaan isolaattiin, mikä on enemmän asiaan kuuluvaa. Tämän havainnon varmistamiseksi ja

ulottamiseksi ihmisen T-solulinjojen virusinfektioon käytettiin tartuntakykyistä virusta, joka oli peräisin HBX2:sta, MN:stä, ELI:stä sekä kloonaamattomasta kliinisestä isolaatista J677-2 infektoitaessa JMJF-1-, JMJT- ja JLNL-6-soluja. J677-2 saatiin suoraan potilaan perifeerisen veren mononukleaarisista soluista (PBMC) sekaviljelemällä normaalin PBMC:n kanssa ja siirtämällä kerran MT-4-soluihin monistamista varten. p24-antigeenin ilmentyminen kaikilla näillä HIV-1-kannoilla, mukaan lukien kliininen isolaatti, infektoitujen solujen kasvustosupernatantissa, väheni voimakkaasti (kuvio 8). Kuuden päivän viljelyjakson aikana MN:n replikointi, joka sisälsi yhden emäksen vastinparittomuuden kohdesekvenssissä, inhiboitui myös täydellisesti. Sen määrittämiseksi, oliko virusinhibitio kohdesekvenssispesifinen, runsaasti replikoituvaa (HIV-2 KR:ää) ja HIV-1 HBX2:ta käytettiin rinnakkain infektoimaan MMJF-1-, MMJT- ja MLNL-6-soluja. Kuten kuviossa 9 on esitetty HIV-2 KR:n ilmentyminen ei inhiboitunut lainkaan ribotsyymin ilmentävissä soluissa, kun taas HBX2-replikaatio katosi jälleen kokonaan. Nämä tulokset osoittavat, että HIV-1:n konservoituneeseen johtosekvenssiin kohdistunut hiusneularibotsyymi inhiboi tehokkaasti erilaisia HIV-1-kantoja, mukaan lukien kloonaamaton virus, jota ei ole sopeutettu T-solulinjoihin laboratoriossa, mutta ei vaikuta HIV-2:een, joka sisältää hyvin eriytyneen sekvenssin tuolla alueella. Ribotsyymin vaikutus oli selvä myös synsytian muodostumiseen, jonka HBX2 ja MN indusoivat MLNL6- ja MMJF-1-soluissa 9. päivänä infektoinnin jälkeen (kuvio 10). Molemmat virukset saivat aikaan suuria synsytiumeja kontrollisoluissa, jotka oli transduktoitu pelkästään vektorilla, mutta niukasti tai ei lainkaan synsytiumia havaittiin ribotsyymiä ilmentävissä soluissa.

Taulukko I

Infektiiviset virustiitterit ($TCID_{50}$) ja p24-antigeenitasot viljelmässä

Virus-kanta	Solulinja	Päiviä infektion jälkeen	$TCID_{50}$/ml	p24 (pg/ml)
HBX2	JLNL6	17	$10^{4,25}$	813000
	JMJF-1	0	---	<15
		17	ND	887
		35	$10^{1,25}$	1462
	JMJT	0	---	<15
		17	ND	163
		35	ND	104
MN	JLNL6	13	$10^{4,00}$	731000
	JMJF-1	0	---	<15
		13	$10^{1,25}$	1810
		23	$10^{2,75}$	
	JMJT	0	---	<15
		13	ND	948
		23	---	---

Infektiivinen tiitteri ($TCID_{50}$) ja p24-antigeeni JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-solujen viljelmien supernatanteissa, jotka oli infektoitu HIV-1:n HBX2- tai MN-kannoilla osoitettuna päivänä, määritettiin. ND, ei havaittavissa; ---, ei tehty.

Ribotsyymin ilmentyminen mahdollistaa HIV-ilmentymisen pitkäkestoisen inhibition. JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-soluja infektoitiin HBX2:lla tai MN:llä. RT-aktiivisuuden taso JLNL6-solujen supernatanteissa, jotka oli infektoitu HBX2:lla tai MN:llä, saavutti huippunsa 19. päivänä tai vastaavasti 13. päivänä infektoinnin jälkeen (kuvio 11). RT-aktiivisuus putosi sen jälkeen ja nämä kontrolliviljelmät lopetettiin johtuen viruksen voimakkaista sytopatiavaikutuksista. RT-aktiivisuus HBX2-infektoiduissa JMJT-soluissa oli huomattavan estynyt taustatasoihin nähden 35. päivään saakka infektoinnin

jälkeen, kun taas HBX2:lla infektoitujen JMJF-1-solujen RT-aktiivisuus putosi alle 1%:tiin kontrollisolujen huippu-RT-aktiivisuudesta (kuvio 11). Infektiivisyyttä ei todettu JMJT:n supernatantissa 17. eikä 35. päivänä, kun taas heikko infektiivisyys ($10^{1,25}$ $TCID_{50}$/ml) todettiin JMJF-1:ssä 35. päivänä, joka oli yhä kolme logaritmia matalampi kuin supernatantin $TCID_{50}$/ml JLNL-6-soluista 17. päivänä (taulukko I). Matalia p24-antigeenitasoja oli havaittavissa JMJT-supernatanteissa 17. ja 35. päivinä (taulukko I). MN:llä infektoiduissa JMJT- ja JMJF-1-soluissa RT-aktiivisuus putosi alle 2%:tiin ja vastaavasti alle 5%:tiin 27. päivään saakka infektoinnin jälkeen, verrattaessa huippuarvoon MN:llä infektoidussa JLNL6:ssa (kuvio 11). Infektiokykyinen virus oli myös talteenotettavissa 13. ja 23. päivinä JMJF-1-viljelmästä (taulukko I). Sen määrittämiseksi, johtuiko ilmaantunut RT-aktiivisuus ribotsyymin ei-pitkittyvästä ilmentymisestä viljelyjakson aikana, RNA:ta tutkittiin MN-infektoiduissa JMJT- ja JMJF-1-soluissa, jotka oli kerätty talteen 23. päivänä infektoinnin jälkeen, RT-PCR:n avulla käyttäen ribotsyymispesifisiä alukkeita (kuvio 11, liiteosa).

Merkittäviä ribotsyymi-RNA-tasoja todettiin sekä JMJT- että JMJF-1-soluissa, joka oli yhdenmukainen solujen suhteen ennen virustartutusta (kuvio 6A ja 6B). Koska RT-PCR:ää ei oltu suunniteltu kvantitatiiviseksi, ribotsyymin ilmentymistasoa vakiintuneissa solulinjoissa 23 päivää infektoinnin jälkeen ei voi verrata tasoon ennen infektointia. Jäljelle jäi siten mahdollisuus, että ribotsyymin ilmentymistaso putosi alle suojakynnyksen pitkäkestoisen viljelyn aikana. Ribotsyymi-RNA:ta ei kuitenkaan todettu pysyvissä solulinjoissa edes 25 viikkoa transduktoinnin jälkeen kuten kuviossa 6B on esitetty.MN:n vähäisempi inhiboituminen ribotsyymin vaikutuksesta viittaa siihen, että yhden emäksen substituutiolla kohdesekvenssissä ei ole vaikutusta ribotsyymiaktiivisuuteen pitkäkestoisessa viljelyssä.

Selviytyjämutanttitesti. Sen testaamiseksi, edustiko infektiokykyinen virus, joka eristettiin HBX2:lla tai MN:llä infektoitujen JMJF-1-solujen pitkäkestoisessa viljelyssä

(esitetty kuviossa 11 ja taulukossa I) selviytyjämutantteja, jotka sen jälkeen olivat resistenttejä ribotsyymille, viljelmien supernatantit päiviltä 23 (MN) ja 35 (HBX2) JMJF-1-viljelmistä käytettiin JLNL6-, JMJF-1- ja JMJT-solujen uudelleentartutukseen. p24-antigeenitasoa viljelmien supernatanteissa seurattiin 6 päivän viljelyjakson aikana. Kuten primaari-infektioissa (kuviot 8, 9 ja 11), p24-antigeenin ilmentymistaso inhiboitui reilusti kummankin talteenotetun viruksen osalta (kuvio 12). Siitä johtuen, viruksen matalatasoinen ilmentyminen infektoitujen solujen pitkäkestoisen viljelyn jälkeen ei ollut seurausta spesifisistä mutaatioista, jotka tekivät viruksen resistentiksi ribotsyymille. Asteittainen lisääntyminen virus-RNA:n määrässä voi pikemminkin mahdollisesti titrata ulos ainakin, osaksi antiviraalisen vaikutuksen ribotsyymiin.

Ribotsyymi inhiboi myös aikaiset tapahtumat viruksen replikaatiossa. On havaittu, että virus-DNA:n ja ribotsyymigeenin lyhytkestoinen yhteistransfektio johti virus-RNA:n ja proteiinituotannon vähenemiseen, mikä osoitti, että ribotsyymi inhiboi virusgeenin ilmentymistä, luultavasti pilkkomalla kopioidun virus-mRNA:n. Sen lisäksi, koska viruksen genominen RNA sisälsi myös kohdesekvenssin, ribotsyymi voi potentiaalisesti pilkkoa sisääntulevan virus-RNA:n ja estää myös integroitumisen toteutumisen.

Sen tutkimiseksi, häiritsikö ribotsyymi todellakin virusreplikaation varhaisia vaiheita, provirus-DNA-synteesi määritettiin 18 tuntia ja myös 6 tuntia infektoinnin jälkeen HIV-1:llä soluissa, ribotsyymin ilmentymisen kanssa ja ilman sitä, käyttäen puolikvantitatiivista sarjatoimista kaksois-PCR-menetelmää seuraavasti. JMJT- jja JLNL6-solujen sellulaarisessa genomisessa DNA:ssa olevien HIV-1 LTR -peräisten sekvenssien monistaminen 18 tunnin kohdalla infektoinnin jälkeen HBX2:lla infektiotasolla M.O.I. 0,1 suoritettiin ensin alukeparin kanssa HIV-1 LTR:lle [SK29 (Ou, C-Y *et al.*, Science 239:295 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä) ja GK2] käsittäen 30 jaksoa. Reaktioputkiin lisättiin sisäisenä kontrollina β-globiinigeenin alukepari [PC03 ja

GH21 (Saiki *et al.*, Science 239:487 (1988), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä)] ensimmäisen PCR:n kymmenennen jakson jälkeen β-globiinituotteen mahdollisen häiritsemisen välttämiseksi LTR-sekvenssien monistamiseen, koska β-globiini-DNA:n määrä arvioitin suuremmaksi kuin HIV-1-DNA:n määrä sellulaarisissa uutteissa, johtuen infektoituneiden solujen pienestä osuudesta.

Toista PCR:ää varten lisättiin 1/10 tilavuus ensimmäisen PCR:n tuotetta ja monistaminen suoritettiin (30 jaksoa) alukepareilla SK29/30 (Ou, C-Y *et al.*, edellä) HIV:n osalta ja RS06/GH21 (saiki *et al.*, edellä) β-globiinin osalta. Kymmenen μl kutakin PCR-tuotetta toisesta PCR:stä kerättiin talteen joka viidennen jakson kohdalla, ja monistetut tuotteet ilmaistiin geelielektroforeesin ja Southern blot -analyysin avulla. Sen enempää β-globiinituote kuin HIV-1 LTR -tuotekaan, joka sisälsi ribotsyymin kohdesekvenssin, eivät olleet ilmaistavissa JMJT:n ja JLNL6:n uutteissa geelielektroforeesin avulla ja etidiumbromidivärjäyksen avulla ensimmäisen PCR:n jälkeen. Toisessa PCR:ssä β-globiinituote sekä JMJT:llä että JLNL6:lla 10 tai useamman jakson kestävissä monistuksissa. Koska merkittävää eroa ei ollut β-globiinituotteiden signaalien intensiteetissä, jotka hybridisoituivat [^{32}P]-leimatun koettimen kanssa JMJT:n ja JLNL6:n välillä, monistuksen tehokkuuden katsottiin olevan samanlainen näiden kahden näytteen välillä (kuvio 12). HIV-1 LTR -tuotteet, jotka monistettiin samassa reaktioputkessa kuin β-globiinituote, havaittiin ensin 15. jaksossa ja 25. jaksossa JLNL6:lla ja vastaavasti JMJT:llä (kuvio 16). Suhteellisten HIV-1-DNA-määrien arvioimiseksi sellulaarisissa DNA-uutteissa, erilaisia pitoisuuksia (0,05 fg - 500 fg/μl) HIV-1 SF2:n sisältävää plasmidi-DNA:ta monistettiin käyttäen samoja alukkeita ja olosuhteita. HIV-1 LTR -tuotteiden detektointi 15. ja 25. jakson kohdalla vastasi 50 fg ja vastaavasti 0,5 fg plasmidi-DNA:ta. JMJT sisälsi sen vuoksi suunnilleen 50-100 kertaa vähemmän HIV-1-DNA:ta kuin JLNL6 samalla sellulaarisen DNA:n syötöllä. Sama tulos saatiin, kun JMJT- JLNL6-soluja tutkittiin 18 tuntia HBX2:lla infektoinnin jälkeen. Tämä tulos osoittaa, että ribotsyymi häiritsi tehokkaasti

myös virusreplikaation varhaisia tapahtumia, luultavasti pilkkoen sisääntulevaa virus-RNA:ta.

Ribotsyymigeeniterapia HIV:tä vastaan. Edellä on osoitettu, että hiusneularibotsyymi, joka kohdentuu HIV-1:n 5'-pään johtosekvenssiin, inhiboi viruksen ilmentymistä useista HIV-provirus-DNA-kloonista lyhytkestoisen yhteistransfektion yhteydessä HeLa-soluihin. Inhibition osoitettiin lisäksi johtuvan pääasiallisesti ribotsyymin katalyyttisestä ominaisuudesta, ei antisense-ominaisuudesta, koska toimimaton ribotsyymi vain noin 10 % niin tehokas. T-solulinjat, jotka ilmensivät pysyvästi tämän ribotsyymigeenin, olivat pitkäkestoisesti (kokeen keston ajan, joka oli 35 päivää) resistenttejä HIV-1-infektiolle.

Yksi tunnusomainen piirre ribotsyymimallissa on se, että se voi kohdentua useisiin vaiheisiin retroviruksen replikaatiosyklissä: sisääntulevan viruksen genomiseen RNA:han vaipanpoiston jälkeen, virus-mRNA-transkripteihin ja genomiseen RNA:han, pakattaviksi uusiin virioneihin. Jokainen voi toimia ribotsyymipilkonnan substraattina. Ribotsyymigeenin ja provirus-DNA-kloonien yhteistransfektion on myös osoitettu tässä yhteydessä johtavan merkittävään (enintään 95%:n) vähenemiseen virus-RNA:ssa ja viruksproteiinin ilmentymisessä, mikä osoittaa, että ribotsyymi oli tehokas viruksen ilmentymisen estäjä jo olemassa olevasta provirus-DNA:sta. Myöhemmät kokeet ovat kuitenkin osoittaneet, että provirus-DNA:n synteesi yhdessä infektiokierrossa väheni myös suunnilleen 100-kertaisesti ribotsyymin ilmentävissä soluissa. Ribotsyymi oli siten tehokas virusinfektion toteutumisen estäjänä.

Oli myös kiintoisaa havaita, että johtosekvenssispesifisellä ribotsyymillä transduktoiduilla Jurkat-soluilla ei useinkaan ollut havaittavaa tartuntakykyistä virusta, vaikka vähäisiä p24-tasoja todettiin supernatantissa (taulukko I). Siksi voidaan mainita erikseen, että ribotsyymi voi edelleen vähentää tartuntakykyisten virionien suhteellista tuotantoa pilkkomalla pakattuja uusia RNA-molekyylejä.

Edellä esitettyjä menetelmiä ja rakenteita voidaan käyttää yhdessä muiden AIDS-hoitojen kanssa, jotta saataisiin suurempi synergia anti-virusvaikutuksissa. Infektion toteutumisen estävät hoitomuodot voidaan esimerkiksi yhdistää malleihin, joissa estetään virustuotanto infektoiduista soluista. Ribotsyymi käsittää siten ainutlaatuisen yhden aineen käsittävän hoito-ohjelman.

On osoitettu myös, että ribotsyymi on tehokas eri HIV-1-kantoja vastaan, mukaan lukien zairelainen kanta (ELI) ja kloonaamaton kliininen virusisolaatti. Kohdesekvenssi on täysin konservoitunut tunnettujen HIV-1-sekvenssien joukossa. Ainoa poikkeus on MN, joka sisälsi yhden nukleotidin käsittävän substituution paikassa 6 distaalisesti CUG-katkaisukohdan suhteen (lähemmin Myers *et al.*, edellä). MN:n ilmentyminen inhiboitui todellakin vähemmän täydellisesti, vaikka kuitenkin merkittävässä määrin. Poikkeus MN:n tapauksessa herätti huolta siitä, että viruksen selviytyjämutantteja (escape mutants) voisi muodostua nopeasti ribotsyymin läsnäollessa yksipaikkaisten mutaatioiden avulla. Ainakaan kokeen keston aikana ei kuitenkaan ollut näyttöä siitä, että selviytyjämutantteja muodostuisi suurella frakvenssillä. Sekä HBX-2:lla että MN:llä infektoiduista soluista eristetty virus oli yhä erittäin herkkä ribotsyymi-inhibitiolle pitkäkestoisen viljelyn jälkeen.

Koe n:o 3

Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytien (PBL) transduktio retrovirusvektoreilla. Retrovirusvektoreiden käytön toteutettavuus transduktoitaessa ihmisen perifeerisen veren lymfosyyttejä (PBL) testattiin myös. Tämä ei ole merkityksellistä ainoastaan siksi, että tutkitaan ribotsyymin tehokkuutta ihmisen primaarisissa T-soluissa; se on tärkeätä myös syystä, että PBL-systeemi on ihanteellinen ribotsyymin vaikutuksen tutkimiseksi HIV:n kliinisten isolaattien replikaatioon. Tämä malli on ennuste onnistumiselle käytettäessä HIV-ribotsyymigeeniterapiaa HU-PBL-SCID-hiirimallissa.

Stimuloivissa olosuhteissa lymfosyytit jakautuvat ja ne voidaan transduktoida retrovirusvektorilla, joka koodittaa neomysiiniresistenssigeenin (lähemmin esimerkiksi, Fauser, A.A. *et al.*, J. of Cell. Biochem. 45:353-358 (1991), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä). Tranduktoitumattomat PBMC:t voidaan sen jälkeen eliminoida viljelemällä G418-antibiootin kanssa. On mahdollista lisätä resistenttejä rekombinantteja enemmän kuin 1000-kertaisesti, jos niitä säilytetään IL-2:lla täydennetyissä alustoissa., Culver, K.W. *et al.*, Transplantation Proceedings 23:170-171 (1991), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Ihmisen PBMC:t (poistamatta makrofageja perifeerisen veren lymfosyyteistä) transduktoitiin retrovirusvektoreilla pMJT, pMJF-1 ja pLNL-6 käyttäen seuraavia olosuhteita. Ficoll-hypaque:lla puhdistetut PBMC:t suspendoitiin uudelleen RPMI-alustaan + 10 % FCS + PHA-P 2-3 päivän aikana. Aktivaation jälkeen lymfosyyttejä pidettiin jatkuvasti Il-2:lla (20 U/ml) täydennetyssä alustassa. Stimuloituja viljelmiä joko inkuboitiin supernatanttien kanssa tai sekaviljeltiin PA317-solulinjojen kanssa, jotka tuottivat erilaisia retrovirusvektoreita. Kolmen päivän transduktoinnin jälkeen rekombinantit valikoitiin G418 (400 µg/ml) Il-2 (200 U/ml) -täydennetyssä alustassa 8-9 päivän kuluessa. Lähtötilanteen PBMC-määrästä 1 x 10^6 muodostui suunnilleen 2 x 10^6 G418-resistenttiä rekombinanttia. LNL-6:lla ja MJT:llä transduktoituja viljelmiä merkittiin TLNL:llä ja vastaavasti TMJT:llä. Ribotsyymin läsnäolo ei vaikuttanut haitallisesti transduktoitujen/valikoitujen viljelmien elinkykyisyyteen, määritettynä TLNL/TMJT-solukasvun vertailun avulla 16 päivän jakson aikana. Eloonjääneen pBMC:n infektointi HIV-1:llä (HBX2) pienensi selvästi virustuotantoa ribotsyymillä transduktoiduissa soluissa, kun taas kontrollivektorilla (LNL-6) transduktoidut solut olivat runsaasti infektoituneita.

Koe n:o 4

anti-HIV-1-ribotsyymigeenin siirtäminen ihmisen primaarilymfosyytteihin

Infektioprosessin in vivo simuloimiseksi tarkemmin anti-HIV-1-ribotsyymigeeniterapiatutkimuksia varten kehitettiin systeemi ribotsyymigeenien siirtämiseksi vasta eristettyihin ihmisen perifeerisen veren lymfosyytteihin (PBL:t) käyttäen hiiren/rotan retrovirusvektoria. Transduktion ja G418-valikoinnin jälkeen ihmisen PBL:t useasta luovuttajasta ilmensivät ribotsyymin ja vastustivat HIV-1-viruskloonien ja kliinisten isolaattien tartuntaa, kun taas kontrollivektorilla transduktoidut PBL:t pysyivät täysin sallivina HIV-1-infektiolle. HIV-2-kloonin inhibitiota, josta puuttui kohdesekvenssi, ei havaittu ribotsyymin ilmentävissä PBL:issä. Ribotsyymin ilmentymisellä ei ollut vaikutusta primaarilymfosyyttien elinkykyisyyteen tai kasvukinetiikkaan. Tämä tutkimus on ensimmäinen osoitus HIV-1-infektioresistenssistä ihmisen primaarisissa T-soluissa, jonka geeninsiirto on saanut aikaan.

Vektorien valmistaminen. Retrovirusrakenteet pLNL-6 (kontrollivektori) ja pMJT (ribotsyymivektori) transduktoitiin käyttäen amfotrooppisia PA317 retrovirusvektorin tuottajasolulinjoja, jotka oli valmistettu edellä kuvailtujen vakiomenetelmien avulla. Retrovirusvektorin sisältävät supernatantit otettiin talteen tuottajalinjoista, suodatettiin ja varastoitiin -80°C:ssa. Tiitterit määritettiin 208F-soluilla.

PBL:ien transduktio ja valikointi. Perifeerisen veren mononukleaarisisa soluja (PMC:t) eristettiin eri luovuttajilta suonipunktion avulla, jota seurasi ficoll-hypaque-tiheyssentrifugointi. Lymfosyyttejä säilytettiin tiheydessä 1-3 x 10^6 solua/ml RPMI-alustassa + 10 % FCS, 20-100 U/ml IL-2, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Kasvua stimuloitiin lisäämällä anti-CD3-vasta-ainetta, OKT3 (Ortho Diagnostics) (5 ng/ml) ficoll-puhdistuspäivänä.

Kaksi tai kolme päivää OKT-stimuloinnin aloittamisen jälkeen alustat korvattiin suodatetuilla pakkaavan linjan supernatanteilla, jotka sisälsivät 4 µg/ml protamiinisulfaattia (M.O.I.=0,5-2,0). 4-6 tunnin kuluttua lymfosyytit palautettiin alkuperäisiin alustoihin (IL-2:a ja OKT-3:a sisältäviin)

ja inkuboitiin yli yön. Tämä transduktiomenettely toistettiin päivittäin 2-4 päivän ajan. G418:a (400 μg/ml aktiivista) lisättiin viljelmiin 24 tuntia viimeisen transduktion jälkeen. Viljelmiä ylläpidettiin valikoivissa olosuhteissa kunnes transduktoimattomat kontrolliviljelmät olivat kokonaan kuolleet, suunnilleen 8-11 päivää. Joissakin tapauksissa kuolleet solut poistettiin ficoll-tiheyssentrifugoinnin avulla. CD4/CD8-pintamarkkerimääritykset suoritettiin virtaussytometrian avulla (Cassel *et al.*, Exp. Hematol. 21:585 (1993), sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä).

HIV-tartutus. G418-valikoituja viljelmiä inkuboitiin HBX2:n, kliinisten isolaattien tai HIV-2 KR:n kanssa M.O.I.-arvon ollessa 0,01, yli yön ja pestiin kahdesti. HIV-1:n kliinisiä isolaatteja saatiin inkuboimalla PBL:iä HIV-seropositiivisista henkilöistä alustoissa, jotka sisälsivät IL-2:a, jota seurasi yksi siirto MT4-solulinjassa. Tartuttamisen aikana lymfosyyttejä (1 x 10^6 solua/ml, 0,2 ml kokonaistilavuus) ylläpidettiin RPMI 1640 -alustassa, johon oli lisätty 20 U/ml IL-2:a (ilman 418:a) ja näytteitä otettiin 2-3 päivän välein. HIV-tuotantoa seurattiin joko p24:n tai p26:n ELISA-määrityksellä (Coulter).

Tulokset

Transduktoitujen PBL-solujen valikointi ja karakterisointi. Useista luovuttajista saadut PBMC:t stimuloitiin anti-CD3-vasta-aineella ja transduktoitiin kahdella amfotrooppisella vektorilla rinnakkain: MJT:llä, joka koodittaa 5'-johtosekvenssispesifistä ribotsyymiä, koipiotuna RNA-polymeraasi III:lla, ja kontrollivektorilla LNL-6 (kuvio 16A). Näistä viljelmistä valikoitiin sen jälkeen transduktantteja perustuen niiden G418-resistenssiin. Resistenssin antaa LTR:n ohjaama neomysiinifosfotransferaasigeeni (NPT II), joka on läsnä kummassakin rakenteessa. Transduktoimattomat viljelmät kuolivat kokonaan 8-11 päivässä, kun taas transduktoidut LNL-6- tai MJT-viljelmät kykenivät säilymään elossa näissä olosuhteissa. Vasta eristettyjä PBL:iä voitiin toistettavati ylläpitää 5-6 viikkoa viljelmässä edellä kuvailluissa olosuh-

teissa.

anti-HIV-ribotsyymi ilmentyy G418-valikoiduissa PBL:issä. 5'-johtosekvenssiribotsyymin ilmentyminen ilmaistiin käänteiskopioimalla valikoitujen viljelmien kokonais-RNA, jota seurasi PCR (kuvio 17). Koska LTR:n ja tRNA:n ohjaamat transkriptit koodittuvat integroidun vektori-DNA:n vastakkaisissa juosteissa, pol III:n aloittama ribotsyymi-RNA voidaan helposti erottaa LTR-neomysiinifosfotransferaasitranskriptistä käyttämällä ribotsyymispesifistä aluketta PCR-toiminnon RT-vaiheen aikana. Käänteistranskriptaasin eliminointi menettelystä ei johtanut ilmaistavaan tuotteeseen, mikä osoitti sen, että vain käänteiskopioidusta RNA-templaatista peräisin oleva DNA monistui.

G418-valikoitujen PBL-solujen ominaisuuksia. Transduktoitujen LNL-6- ja MJT-lymfosyyttien valikoitujen viljelmien kasvukinetiikan vertailu osoitti, että ribotsyymin ilmentyminen ei vaikuta merkittävästi näiden solujen elinkykyisyyteen tai lisääntymiseen (kuvio 18A). Transduktoitujen solujen elinkykyisyys ja kasvu edellyttivät eksogeenisen IL-2:n läsnäoloa riippumatta transduktoivasta vektorista. Transduktoitujen ja valikoitujen viljelmien fenotyyppejä vertailtiin myös niiden CD4/CD8-suhteiden avulla (kuvio 18B). Vaikka näissä solupintamarkkereissa havaittiin jonkin verran muuntelevuutta luovuttajasta toiseen, CD4- ja CD8-solupopulaatioiden jakautuma ei ollut erilainen ribotsyymi- tai kontrollivektorilla transduktoiduissa soluissa.

Ribotsyymin ilmentävien PBL:ien pitkäkestoinen suoja HIV-infektiolta. G418-valikoidut viljelmät tartutettiin HBX2:lla ja HIV-1-viruskloonilla, joka sisältää täysin konservoituneen HIV 5'-johtosekvenssiribotsyymin kohdesekvenssin. Vertailtaessa 10. päivänä infektoinnin jälkeen, HIV-tuotanto oli inhiboitunut transduktoiduissa MJT-viljelmissä 1000-kertaisesti suhteessa transduktoituihin LNL-6-viljelmiin (kuvio 19A). Sen varmistamiseksi, että havaittu inhibitio ei johtunut pelkästään viljelmän valikoitumisesta, joka ei enää ollut infektoitavissa muista syistä (esim. solupintareseptorin

alaspäin säätely, interferonin induktio jne.), viljelmät tartutettiin myös HIV-2:lla, joka sisälsi kokonaan erilaisen sekvenssin kohdepaikassa. Kuten kuviossa 19 esitetään, infektointi HIV-2:lla johti vastaavan runsaaseen infektioon sekä transduktoiduissa LNL-6- että MJT-PBL:issa, mikä osoitti sen, että virusinfektio oli kohdesekvenssispesifinen. Koska sytopaattisia vaikutuksia ei havaita PBL-viljelmissä, rIL-2:n (20 U/ml) säännöllinen lisääminen mahdollisti HIV-tartutettujen lymfosyyttien ylläpitämisen useiden viikkojen ajan. Virusreplikaatio estyi kautta koko jakson (kuvio 19).

Suoja ulottuu kliinisiin isolaatteihin. Kliinisiä käyttösovellutuksia varten anti-HIV-geenin on annettava resistenssi laajalle HIV-1-kantajoukolle, joita tavataan luonnollisina ihmispopulaatiossa. Tutkijat ovat sen vuoksi tutkineet laboratorio-HIV-isolaatteja ottaaksen mukaan kliiniset HIV-1-isolaatit, eri luovuttajista peräisin olevien transduktoitujen ja valikoitujen lymfosyyttien tartuttamiseksi. Kuvio 19D esittää kahden kliinisen isolaatin aiheuttamaa infektion tehokasta inhibitiota ribotsyymillä transduktoiduissa PBL:issä, jotka on saatu kahdelta eri luovuttajalta.

Koe n:o 5

Ihmisen hematopoeettisten kanta/esisolujen intrasellulaarinen immunisointi ribotsyymin avulla HIV-1:tä vastaan.

Tässä tutkimuksessa noudatettiin aikaisempia toimintaohjeita CD34+-solujen rikastamiseksi ja retrovirustransduktiota varten (Lu, M., *et al.*, Human Gene Therapy 5:203 (1994); Smith, C., J. Hematotherapy 1:155 (1992); Cassel, A., *et al.*, Exp. Hematol. 21:585 (1993), joista kuin on sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä). LNL-pohjaiset vektorit sisälsivät kuitenkin ribotsyymigeenin sisäisten pol III -promoottoreiden ohjauksessa, mikä varmistaa geenin runsaamman ja pysyvämmän ilmentymisen verrattaessa pol II -promoottoreihin. Nämä vektorirakenteet esitetään kuviossa 20A. Kahta pol III -promoottoria käytettiin: $tRNA_{val}$, sellulaarisen taloudenpitogeenin promoottori, ja VA1, voimakas viruspromoottori. Ihmi-

sen sikiön napaverta käytettiin CD34+-solulähteenä useista syistä: napaveriperäisten esisolujen suuri transduktioteho, suurempi kanta/esisolusuhde napaveressä verrattuna aikuisen luuytimeen, ja suurempi potentiaali lisäkasvuun ja itseuudistumiseen napaverikantasoluilla verrattuna luuydinsoluihin. Napaveriperäinen kantasolugeeniterapia lapsille on sen lisäksi logistisesti vähemmän ongelmallista ja voitaisiin mahdollisesti ulottaa HLA-yhteensopiviin aikuisiin allogeenisissä transplantaatioympäristöissä.

Kaksi (2) x 10^5 puhdistettua CD34+-kanta/esisolua esistimuloitiin kasvutekijöiden SCF (kantasolutekijä, 25 ng/ml), IL-3 (500 U7ml) ja Il-6 (500 U/ml) kanssa 24 tunnin ajan ja infektoitiin soluvapaalla yhdistelmäviruksella MJT tai MJV samoin kuin vektorilla LNL6, joka oli tuotettu kloonatuista PA317-tuotantosolulinjoista, infektiotasolla M.O.I. 1-5 (virus titrattu 208F-soluilla). Lähemmin kuvion 20A selityksessä. Tätä varten yhtä suuri tilavuus viruksen supernatanttia lisättiin soluihin ja inkuboitiin 16-24 tuntia polybreenin, 4 μg/ml, läsnäollessa. Pesun jälkeen solut palautettiin kasvualustaan, joka sisälsi SCF:a, IL-3:a ja IL-6:a edellä mainituissa pitoisuuksissa, ja inkuboitiin 48-72 tuntia. Klonogeeniset määritykset suoritettiin ilman G418:aa. Pesäkkeitä poimittiin kultakin levyltä ja sarjatoiminen PCR suoritettiin käyttäen neo-geenin alukkeita transduktiotehon määrittämiseksi. Suuri transduktiotehokkuus (80-100 %) saavutettin toistuvasti. Ribotsyymin ilmentyminen näissä esisoluissa määritetiin RNA PCR:n avulla käyttäen ribotsyymispesifisiä alukkeita. PCR-tuotteiden spesifisyys varmistettiin dot blottauksella käyttäen kolmatta ribotsyymispesifistä aluketta. Kuten kuviossa 20 esitetään, kaikissa transduktoiduista kanta/esisoluista saaduissa pesäkkeissä kumpikin sisäisistä pol III -promoottoreista edisti ribotsyymin ilmentymistä (MJT ja MJV); signaalia ei voitu ilmaista LNL-6-transduktoiduissa soluissa tai transduktoimattomissa kanta/esisoluissa (d1 ja d2).

Signaalia ei sen lisäksi voitu ilmaista, kun RT jätettiin pois PCR-menettelystä ribotsyymillä transduktoiduissa soluis-

sa (d3-d5 MJT; d4-d8 MJV), mikä varmisti sen, että pikemminkin RNA-signaalit kuin DNA-signaalit tulivat ilmaistuiksi. Ribotsyymin vaihtelevat ilmentymistasot positiivisissa näytteissä voi johtua osaksi poimittujen pesäkkeiden erilaisesta koosta (solumäärä). Positiivisina kontrolleina käytettiin $2x10^3$ MJT:llä transduktoitua Jurkat-solua (d9 ja d10), joiden osoitettiin täysin vastustavan HIV-1-infektiota. Näihin soluihin verrattuna, transduktoitujen CD34+-solujen pesäkkeiden (joista kukin sisälsi vain 100-500 solua) jälkeläiset näyttivät ilmentävän ribotsyymiä runsastasoisesti, vaikka määritys oli vain puolikvantitatiivinen.

Koska MMLV-peräiset retrovirusvektorit voivat infektoida vain jakautuvia soluja, kantasolujen esistimulointia sytokiiniyhdistelmän kanssa ennen transduktiota käytettiin tavanomaisesti. Tämän prosessin aikana jotkut CD34+-soluista voisivat erilaistua enemmän alttiiksi esisoluiksi, jotka silti voisivat säilyttää pesäkkeenmuodostuskyvyn. Kysymyksen asettamiseksi, voitaisiinko CD34+-kantasolupopulaatio, ennemmin kuin pelkästään alttiimmat esisolut, transduktoida suuritehoisesti, käytettiin virtaussytometriä CD34+-solujen uudelleenerottamiseksi esistimuloinnin ja transduktoinnin jälkeen. Noin 25 % kokonaissolupopulaatiosta säilyi CD34+:na. Yksittäisiä CD34+-soluja sijoitettiin sen jälkeen 96-kaivoisille levyille ja viljeltiin IMDM-alustassa + 10 % FCS:a. Kasvualustaan lisättiin SCF:n (25 ng/ml) lisäksi, IL-3:a (500 U/ml) ja IL-6:a (500 U/ml), GM-CSF:a (500 U/ml). 300-500 solua sisältäviä pesäkkeitä saatiin yksittäisistä soluista nestemäisessä viljelmässä joissakin kaivoissa kahden viikon jakson aikana (pesäketeho on noin 30 %). Sarjatoiminen DNA PCR, käyttäen edellä kuvailtuja neo-alukkeita, osoitti, että 80-100%:n transduktiohyötysuhde saavutettiin myös tällä solupopulaatiolla. Tästä johtuen CD34+-solupopulaation ja kokonaissolupopulaation transduktiotehossa ei esiintynyt havaittavaa eroa.

Geeniterapian lopullinen päämäärä, joka kohdentuu autologisiin tai allogeenisiin kantasoluihin HIV-infektion kohdalla on kunnostaa uudelleen immuunijärjestelmä geneettisesti

muutettujen, HIV-resistenttien solujen avulla. Ensimmäinen edellytys on kuitenkin, että transduktio ja/tai siirtogeenien ilmentyminen ei vähentäisi kantasolujen kapasiteettia erilaistua monenlaisiksi solulinjoiksi. Klonogeeniset määritykset ja jälkipolvien fenotyyppimääritykset suoritettiin tämän tärkeän kysymyksen osoittamiseksi. Transduktoimattomia kantasoluja viljeltiin samoissa olosuhteissa, paitsi että kasvualustoja käytettiin tartuntakykyisen viruksen asemesta transduktion aikana. Kuten taulukossa II on esitetty, yhtä suuret solumäärät eri alkuperistä saatiin transduktoimattomille soluille ja soluille, jotka oli transduktoitu kontrollivektoreilla tai ribotsyymivektoreilla. Ei retroviruksen transduktiolla eikä ribotsyymin ilmentymisellä ollut mitään vaikutusta sen vuoksi kantasolun erilaistumiseen. Yhtä tärkeä kysymys on muuttaisivatko transduktio ja ribotsyymin ilmentyminen kantasolujen kokonaispesäkkeenmuodostussuhdetta. Kuten kuviossa 21 on esitetty, pesäkkeenmuodostussuhteiden välillä ei myöskään ole merkittävää eroa ribotsyymillä transduktoiduissa kantasoluissa ja vektorikontrollilla transduktoiduissa kantasoluissa (vertailun vuoksi kolme viimeistä pylvästä), mikä viittaa siihen, että ribotsyymin ilmentymisellä ei ollut selvää haitallista vaikutusta kantasolujen jälkipolvien kykyyn. Transduktio itsessään vähensi vähän jos lainkaan kantasolujen pesäkkeenmuodostussuhdetta (kuvio 21).

Taulukko II

	Ei-tran	LNL6		MJTMJV
Kokonais-CFU	196+43	156+48	158+48	151+38
BFU-e	74+73	60+52	68+72	72+89
Seos		1+1		2+11+12+2
Kaikkiaan		271+63	218+6	227+34225+63

Retrovirusvektorilla transduktoitujen kantasolujen klonogeeninen määritys ja jälkipolvien fenotyypitys. 48 tuntia retrovirustransduktion jälkeen $0,5x10^4$ transduktoitua tai transduktoimatonta kantasolua sekoitettiin Iscoven modifioi-

tuun Dulbeccon alustaan (IMDM, Gibco), joka sisälsi 20 % FCS:a, 1,2 % metyyliselluloosaa, 25 ng/ml SCF:a, 500 U/ml IL-3:a, 500 U/ml IL-6:a, 5 ng/ml GM-CSF:a, 2,5 U/ml erytropoetiinia ja $5x10^{-5}$ M 2-merkaptoetanolia. Kasvustot viljeltiin rinnakkaisina ja inkuboitiin 14 päivän ajan 37°C:ssa 5%:isessa kosteutetussa CO_2-atmosfäärissä. Kukin pesäke sisältää enemmän kuin 50 solua. Granulosyytti-makrofagipesäkkeet (CFU-GM) ja erytroidipurkaukset (BFU-E) identifioidaan niiden morfologian perusteella mikroskoopissa. Jokainen pesäkemäärä edustaa kolmea identtistä koetta, joissa käytetään erillisten luovuttajien napaverestä eristettyjä kanta/esisoluja.

Ribotsyymigeenin in vitro -tehokkuuden määrittämiseksi, transduktoiduista kanta/esisoluista saatuja jälkipolven soluista tutkittiin resistenssi HIV-tartutukselle. HIV-infektoituneilla henkilöillä tärkeimpinä viruskohteina ovat CD4+ T -lymfosyytit ja makrofagit/monosyytit. Yritys edistää transduktoitujen kanta/esisolujen erilaistumista lymfosyyteiksi erilaisilla sytokiinien ja kasvutekijöiden yhdistelmän avulla ei ollut menestyksellinen. Takertuvia monosyyttejä/makrofageja saatiin kuitenkin onnistuneesti aikaan käyttäen kuvion 22A selityksessä kuvailtuja koeolosuhteita. Alustoihin ei sisällytetty G418:aa soluviljelyprosessin aikana, koska raportoitiin, että neo-geenin ilmentyminen LNL6-vektorissa ei ollut pysyvä, Lu, M., *et al.*, (1994), edellä, ja koska keksinnön mukaisessa systeemissä oli jo havaittu transduktion ja ribotsyymin ilmentymisen suuri tehokkuus.Näitä soluja ei voitu infektoida HIV-1/HBX2:lla, lymfotrooppisella kannalla, mutta ne voitiin infektoida runsaasti HIV-1/Bal:lla, makrofagitrooppisella kannalla. Nämä solut tartutettiin HIV-1/Bal:lla sen määrittämiseksi, olisivatko ribotsyymillä transduktoiduista kanta/esisoluista peräisin olevat makrofagisolujälkeläiset suojattuja HIV-1-infektiolta. Kuten kuviossa 22A on esitetty, sekä MJT:llä että MJV:llä transduktoidut solut olivat merkittävästi vähentäneet HIV-1:n replikaatiota 6. päivään saakka, verrattuna kontrollivektorilla LNL6 transduktoituihin soluihin (soluviljelmät lopetettiin sen jälkeen). Suurempi inhibitio havaittiin kantasoluissa, jotka oli

transduktoitu MJV:llä kuin MJT:llä transduktoiduissa kantasoluissa (kuvio 22A). Nämä tulokset toistettiin eri luovutajasta eristetyillä kanta/esisoluilla. Inhibitiota eivät todennäköisesti aiheuttaneet erot solujen elinkykyisyydessä, koska LNL6:lla, MJT:llä ja MTV:llä oli samanlainen kasvukinetiikka näissä nestemäisissä viljelyolosuhteissa ennen virusksen tartuttamista (kasvukäyrät kuviossa 22B). RT-PCR suoritettiin sen määrittämiseksi, säilyikö ribotsyymin ilmentyminen näissä jälkipolven soluissa, joka selittäisi virusreplikaatiossa havaitun inhibition (kuvio 22C). Ribotsyymin ilmentyminen havaittiin MJT:llä ja MJV:llä transduktoiduissa soluissa (kaistat 3 ja 6), mutta ei LNL6:lla transduktoiduissa soluissa (kaista 1) noin 2 kuukautta transduktion jälkeen. Taaskaan ei ilmaistu yhtään signaalia, kun RT jätettiin pois reaktiosta (kaistat 4 ja 7), mikä osoitti, että spesifinen RNA ennemmin kuin DNA tuli ilmaistuksi. Ribotsyymin ilmentymistasoissa MJT:llä ja MJV:llä ei ollut merkittävää eroa, joten ei ole selvää miksi MJV:llä transduktoiduissa kantasoluissa havaittiin suurempi inhibitio. Koska ribotsyymin ekspressiokasetit konstruoitiin antisense-orientaatiossa LTR:n suhteen (kuvio 1), erilaistunut transkriptio voidaan saada aikaan pol III - ja pol II (MMLV LTR) -promoottoreista käyttäen toista kahdesta alukkeesta käänteiskopiointivaiheessa. Voimakkaammat signaalit ilmaistiin pol III -transkripteille (kaistat 3 ja 6) kuin pol II -transkripteille (kaistat 2 ja 5, yksityiskohdat selityksessä). Tämä vastaa havaintoa, joka koskee alhaista neo-geenin ilmentymistä LTR:stä hematopoeettisissa kantasoluissa. Viruksen alhaiset ilmentymistasot saattaisivat johtua pienestä osasta transduktoimattomia soluja, koska G418-valikointia ei suoritettu. Lyhytkestoinen G418-valikointi voitiin kuitenkin järjestää transduktion jälkeen täydellisemmän suojan varmistamiseksi HIV-1-infektiolta. Tässä esitetyt tulokset edustavat keksinnön mukaisesti ensimmäistä raporttia makrofagi/monosyyttisolupopulaation intrasellulaarisen immunisoinnin in vitro -tehokkuudesta.

Tiivistetysti esitettynä, nämä tulokset osoittavat, että hematopoeettisten kanta/esisolujen intrasellulaarinen im-

munisointi ribotsyymillä HIV-1:tä vastaan on mahdollinen geeniterapiamallina HIV-infektion hoitamiseksi. Sopiva kohdepopulaatio kantasolugeeniterapialle voi käsittää HIV-1-positiiviset vastasyntyneet. Kantasolujen transduktoimiseksi ribotsyymigeenillä voidaan käyttää ex vivo -menettelyä, jotka solut on eristetty napaverestä, ja tiputtamalla uudelleen geneettisesti muutetut kantasolut potilaisiin sen jälkeen kun niiden positiivinen HIV-tila on vahvistettu. Ilmoitettiin, että 25 % lapsista, jotka ovat syntyneet HIV-positiivisille äideille, ovat todellakin HIV-infektoituneita. On edullista aloittaa geeniterapia syntymähetkellä tai niin pian kuin mahdollista sen jälkeen, ennenkuin merkittävää virusvahinkoa on tapahtunut tyymus- tai imukudoselimiin, koska immuunijärjestelmän, erityisesti T-solujen, onnistunut uudistaminen geneettisesti muutettujen kantasolujen avulla riippuu olennaisesti näiden elinten normaaleista toiminnoista. Koska pediatrinen AIDS kehittyy nopeammin kuin aikuisten sairaus (80 % infektoituneista lapsista oirehtii ensimmäisenä vuonna), in vivo -geeniterapian teho voidaan nähdä nopeammin tässä populaatiossa. Kysymys, voidaanko CD34+-solut infektoida HIV:llä, on vielä kiistanalainen, mutta yleisesti ollaan sitä mieltä, että suurin osa CD34+-soluista ei infektoidu. Nämä tulokset osoittavat, että CD34+-solut voidaan transduktoida ribotsyymigeenillä, joka inhiboi sekä infektion toteutumisen että viruksen ilmenemisen; ribotsyymigeeniterapia, käyttäen kantasoluja kohteina, voi siten olla lupauksia antava ehkäisymalli HIV-infektion hoidolle.

Ihmisen CD34+-solujen transduktointi ribotsyymillä. Hematopoeettisten kantasolujen pitkäkestoisen uudelleensijoittamisen käyttö geeniterapiassa AIDS:ia vastaan olisi ihanteellista, koska ne kykenevät ei ainoastaan uudistamaan itsensä vaan myös erilaistumaan HIV:n kohdesoluiksi. Keksinnön mukaisesti on äskettäin kehitetty menetelmä, jossa CD34+-solut voidaan transduktoida jopa 90%:n tehokkuudella. Puhdistettuja kantasoluja infektoitiin erikseen soluvapaalla yhdistelmäviruksella MJT, MJV ja LNL-6 (kuvio 1) polybreenin, 4 µg/ml, läsnäollessa. Transduktion tehokkuus määritettiin puolikiinteässä agarissa kasvaneista pesäkkeistä saatujen

kantasolujen PCR:n avulla.

Koe n:o 6

Transduktio HU-PBL-SCID-hiirimallissa. hu-SCID-hiiri on ihminen/hiiri-kimaira, joka on synnytetty injisoimalla ihmisen perifeerisen veren leukosyyttejä SCID-hiirten vatsakalvoonteloon. Koch, J.A. ja Ruprecht, R.M. Antiviral Res. 19:81-109 (1992). Fenotyyppisesti ja toiminnallisesti normaaleja ihmisen lymfosyyttejä voidaan eristää kimairoiden veri- ja imukudoksesta. Nämä hiiret voidaan infektoida HIV-1:llä toistettavasti sekä laboratorioisolaateilla että laboratorioon sopeutetuilla kannoilla.

Primaariset PBL:t transduktoidaan retrovirusvektorilla, joka sisältää HIV-spesifisen katalyyttisen ribotsyymin koodittavan nukleiinihapon. Tranduktoinnin ja valikoinnin jälkeen PBL:t injisoidaan intraperitoneaalisesti (IP) vakaviin yhdistelmäimmuunikatohiiriin (SCID) ($2x10^7$ solua/ml) ja kaksi päivää myöhemmin niihin tartutetaan HIV, edullisesti HIV-1. Kolmekymmentä päivää tartutuksen jälkeen eläimet tapetaan ja soluja eristetään vatsakalvosta ja pernasta. Virusinfektio ja -tuotanto ilmaistaan käyttäen p24-ELISA-määritystä verinäytteissä, jotka on otettu talteen eri aikaväleillä. Näitä näytteitä käytetään vaihtoehtoisesti sekaviljelyyn tuoreiden PBL:ien kanssa viruksen eristämiseksi ja/tai HIV gag PCR:ään viruskuorman määrittämiseksi. Lisäksi CD4+ T -solujen poistuminen määritetään FACS:n avulla.

Kliininen testi. HIV-seropositiivisia henkilöitä käsitellään autologisilla T-soluilla, jotka on transduktoitu retrovirusvektorilla, joka sisältää HIV-spesifistä katalyyttistä ribotsyymiä koodittavaa nukleiinihappoa. Perifeerisen veren lymfosyytit kerätään talteen soluerotuksen avulla ja rikastetaan CD4-solujen suhteen negatiivisen valinnan avulla. Rikastetut solut stimuloidaan viljelmässä ja transduktoidaan myöhemmin retrovirusvektoreilla. Osa soluista voidaan erikseen transduktoida markkerivektorilla henkiinjäämisvertailua varten. Infektoinnin jälkeen ribotsyymin sisältävällä retroviruksel-

la, solut valikoidaan G418:ssa. Transduktoidut solut lisäkasvatetaan kasvuolosuhteissa, jotka rajoittavat endogeenisen HIV:n leviämistä. Geneettisesti modifioidut solut sekoitetaan ja tiputetaan uudelleen luovuttajaan.

Tehokkuuden määrittämistä varten, osallistujien toiminnallinen immuunitila, plasman viremia, p24-antigeenitasot, HIV-infektoituneiden perifeeriveren solujen suhteellinen osuus ja retroviruksella transduktoitujen solujen eloonjääminen verrattuna kontrollisoluihin ovat seurannan kohteina.

Kelpoisuusperusteet. Keksinnön mukaiseen hoitoon valitut potilaat ovat edullisesti HIV-positiivisia ELISA- tai Western blot -määrityksen perusteella, ja heissä esiintyy plasman viremiaa ja mitattava p24-antigeenitaso. Niiden CD4-määrä on edullisesti 200-600 solua/mm^3 ja heidän oletettu hengissäpysyminen on enemmän kuin 3 kuukautta. Suorituskykytila on edullisesti 0, 1 tai 2 (jäljempänä). Potilaat voidaan lisäksi valita heidän <u>in vivo</u> HIV:ssä läsnäolevien ribotsyymin kohdepaikkojen nukleotidisekvenssimäärityksen perusteella. Tämä suoritetaan PCR:n avulla ja sopivien kohdesekvenssien sekvensointi suoraan potilaan PBL:stä. Potilaat, joissa on HIV ja merkittävä kohdepaikkamuuntelu, jätetään ulkopuolelle.

Potilaan suorituskykytila, 5-asteinen asteikko

<u>Aste</u>	<u>Tila</u>
0	Kykenee suorittamaan kaiken normaaliaktiviteetin rajoituksetta.
1	Rajoitettu fyysisesti vaativassa aktiviteetissa mutta liikkuva ja kykenee kevyeen työhön.
2	Liikkuva ja kykenevä kaikkeen itsehoitoon mutta kykenevä kaikkeen työhön. Ylhäällä ja noin 50 % tai enemmän valvetunteja.
3	Kykenee vain rajoitettuun itsensä huolehtimiseen, sidottu vuoteeseen tai tuoliin enemmän kuin 50%:isesti.
4	Täysin toimimaton. Ei kykene huolehtimaan laisinkaan itsestään. Kokonaan sidottu vuoteeseen tai tuoliin.

Kliininen arvio. Kaikki tulevat potilaat arvioidaan edullisesti täydellisen sairaskertomuksen, fyysisen tarkastuksen, laboratoriotutkimusten, sydänfilmin ja tooraksin avulla kuten jäljempänä esitetään.

Täydellinen sairaskertomus sisältää edullisesti tiedot, jotka kattavat HIV-infektion diagnoosin keston, sairauden ilmenemismuodot ja komplikaatiot; kaikkien tunnettujen allergioiden historian; opportunististen infektioiden ja pahanlaatuisten kasvaimien historian; sukupuolitautihistorian mukaan lukien tippuri, kuppa, hepatiitti, mononukleoosi, CMV-infektio, herpes ja loissairaudet; tämänhetkisen lääkityksen, mukaan lukien apteekkivalmisteet; aineiden väärinkäytön ja vapaa-ajan lääkekäytön historian; masennuksen, ahdistuneisuuden, mielenterveyden, tunneongelmien, psyykelääkkeiden käytön ja aikaisemman psykoterapian historian; tiedot ja käytännön "turvaseksistä"; tämänhetkiset ehkäisykäytännöt; ja kirurgiset toimenpiteet ja tulokset.

Täydellinen fyysinen tutkimus voi sisältää potilaan suorituskykytilan (edellä); painon; pituuden; pulssin; keuhkotutkimuksen; sydäntutkimuksen; mahatutkimuksen; neurologisen tutkimuksen; suunielututkimuksen ja ulosteen guaijakin.

Laboratoriokokeet ja muut tutkimukselliset kokeet (tehtynä edullisesti seulonnassa, sisääntulossa ja seurantakäynneillä jäljempänä esitettävän aikataulun mukaisesti) voivat sisältää: CBC:n ja erottelulaskennan (diffin); verihiutaleiden laskennan; retikulosyyttien laskennan; virtsa-analyysin; ennen ajanmittausta tehdyn (PT) ja osa-aikaisen tromboplastiiniajan (PTT); seerumin elektrolyytit kuten Na+, K+, Cl-, HCO_3-; veren glukoosin; veren virtsa-ainetypen (BUN); virtsahapon; kokonaisbilirubiinin; alkalisen fosfataasin (jos 2x normaalin ylärajasta, silloin määritetään gammaglutamyylitranspeptidaasi (GTP)); alaniiniaminotransferaasin (ALT); aspartaattiaminotransferaasin (AST); laktaattidehydrogenaasin (LDH) ja jos on kohonnut, LDH-isoentsyymit; kalsiumin, albumiinin, kokonaisproteiinin, kvantitatiivisen immunoglobuliinin; hepatiitti B:n ja C:n serologiset seulonnat, verivilje-

lyt koskien Mycobacterium aviumintracellularea, seerumin kryptokokkiantigeenia; lymfosyyttiprofiilin; HIV-polymeraasiketjureaktion (PCR); HIV ELISA:n varmistavan Western blottauksen kanssa; seerumin p24-antigeenin; plasman kvantitatiiviset HIV-viljelyt; β2-makroglobuliinin; DNA:n kvantitatiivisen PCR:n, joka on uutettu perifeerisen veren mononukleaarisista soluista (PBMC) käyttäen alukkeina, jotka ovat spesifisiä sekä retrovirusvektorille että kontrollille; tuberkuliinin puhdistetun proteiinijohdannaisen (PPD) ja tetanustoksoidikontrollin ja tetanustoksoiditehosteen (boosterin).

Lymfosyyttiprofiili voi sisältää, mutta ei ole rajoittunut niihin: perifeerisen veren sellulaarisen fenotyypin FACS:n avulla, mukaan lukien $CD4^+$:n ja $CD8^+$:n määrät ja suhteelliset osuudet, in vitro lymfosyyttien lisääntymismääritykset mukaan lukien reaktiot mitogeeneihin (PHA, PWM, Copn-A), liukoiset antigeenit (difteria, tetanus, Candida albicans), alloantigeenin ja anti-CD3+/IL-2:n; ja sytotoksisen solufunktion määrittämisen.

Perifeerisen veren mononukleaarisolujen (PBMC) erottaminen (afereesi). Leukofereesi suoritetaan joko manuaalisesti tai käyttäen automaattista soluerotinta. Jos käytetään manuaalisia tekniikoita, kokoveriyksikkö otetaan sopivan antikoagulantin (kuten esim. ACD-A:n tai hepariinin) kanssa ja erotetaan komponentteihinsa sentrifugoimalla. Leukosyytit kerätään talteen, jäljelle jääneet punasolut ja plasma palautetaan potilaaseen. Yksi-viisi veriyksikköä voidaan perättäisesti prosessoida tällä tavalla. Vain yksi suonipunktio on tavallisesti tarpeen ja menettely edellyttää 30-45 minuuttia saada päätökseen.

Afereesi voidaan suorittaa käyttäen automaattisia soluerotinvälineitä. Kokoveri otetaan suonipunktiokohdasta nopeudella noin 50-60 ml/min. ja kanavoidaan soluerottimeen, jossa solu- ja plasmafraktiot erotetaan sentrifugoimalla. Leukosyytit kerätään komponenttipussiin ja punasolut ja plasma infusoidaan takaisin potilaaseeen toisen suonipunktiokohdan kautta. Antikoagulaatio saadaan aikaan käyttäen

ACD-A:ta tai sen vastinetta, kokoveren suhteen antikoagulanttiin ollessa 13:1. Maksimaalinen kehon ulkopuolinen veritilavuus vaihtelee välillä 300 ml - 600 ml riippuen käytettävästä laitteesta. Yhdestä kahteen tuntia tarvitaan 1-5 verilitran prosessointiin. Tavallisesti ei enempää kuin 5 x 10^9 leukosyyttiä poistetaan yhden leukofereesin aikana. Menettelyt suoritetaan siten, että kehon ulkopuolinen tilavuus ei ole enempää kuin 15 % aikuisen veritilavuudesta. Nämä tilavuudet lasketaan käyttäen standardikaavoja.

Vaarat ja varotoimenpiteet leukofereesissä. Haitalliset reaktiot afereesitoimenpiteissä ovat harvinaisia ja niitä ovat vasovagaaliset episodit (pyörtymiset), jotka liittyvät neulanpistoihin ja lyhytaikaiseen tilavuushävikkeihin, ja kutaaninen parestesia (tuntoharha), joka liittyy sitraatin aiheuttamaan hypokalsemiaan. Edellistä reaktiota hoidetaan posturaalisella (asennosta riippuvaisella) manipuloinnilla ja nesteen antamisella. Jälkimmäistä helpottavat tavallisesti antikoagulantti-infuusion nopeuden hidastaminen tai tilapäinen keskeyttäminen. Joissakin olosuhteissa voi esiintyä vähäistä nousua hyytymisparametreissä potilaassa, johtuen hyytymistä estävien verituotteiden uudelleentiputtamisesta, mikä johtaa lievästi kohonneeseen vuototaipumukseen. Tämä vaikutus on kuitenkin ohimenevä ja selviää hoidon avulla.

Soluerotus ja CD4 T -solujen rikastaminen. Ficoll-hypaque-tiheysgradienttisentrifugointia käytetään PMBC:n erottamiseksi punasoluista ja neutrofiileistä vakiintuneiden menetelmien mukaisesti. Solut pestään modifioidulla AIM-V:llä (joka sisältää AIM-V (Gibco) + 2 mM glutamiinia, 10 µg/ml gentamiinisulfaattia, 50 µg/ml streptomysiiniä), johon on lisätty 1 % naudan sikiön seerumia (FBS). CD4-solujen rikastus suoritetaan negatiivisella valikoinnilla monoklonaalisen anti-CD8-vasta-aineen kanssa, jotka on kiinnitetty magneettihelmiin standarditekniikan mukaisesti. Solunäyte-erästä analysoidaan solupinnan fenotyyppi mukaan lukien CD4, CD8, CD3 ja CD14.

CD4-rikastettujen solujen transduktointi ja kasvatus.

Solut pestään ja suspendoidaan uudelleen pitoisuudessa 5 x 10^5 solua/ml AIM-V:tä, joka on modifioitu kuten edellä, ja joka sisältää 5 % FBS:a ja 100 U/ml yhdistelmä-IL-2:a (rIL-2)(täydennetty AIM-V). Joissakin tapauksissa, 25 nM CD4-PE40:a (yhdistelmäproteiini, joka käsittää HIV-1:tä sitovan CD4-domeenin kytkettynä Pseudomonas aeruginosan eksotoksiin A:n translokaatio- ja ADP-ribosylaatiodomeeneihin) voidaan lisätä soluviljelmiin jäljellä olevien solujen lisääntymisen vuoksi, yritettäessä valikoivasti poistaa HIV-infektoituneet solut viljelmästä. CD4-PE40:n on osoitettu inhiboivan p24-tuotantoa HIV-1-infektoiduissa soluviljelmissä ja tappavan HIV-1-infektoituneita soluja. Sen lisäksi CD4-PE40 ja käänteistranskriptaasin inhibiittorit vaikuttavat synergistisesti HIV-1:n leviämistä vastaan ihmisen primaarisissa T-soluissa.

Solujakautumisen stimuloimiseksi, monoklonaalista OKT3-vasta-ainetta (Ortho Diagnostics) lisätään pitoisuuteen 10 ng/ml ja solut viljellään 24-kaivoisilla levyillä 0,5 ml/kaivo. Soluja viljellään 37°C:ssa kosteussäätöisessä inkubaattorissa 5%:isen CO_2:n kanssa 48 tunnin ajan. Alustat imetään soluista ja 1 ml vektorin sisältämää supernatanttia (kuvailtu jäljempänä) täydennetään 5 µg/ml:lla protamiinisulfaattia, 100 U/ml:lla rIL-2:a, 100 U/ml:lla penisilliiniä, 0,25 µg/ml:lla amfoterisiini B:tä/ml ja vielä 100 µg/ml:lla streptomysiiniä (25 nM CD4-PE40:a voidaan lisätä kuten edellä on kuvailtu).

Vektorin valmistaminen ja supernastantin tuottaminen tehdään hyvien valmistustapaprosessien (GMP) mukaisesti. Transduktioita varten 80 % PBMC-sisältöisistä kaivoista inkuboidaan retrovirusvektorin kanssa, joka sisältää ribotsyymiä koodittavaa nukleiinihappoa, ja 20 % kontrollivektorin kanssa. Vektorisupernatantti lisätään. Tämä menettely toistetaan 4-6 kertaa. 8-16 tuntia viimeisen toimenpiteen jälkeen vektorisupernatantti poistetaan ja soluja viljellään täydennetyssä AIM-V:ssä 24 tunnin ajan.

Valikointi G418:n kanssa transduktoimattomien solujen eliminoimiseksi aloitetaan vaihtamalla alustat AIM-V 302:ksi, joka sisältää enintään 1000 IU/ml rIL-2:a, 40 µM DDI:a (HIV-

replikaation inhiboimiseksi) ja 250-500 µg/ml aktiivista G418:aa. 6-8 viljelypäivän jälkeen G418:aa sisältävissä alustoissa solut siirretään täydennettyyn AIM-V:hen + 40 µM DDI:a (+/- 25 nM CD4-PE40) ja kasvatetaan välille $1x10^8$ $4x10^9$ solua. Kasvuolosuhteet solujen kasvattamiseen voidaan modifioida toimintamallin aikana, jos uusia soluviljelytekniikoita kehitetään.

Perifeerisen veren solujen preparointi uudelleentiputusta varten. Solut preparoidaan vakiintuneiden menetelmien mukaisesti. Lähemmin Abrahamsen *et al.*, J. Clin. Apheresis 6:48-53 (1991), Carter *et al.*, J. Clin. Apheresis 4:113-117 (1988), Aebersold *et al.*, J. Immunol. Methods 112:1-7 (1988), Muul *et al.*, J. Immunol. Methods 101:171-181 (1987) ja Carte *et al.*, Transfusion 27:362-365 (1987), joista kukin on sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä. Noin 2 viikon viljelyjakson jälkeen solumäärän tulisi olla välillä $1x10^8$ - $4x10^9$. Solujen kasvuominaisuudet voivat vaihdella huomattavasti potilaasta toiseen. Noin 72 tuntia ennen transduktoitujen solujen uudelleentiputtamista otetaan näyte-erä, josta analysoidaan fenotyyppi, integroituneen vektorin sisältävien solujen osuus, integroituneen HIV-proviruksen sisältävien solujen osuus, HIV-viljelmä ja HIV:n p24-antigeeni. Näytteet otetaan myös gram-värjäykseen, mikrobiologisiin, aerobisten ja anaerobisten bakteerien viljelyihin ja sieniviljelyihin. Solunäyte-erä otetaan uudelleentiputuspäivänä identtisiin tutkimuksiin. Jos enemmän kuin 10 % soluista on elinkyvyttömiä johtuen G418-valikoinnista, ne voidaan poistaa ficoll-hypaque-tiheysgradienttisentrifugoinnin avulla.

Kasvatettujen, tranduktoitujen solujen uudelleentiputus luovuttajiin. Ennen infuusiota otetaan verinäytteet ja säästetään analyysiä varten. 1 x 10^8 - 4 x 10^9 transduktoitua solua tiputetaan intravenoosisesti 60 minuutin kuluessa. Pulssia ja hapen kyllästystä pulssioksimetrin avulla seurataan tarkoin jäljempänä olevan aikataulun mukaisesti. Verinäytteet otetaan 5 minuuttia ja 1 tunti infuusion jälkeen ja säästetään myöhempää analysointia varten. Leukofereesi, transduktio ja uudelleentiputus toistetaan 2-3 kuukauden

välein käsittäen kaikkiaan 4-6 käsittelyä vuoden jaksossa. Ensimmäisen käsittelyn jälkeen infuusiot voidaan suorittaa poliklinikkapotilaspohjalta hoitavan lääkärin harkinnan varassa. Jos uudelleentiputus annetaan poliklinikkapotilaalle, potilasta seurataan vähintään 4 tunnin ajan hoidon jälkeen.

Infuusioon liittyvien reaktioiden hoito. Jos potilaalle kehittyy kuumetta, vilunväreitä tai lihaskipuja, hän saa sopivan annoksen aspiriinia, ibuprofeenia tai asetaminofeenia. Asetaminofeenia käytetään, jos potilas ei siedä aspiriinia tai ibuprofeenia. Ihottuman kehittymistä hoidetaan alussa oraalisella difeenihydramiinilla. Potilasta, jolle tulee reaktioita infuusiolle, kuten kuumetta, lihaskipuja ja vilunväreitä, esilääkitään 30 minuuttia ennen tulevia infuusioita joko aspiriinilla, asetaminofeenilla, tai difenhydramiinilla. Meperidiiniä käytetään vakavammissa vilunväristyksissä ja lihaskivuissa, jotka eivät reagoi nopeasti antipyreetteihin ja antihistamiineihin. Soluinfuusio hidastuu tai keskeytyy riippuen reaktion vakavuudesta. Vakavassa reaktiossa suoritetaan välittömästi kiireelliset elintoimintamittaukset.

Koe n:o 7

Luuydinaspiraatio. Useita luuydinimuja voidaan suorittaa suoliluuharjanteesta kaikissa sopivissa potilaissa yleisnukutuksessa leikaussalissa. Luuydinaspiraatio on määrällisesti suunnilleen 1000 ml ja otetaan talteen taaemmista suoliluista ja harjanteista. Jos kerättyjen solujen kokonaismäärä on $< 2x10^8/kg$, voidaan suorittaa toinen imu käyttäen mahdollisesti rintalastaa ja etummaisia suoliluuharjanteita taaempien harjanteiden lisäksi. Operaation aikana annetaan kaksi yksikköä säteilytettyjä pakattuja punasoluja aspiroimalla otetun luuydintilavuuden korvaamiseksi.

CD34+-solujen puhdistus. Hematopoeettisille esi- ja kantasoluille on tunnusomaista CD34-pintamembraaniantigeenin läsnäolo. Tätä tunnusmerkkiä käytetään hyväksi puhdistuksessa. Kun luuydin on otettu talteen, mononukleaarisolut

erotetaan muista komponenteista ficolgradienttisentrifugoinnin avulla. Tämä suoritetaan puoliautomaattisella menetelmällä, jossa käytetään soluerotinta (joko Baxter Fenwal CS3000+ tai Terumo machine). Pienitiheyksiset solut, jotka käsittävät enimmäkseen mononukleaarisoluja, kerätään talteen, ja soluja inkuboidaan muovipulloissa 37°C:ssa 1,5 tunnin ajan. Takertuvat solut käsittävät monia monosyyttejä, makrofageja ja B-soluja ja heitetään pois. Ei-adherentit solut voidaan sen jälkeen kerätä talteen ja inkuboida hiiren/rotan monoklonaalisen anti-CD34-vasta-aineen (9C5) kanssa 4°C:ssa 30 minuutin ajan kevyessä pyörityksessä. anti-CD34-vasta-aineen loppupitoisuus on 10 µg/ml. Kahden pesun jälkeen solususpensioon lisätään paramagneettisia mikropallosia (Dynal Beads, toimittajan Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Kalifornia), jotka on pinnoitettu lampaan antihiiri IgG (Fc) -vasta-aineella, suhteessa 2 solua/pallonen. 30 minuutin jatkoinkubointijakson jälkeen 4°C:ssa, ruusukuvioiset solut + magneettihelmet kerätään talteen magneetin avulla. Kymopapaiinia (toimittajana Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Kalifornia) lisätään loppupitoisuudessa 200 U/ml helmien vapauttamiseksi CD34+-soluista. Siten vapautettuja CD34+-soluja viljellään 48 tunnin ajan. Sen jälkeen suoritetaan transduktiokokeet käyttäen retrovirusvektorirakennetta kuten edellä on kuvailtu.

Geneettisesti manipuloitujen CD34+-esisolujen uudelleentiputus. Tranduktiokokeen jälkeen ja vastaavan laadunvalvontakokeiden jälkeen (mikrobiologiset määritykset, klonogeeniset määritykset, elinkykyisyystestit) geneettisesti muokatut luuytimen esisolut tiputetaan takaisin potilaaseen, jota edeltää difenhydramiinin ja hydrokortisonin antaminen standardiohjeiston mukaisesti. Lähemmin esimerkiksi, Korbling, M. *et al.*, Blood 67:529-532 (1986) tai Haas, R. *et al.*, Exp. Hematol. 18:94-98 (1990), joista kumpikin on sisällytetty tässä yhteydessä viitteenä.

Uudelleentiputuksen jälkeen geneettisesti muokattujen kantasolujen läsnäoloa luuytimessä seurataan kiertävän veren sekä luuytimen säännöllisin tutkimuksin, aluksi viikottain

neljän ensimmäisen viikon ajan. Myöhemmin sitä seurataan kuukausittain suunnilleen kuuden kuukauden ajan.

Taulukko III

Seuranta tutkimuksen aikana

	Seu-lon-ta	H&P	vk.1	vk.2 -12	vk. 13	vk.14 -24	vk.25	vk.26 -36	vk.37	vk.38 -48	vk.49 -60
Infuusio		x	pv.1		pv.1		pv.1		pv.1		
Hoitaja-käynti		x	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	Q4vk.
Ei käyntiä		x	pv.1		pv.1		pv.1		pv.1		Q4vk.
Suor.kyky-tila	x	x	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	pv.1 2	viik	Q4vk.
CBC, veri-hiut., diffi, retikulos.	x	x	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
Koagul.-prof.	x	x	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
Elektrol.	x	x	pv.1	vik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
Maksa, munuais., mineraalit	x	x	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
Kvanti-tat.im-munoglob.	x	x	pv.1		pv.1		pv.1		pv.1		Q4vk.
Rask.test.	x	x	pv-.1**		pv-.1**		pv.1**		pv.1**		

Hepatiitti B,C seul.	x	x									
MAI veri-vilj.		x									
Seerumin Crypt.an-tig.	x	x									
PPD&Te-tanus-kontr.	x										
Tetanus-toks.te-hoste	x										
Virtsa-anal.	x	x	pv.1		pv.1		pv.1		pv.1		Q4vk.
Thorax	x										
EKG	x	x									
HIV-DNA PCR	x	x	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
β-2-mikro-glob.	x	x	pv.1		pv.1		pv.1		pv.1		Q4vk.
Lymfos.-prof.	x	x	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	Q4vk.
ELISA&Wes-t.blot	x										Q4vk.
Seer. p24-antig.	x	x	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	Q4vk.

Plasman viremia	x	x	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	Q4vk.
Seer. CD4-IgG-prot.		x	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	päiv	viik	Q4vk.
DNA-PCR molemm.-geenivek-tor.			päiv.***	viik	päiv.***	viik	päiv.***	viik	päiv	viik	Q4vk.
DNA PCR HIV-DNA											
Seerumin anti-CD4-IgG Ab			pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.
Seerumin luovutus säil.	x	x	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	pv.1	viik	Q4vk.

päiv = päivittäin; viik = viikottain; * niiden testien frekvenssi, jotka on lueteltu "päivittäin" tai "viikottain", voidaan vähentää kun tutkimus etenee.
** Raskaustestitulokset saatava ennen infuusiota ja oltava negatiivinen.
*** Kts. myös taulukko 4.
Q ja q tarkoittavat "joka".

Taulukko IV

Seuranta lymfosyytti-infuusioiden aikana

	Ennen infuusiota	Infuusion aikana	Infuusion jälkeen
Lämpötila	x	Q15 min.	Qhx4, sitten Q4h*
Verenpaine	x	Q15 min.	Qhx4, sitten Q4h*
Pulssi	x	Q15min.	Qhx4, sitten Q4h*
Hengitysnopeus	x	Q15min.	Qhx4, sitten Q4h*
Tajuntataso	x	Q15min.	Qhx4, sitten Q4h*
Koehenkilön oireet	x	Q15min.	Qhx4, sitten Q4h*
Hapenkyllästys** (pulssioksimetrian avulla)	x	jatkuva**	jatkuvax4h**
Virtsan tuotto	x		Q8h
p24-antigeeni	x		
Solun eloonjäämisanalyysi (PCR kullekin vektorille)	hetkellä 0 (pussista)		5 min. 1, 2, 4, 6, 24h**
PCR HIV-DNA:lle	x		
Plasman viremia	x		24h

* toisessa ja neljännessä infuusiossa näitä parametrejä seurataan joka tunti vain 4 x, ellei komplikaatioita esiinny.

** seurannassa ensimmäisessä infuusiossa vain, ellei komplikaatioita esiinny.
Q ja q tarkoittavat "joka".

Vaikka keksintöä on kuvailtu viitaten tällä hetkellä edulliseen suoritusmuotoon, tulisi ymmärtää, että erilaisia modifikaatioita voidaan tehdä poikkeamatta keksinnön hengestä. Keksintöä rajoittavat vain seuraavat patenttivaatimukset.

Patenttivaatimukset:

1. Retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää tartuntakykyisen retroviruksen, jossa retroviruksen 5'- ja 3'-päiden pitkien terminaalisten säätelytoistojaksojen väliin on liitetty nukleiinihappo, joka koodittaa anti-HIV-tyyppistä spesifistä ainetta pol III -promoottorin ohjauksessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että anti-HIV-tyyppinen spesifinen aine on HIV-1-tyypin virukselle spesifinen ribotsyymi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että ribotsyymillä on olennaisesti sama sekvenssi, kuin Rz-1:llä tai Rz-2:lla merkityllä ribotsyymillä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että anti-HIV-tyyppinen spesifinen aine on HIV-2-tyypin virukselle spesifinen ribotsyymi.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että pol III -promoottori on ihmisen $tRNA^{Val}$-promoottori tai adenoviruksen VA1-promoottori.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että HIV-1-spesifinen ribotsyymi pilkkoo HIV-1:n johtosekvenssin alueella.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen retrovirusvektori, **tunnettu** siitä, että anti-HIV-tyyppinen spesifinen aine on antisense-molekyyli, jolla on kyky sitoutua HIV-nukleiinihappoon ja estää HIV:n replikointi.

8. pol III -promoottoritranskriptiokasetti, **tunnettu** siitä, että se on läsnä vektorissa pMJT tai pMJV.

9. Isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on pysyvästi transformoitu patenttivaatimuksen 1 mukaisella retrovirusvektorilla.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että isäntäsolu on kädellisen, hiiren/rotan tai ihmisen solu.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että isäntäsolu on fibroblastisolu, $CD4^+$ T -solu, sikiön napaverisolu, perifeerisen veren lymfosyyttisolu, perifeerisen veren mononukleaarinen solu tai hematopoeettinen kantasolu.

12. Menetelmä vieraan geenin ilmentymisen tai virusreplikaation häiritsemiseksi tai estämiseksi solussa, joka on infektoitunut vieraalla geenillä tai viruksella, **tunnettu** siitä, että solu transduktoidaan patenttivaatimuksen 1 mukaisella retrovirusvektorilla olosuhteissa, jotka suosivat retrovirusvektorin transduktiota ja nukleiinihapon pysyvää ilmentymistä solussa.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solu on ihmisen solu tai kädellisen solu.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ihmissolu on ihmisen fibroblastisolu, ihmisen $CD4^+$ T -solu, ihmisen perifeerisen veren lymfosyyttisolu, sikiön napaverisolu, ihmisen perifeerisen veren mononukleaarinen solu tai ihmisen hematopoeettinen kantasolu.

15. Menetelmä ihmisen immuunikatoviruksen ("HIV") virusinfektion estämiseksi solussa, joka on altis HIV-infektiolle, **tunnettu** siitä, että solu transduktoidaan patenttivaatimuksen 1 mukaisella retrovirusvektorilla olosuhteissa, jotka suosivat retrovirusvektorin transduktiota ja nukleiinihapon pysyvää ilmentymistä solussa.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solu on ihmisen solu tai hiiren/rotan solu.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ihmissolu on ihmisen fibroblastisolu, ihmisen

$CD4^+$ T -solu, sikiön napaverisolu, ihmisen perifeerisen veren lymfosyyttisolu, ihmisen perifeerisen veren mononukleaarinen solu tai ihmisen hematopoeettinen kantasolu.

18. Patenttivaatimuksen 12 tai 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** edelleen siitä, että annetaan retrovirusvektorilla transduktoitu solu saman lajin nisäkkäälle kuin mistä transduktoitu solu saatiin.

19. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että retrovirusvektorilla transduktoitu solu on saatu nisäkkäältä, joka on vastaanottanut transduktoidun solun.

20. anti-HIV-1-tyypille spesifinen ribotsyymi, **tunnettu** siitä, että se sisältää sekvenssin, joka on olennaisesti sama kuin ribotsyymin sekvenssi, jota merkitään Rz-2:lla.

FIG. 1(A)

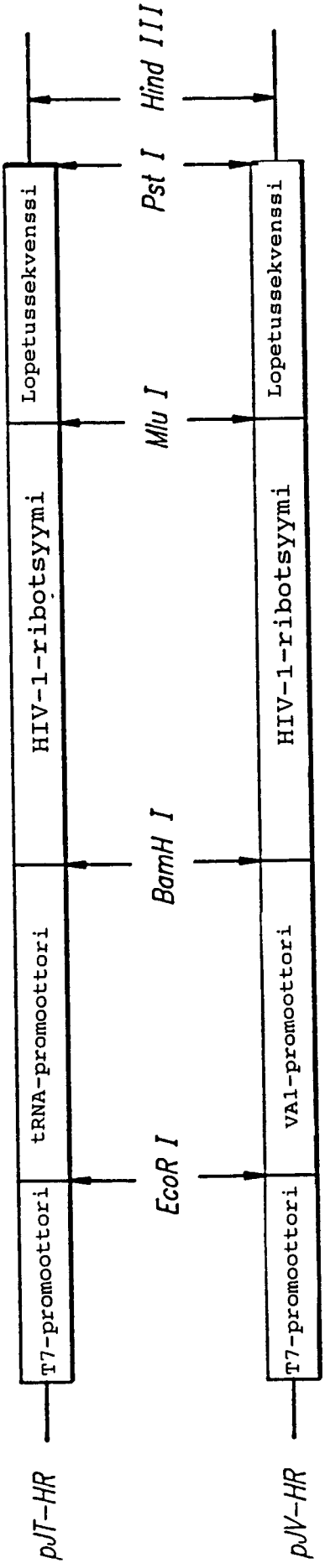

pJT-HR
T7-promoottori
tRNA-promoottori
HIV-1-ribotsyymi
Lopetussekvenssi
pJV-HR
T7-promoottori
VA1-promoottori
HIV-1-ribotsyymi
Lopetussekvenssi
EcoR I
BamH I
Mlu I
Pst I
Hind III

FIG. 1(B)

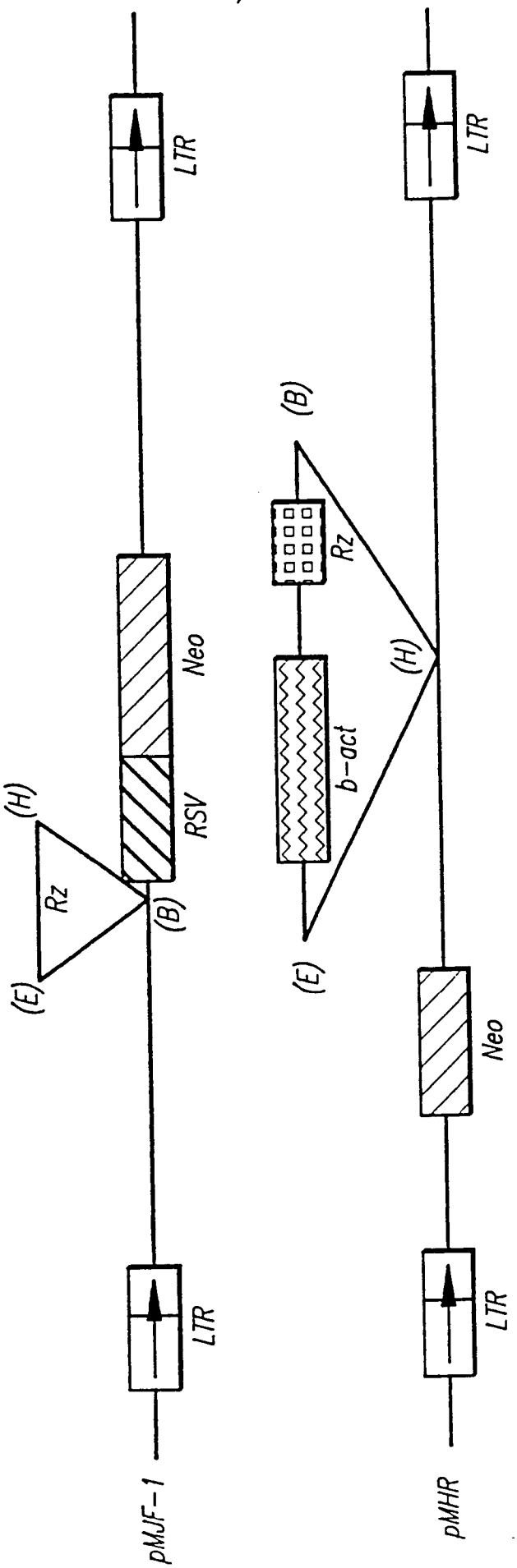


FIG. 1(C)

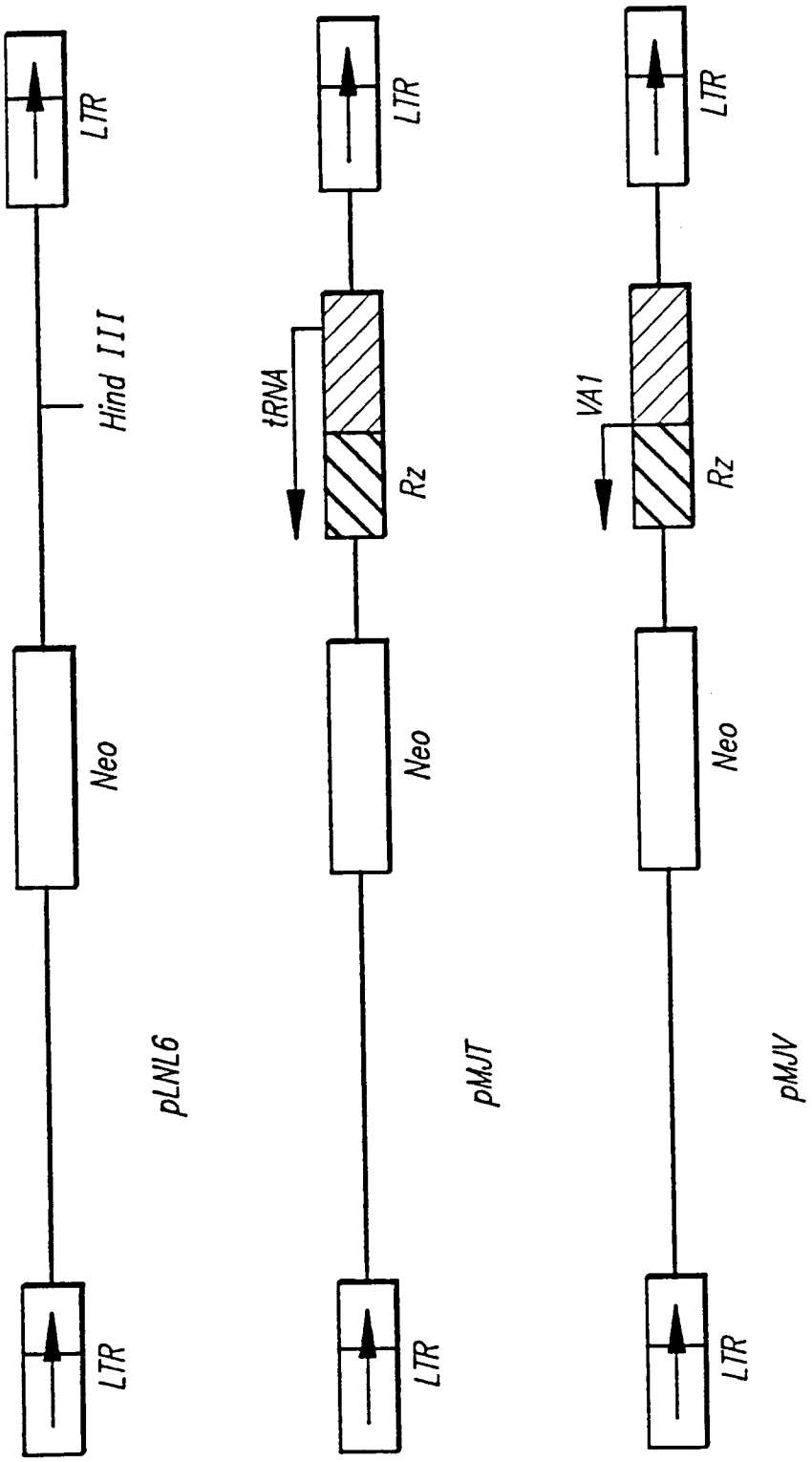

LTR
Hind III
Neo
LTR
pLNL6
LTR
tRNA
Rz
Neo
LTR
pMJT
LTR
VA1
Rz
Neo
LTR
pMJV

FIG. 2A

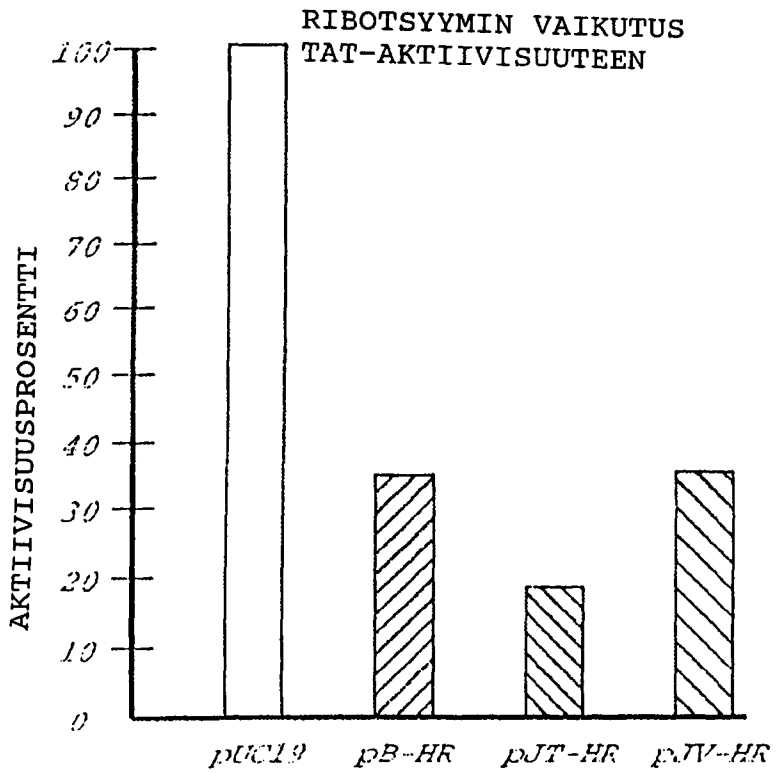
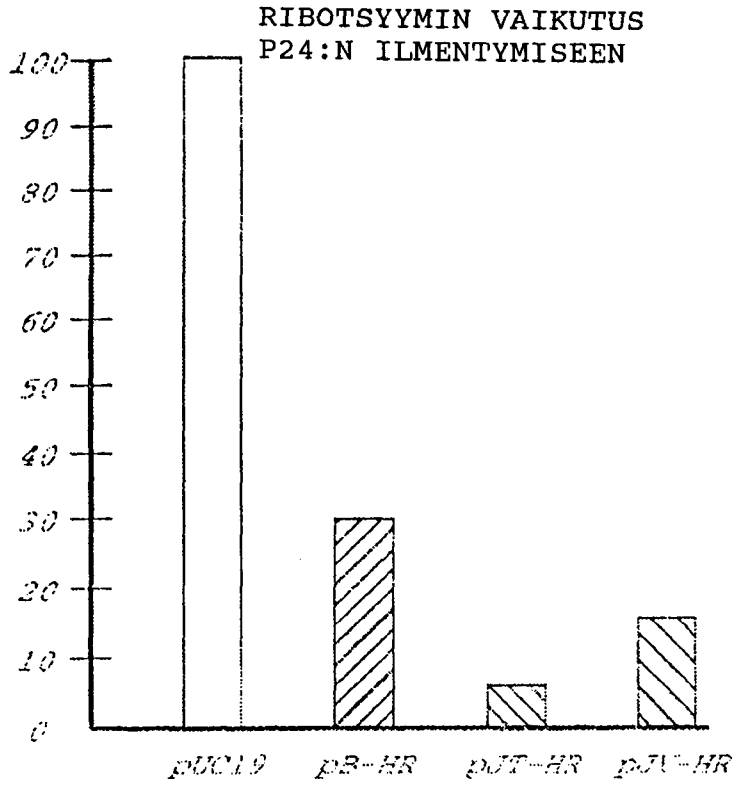


FIG. 2B



pJV-HR	-	+
pHxB2gpt	+	+



1 2

FIG. 2C

FIG. 3

HIV-1:N JOHTOSEKVENSSIT
RIVEITTÄIN (HIUSNEULA-
RIBOTSYYMIN KOHDE)

HXB2	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT
MN	TG	CCC	GTC	TGT	TaT	GT
SF2	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT
RF	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT
HAN	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT
ELI	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT
Z2Z6	TG	CCC	GTC	TGT	TGT	GT

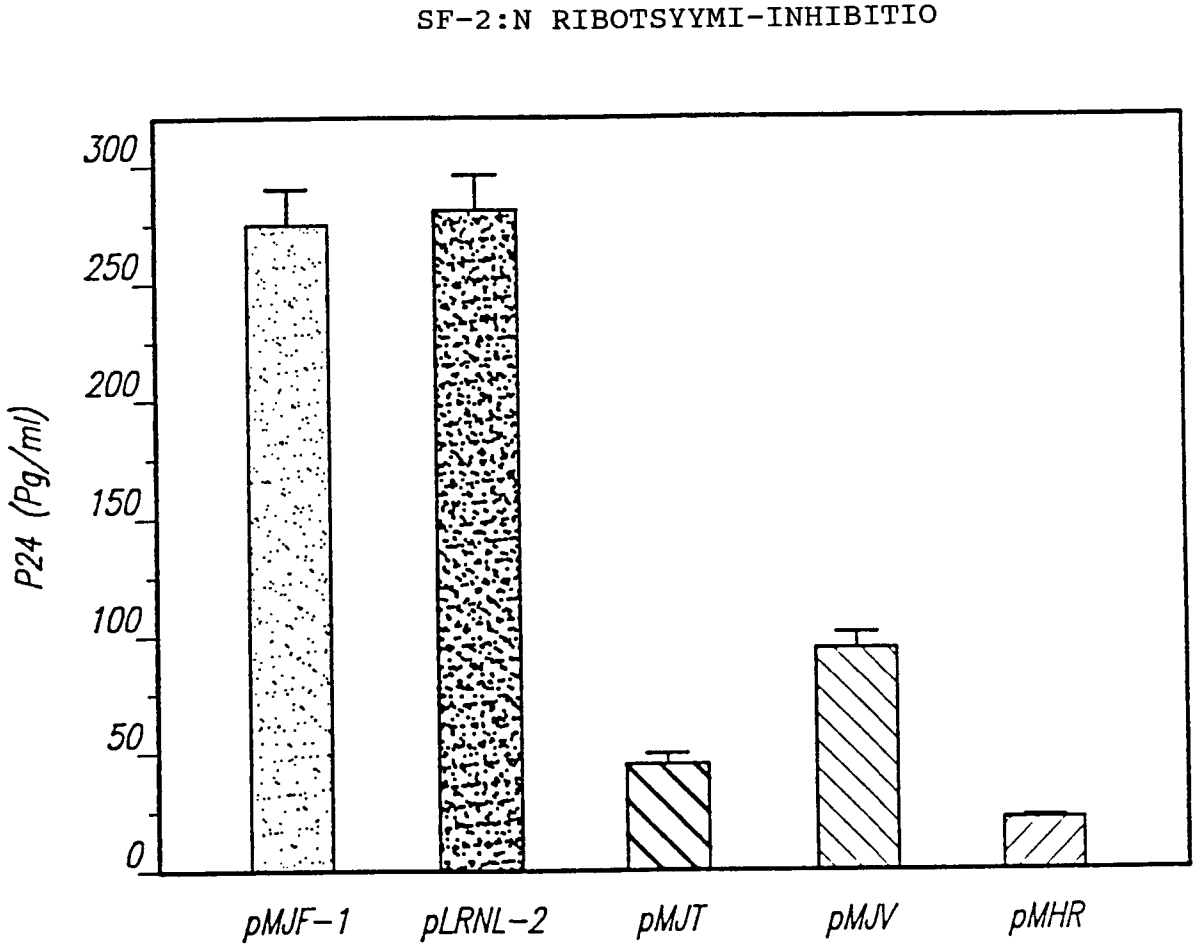

SF-2:N RIBOTSYYMI-INHIBITIO
P24 (Pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
pMJF-1
pLRNL-2
pMJT
pMJV
pMHR

FIG. 4(A)

FIG. 4B

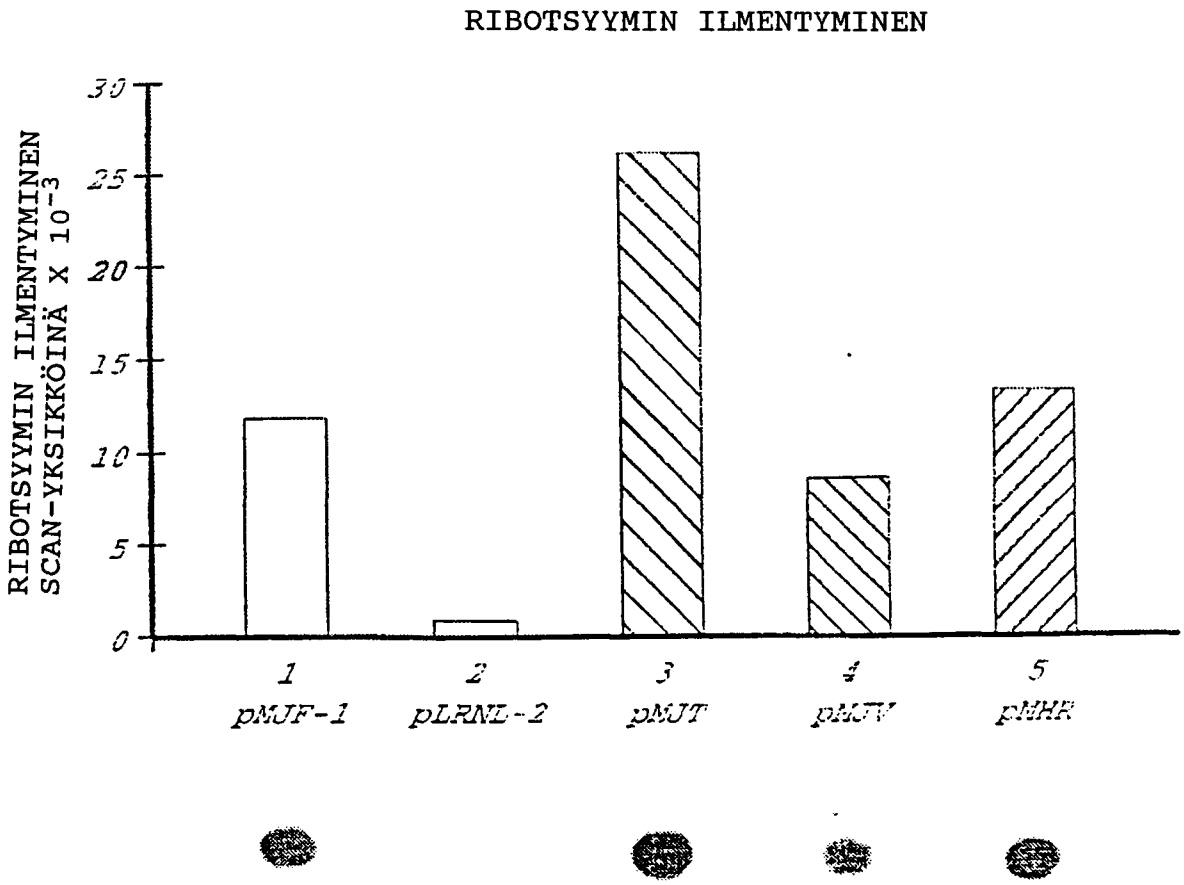
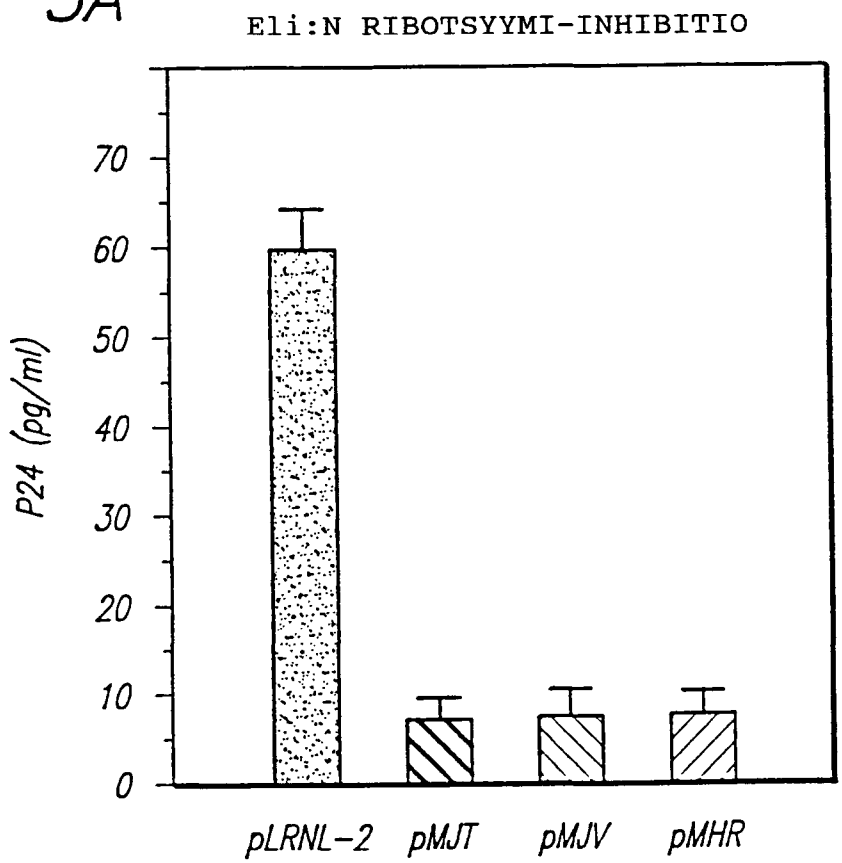

RIBOTSYYMIN ILMENTYMINEN
RIBOTSYYMIN ILMENTYMINEN SCAN-YKSIKKÖINÄ X 10^{-3}
30
25
20
15
10
5
0
1
pMUF-1
2
pLRNL-2
3
pMUT
4
pMUT'
5
pMHR

FIG. 5A


Eli:N RIBOTSYYMI-INHIBITIO
P24 (pg/ml)
70
60
50
40
30
20
10
0
pLRNL-2
pMJT
pMJV
pMHR

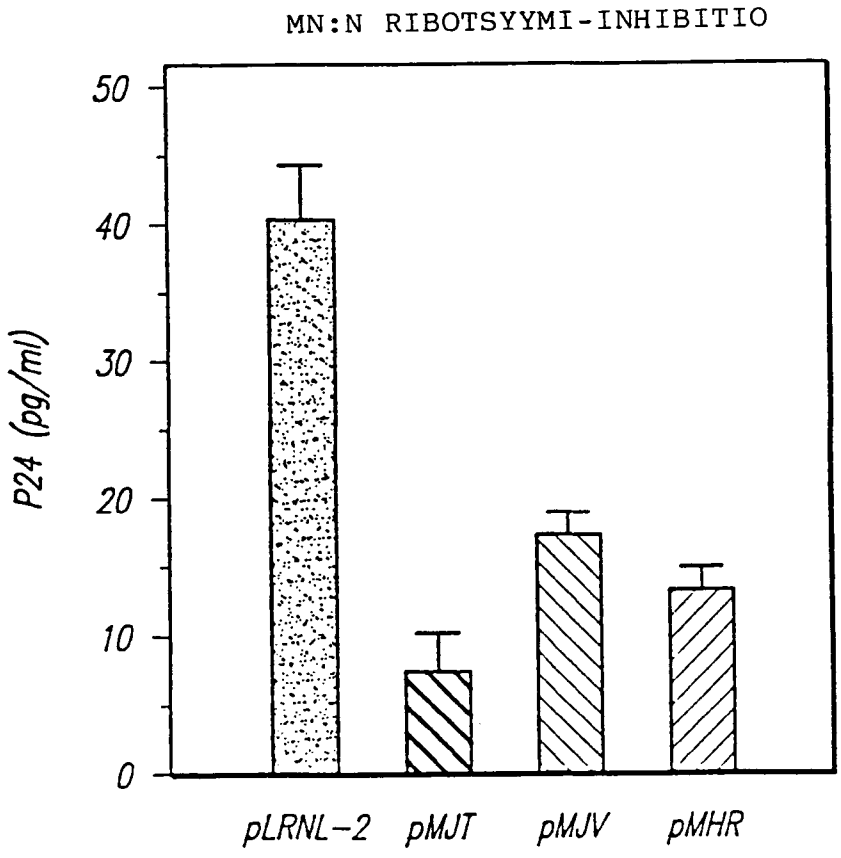

MN:N RIBOTSYYMI-INHIBITIO
P24 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
pLRNL-2
pMJT
pMJV
pMHR

FIG. 5B

FIG. 6A

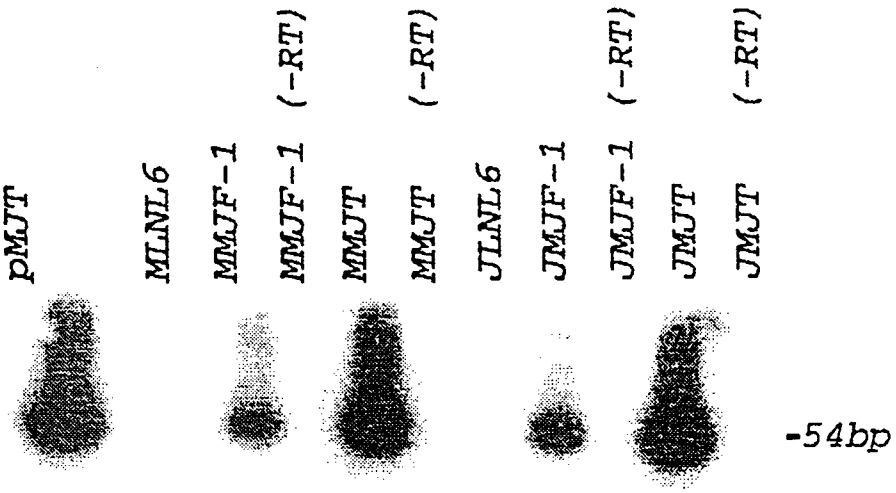
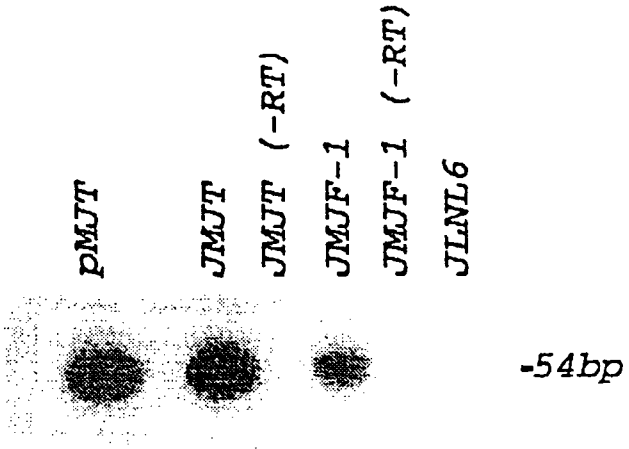

pMJT
MLNL6
MMJF-1
MMJF-1 (-RT)
MMJT
MMJT (-RT)
JLNL6
JMJF-1
JMJF-1 (-RT)
JMJT
JMJT (-RT)
-54bp

FIG. 6B


pMJT
JMJT
JMJT (-RT)
JMJF-1
JMJF-1 (-RT)
JLNL6
-54bp

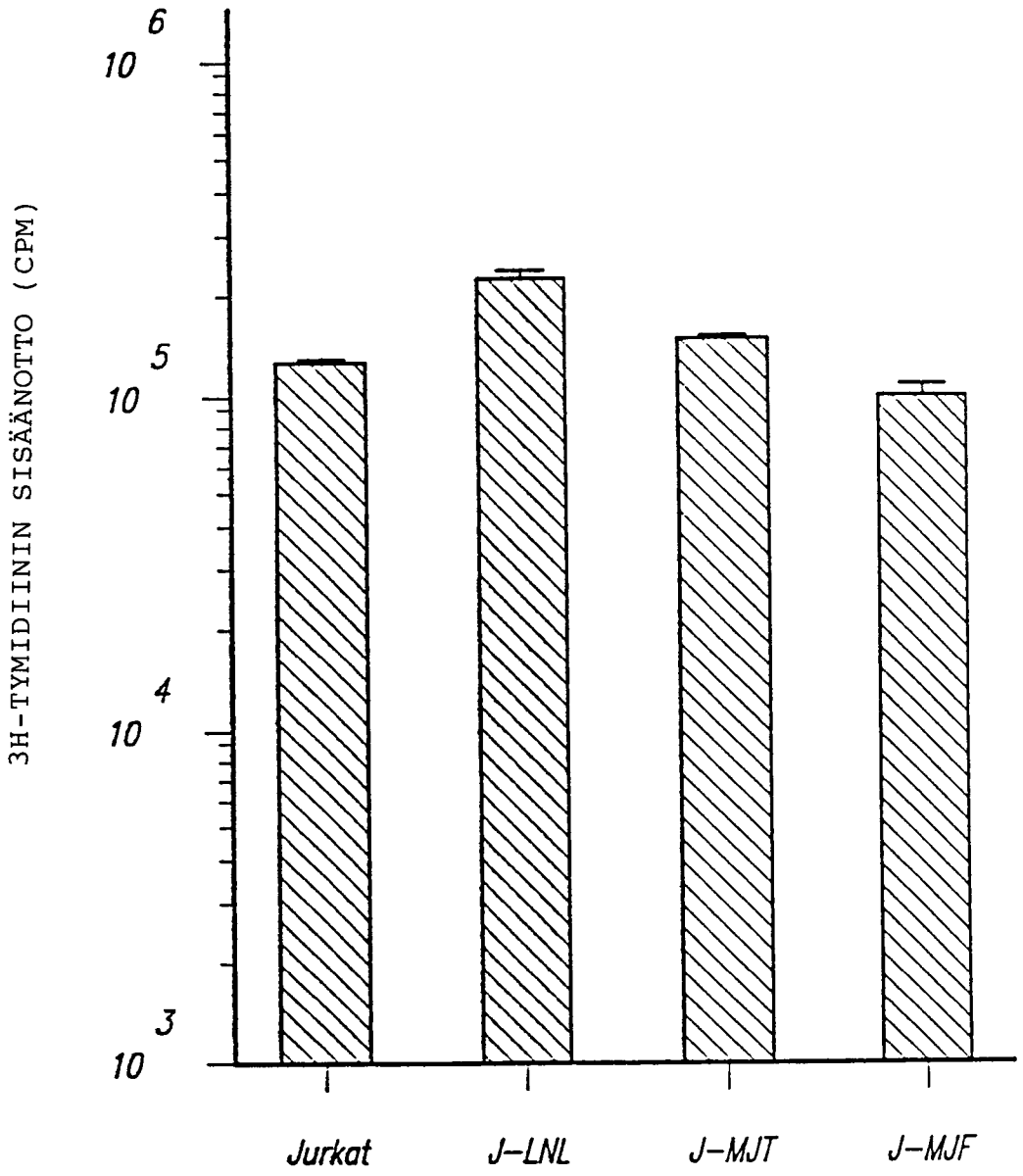
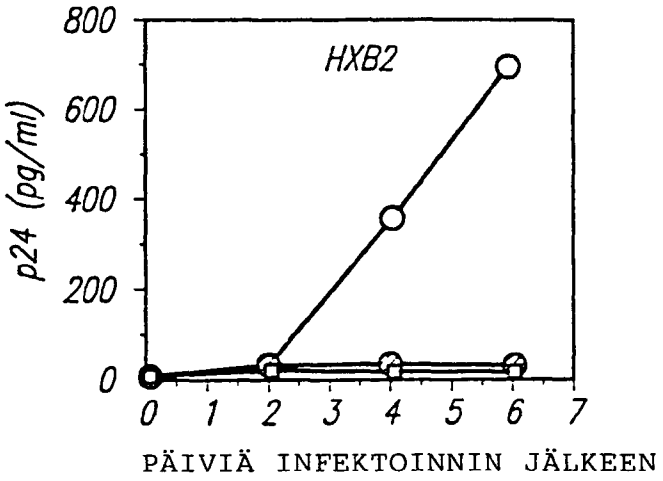

3H-TYMIDIININ SISÄÄNOTTO (CPM)
10 6
10 5
10 4
10 3
Jurkat
J-LNL
J-MJT
J-MJF

FIG. 7

FIG. 8A


HXB2
p24 (pg/ml)
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

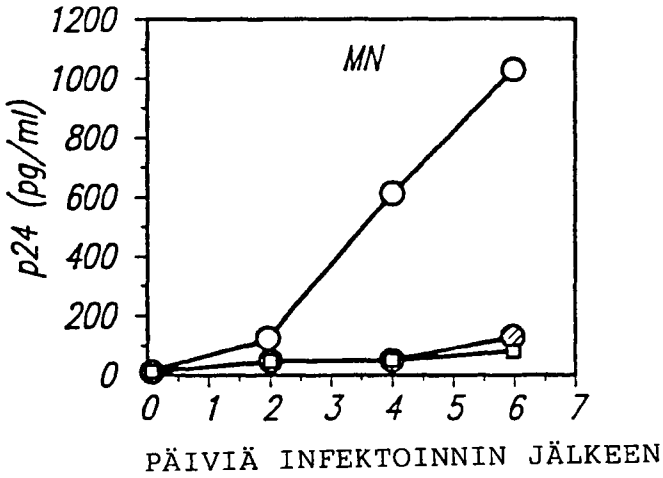
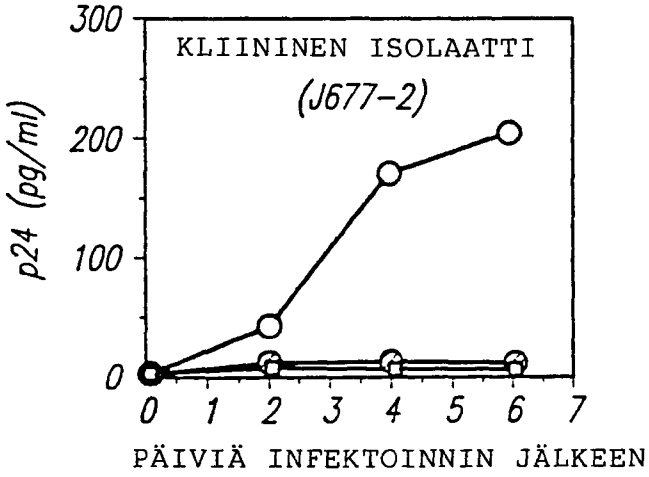

MN
p24 (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

FIG. 8B

FIG. 8C


300
200
100
0
p24 (pg/ml)
KLIININEN ISOLAATTI
(J677-2)
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

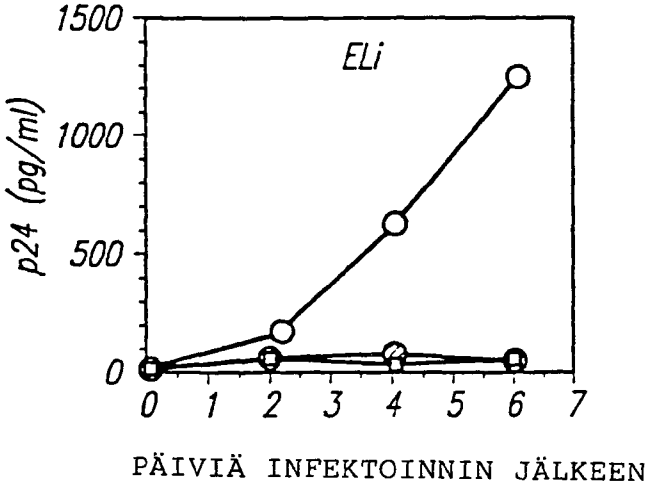
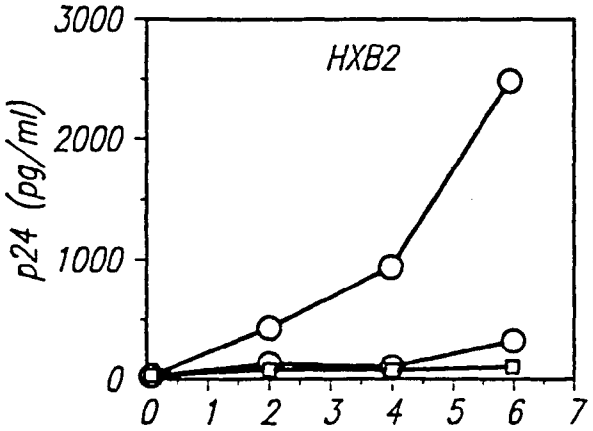

1500
1000
500
0
p24 (pg/ml)
ELi
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

FIG. 8D

FIG. 9A


HXB2
p24 (pg/ml)
3000
2000
1000
0
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

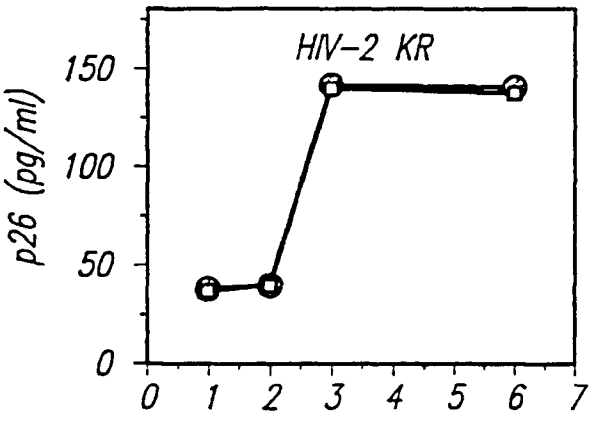

HIV-2 KR
p26 (pg/ml)
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 7
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

FIG. 9B

FIG. 10

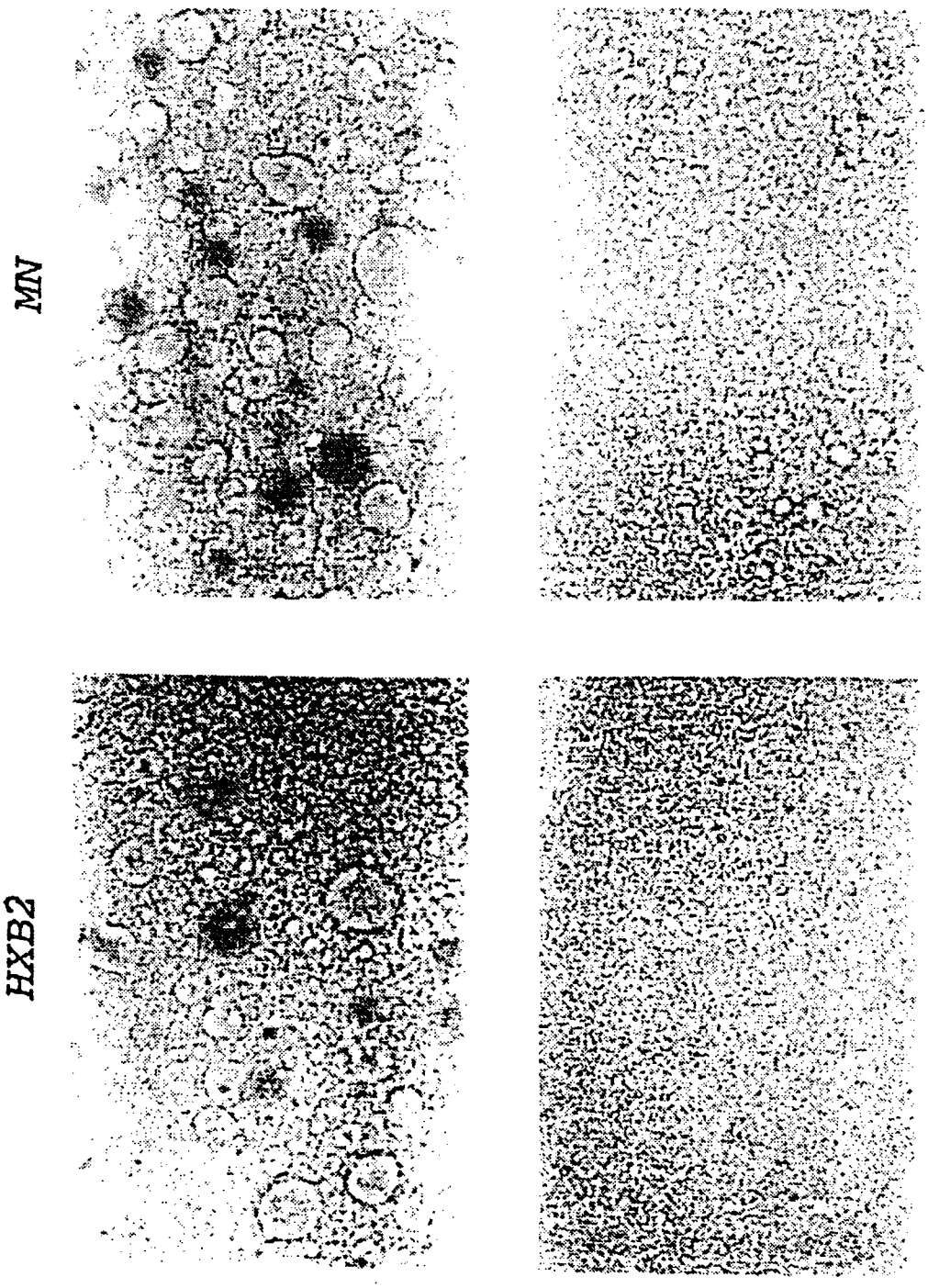


FIG. 11(A)

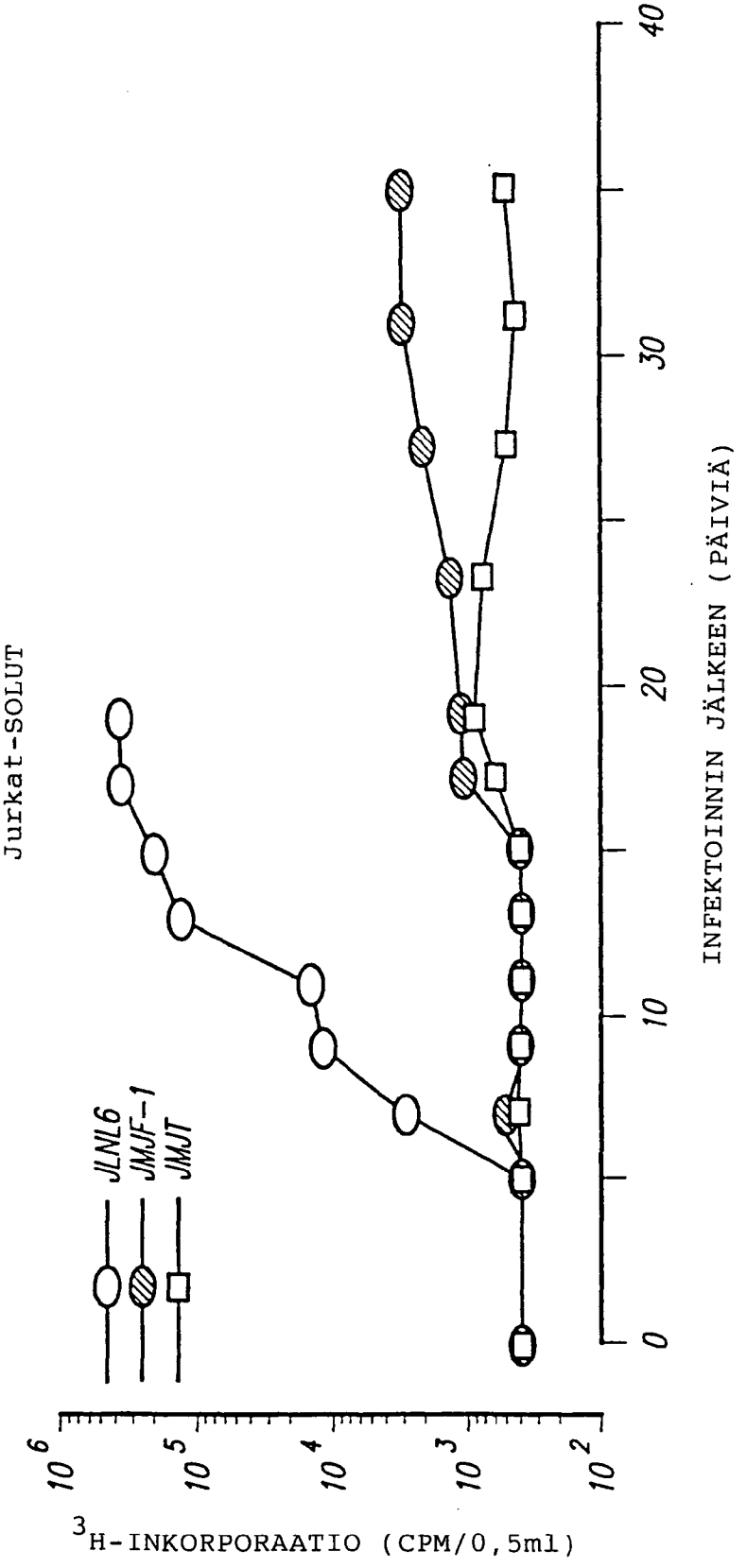

Jurkat-SOLUT
JLNL6
JMJF-1
JMJT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
^{3}H-INKORPORAATIO (CPM/0,5ml)
0
10
20
30
40
INFEKTOINNIN JÄLKEEN (PÄIVIÄ)

FIG. 11(B)

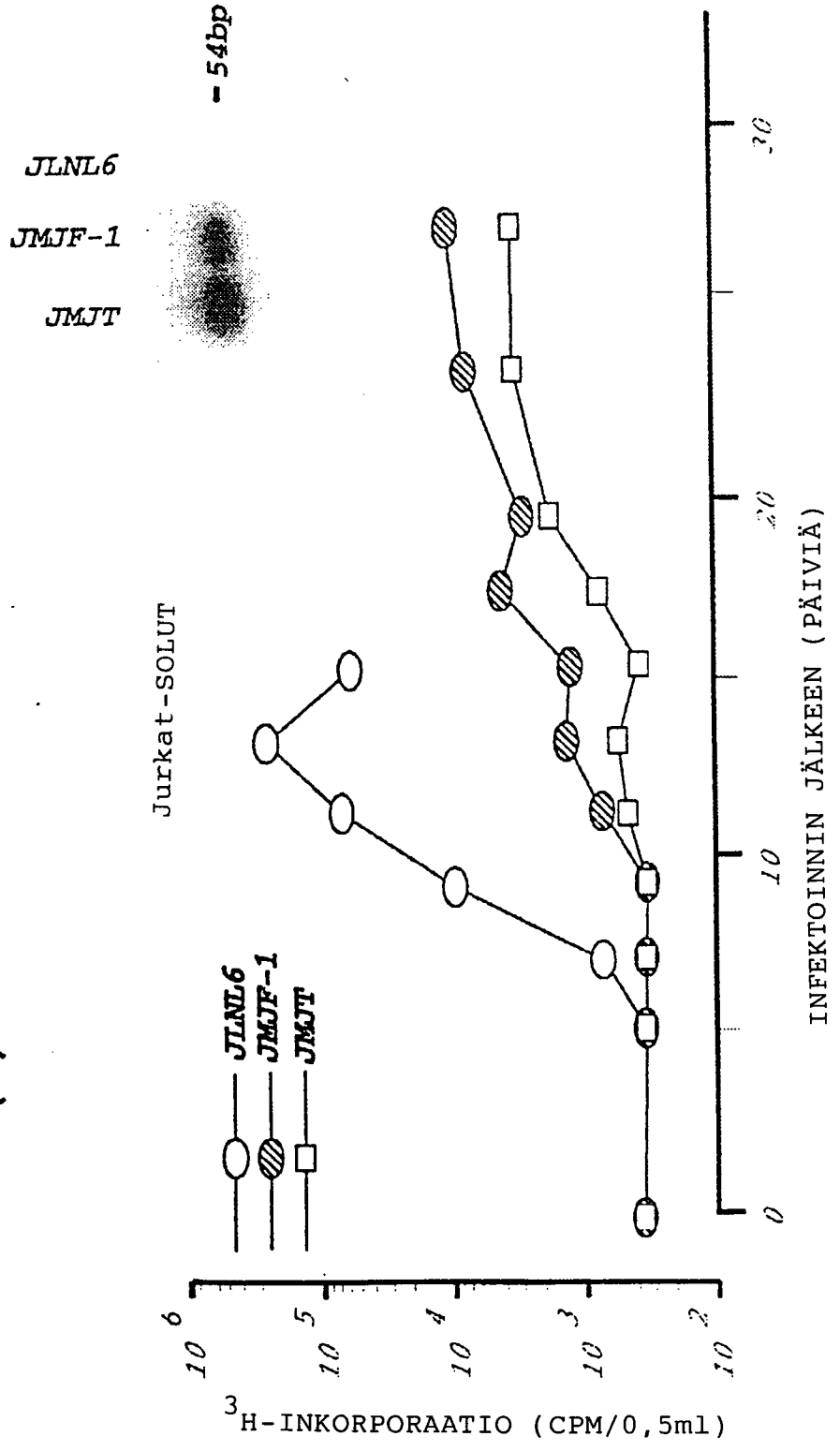
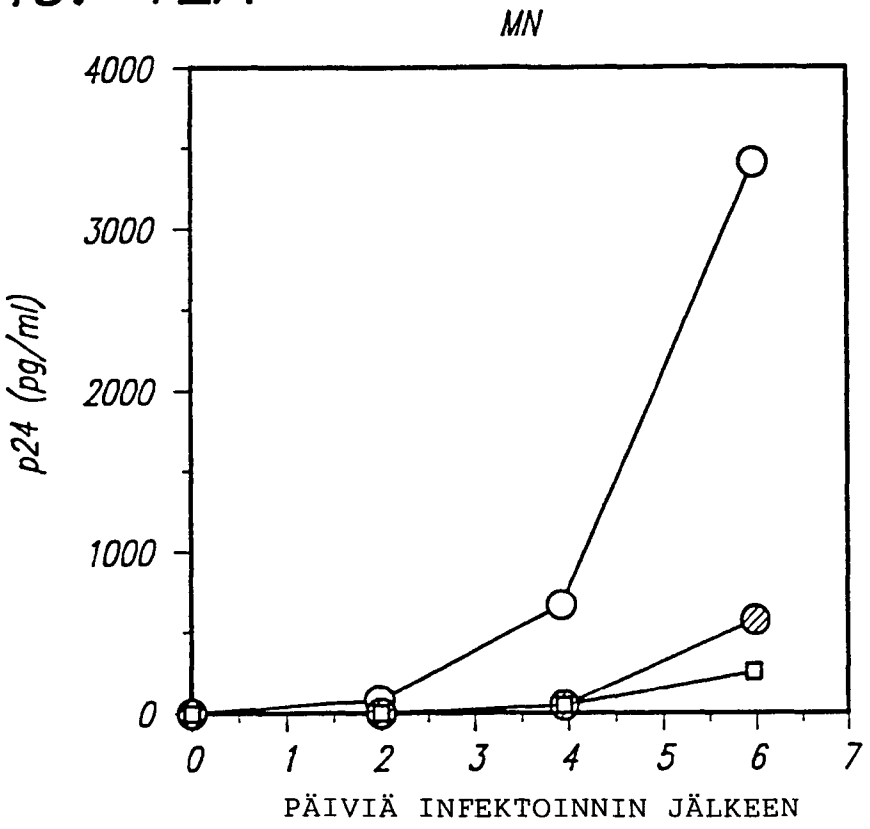

- 54bp
JLNL6
JMJF-1
JMJT
Jurkat-SOLUT
JLNL6
JMJF-1
JMJT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
^{3}H-INKORPORAATIO (CPM/0,5ml)
0
10
20
30
INFEKTOINNIN JÄLKEEN (PÄIVIÄ)

FIG. 12A



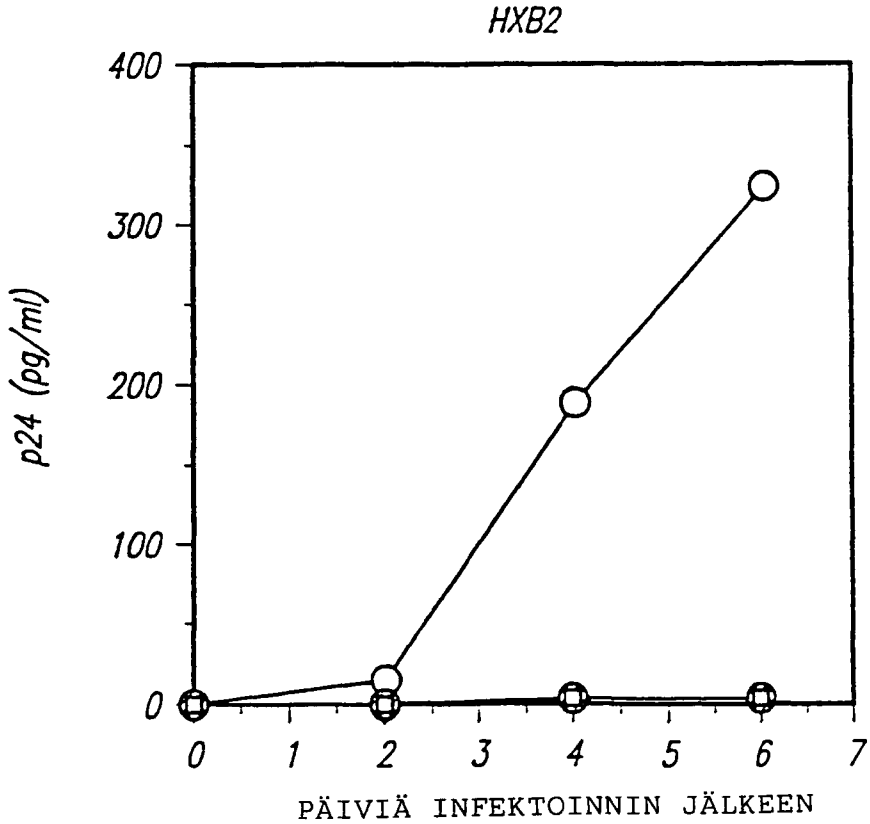


FIG. 12B

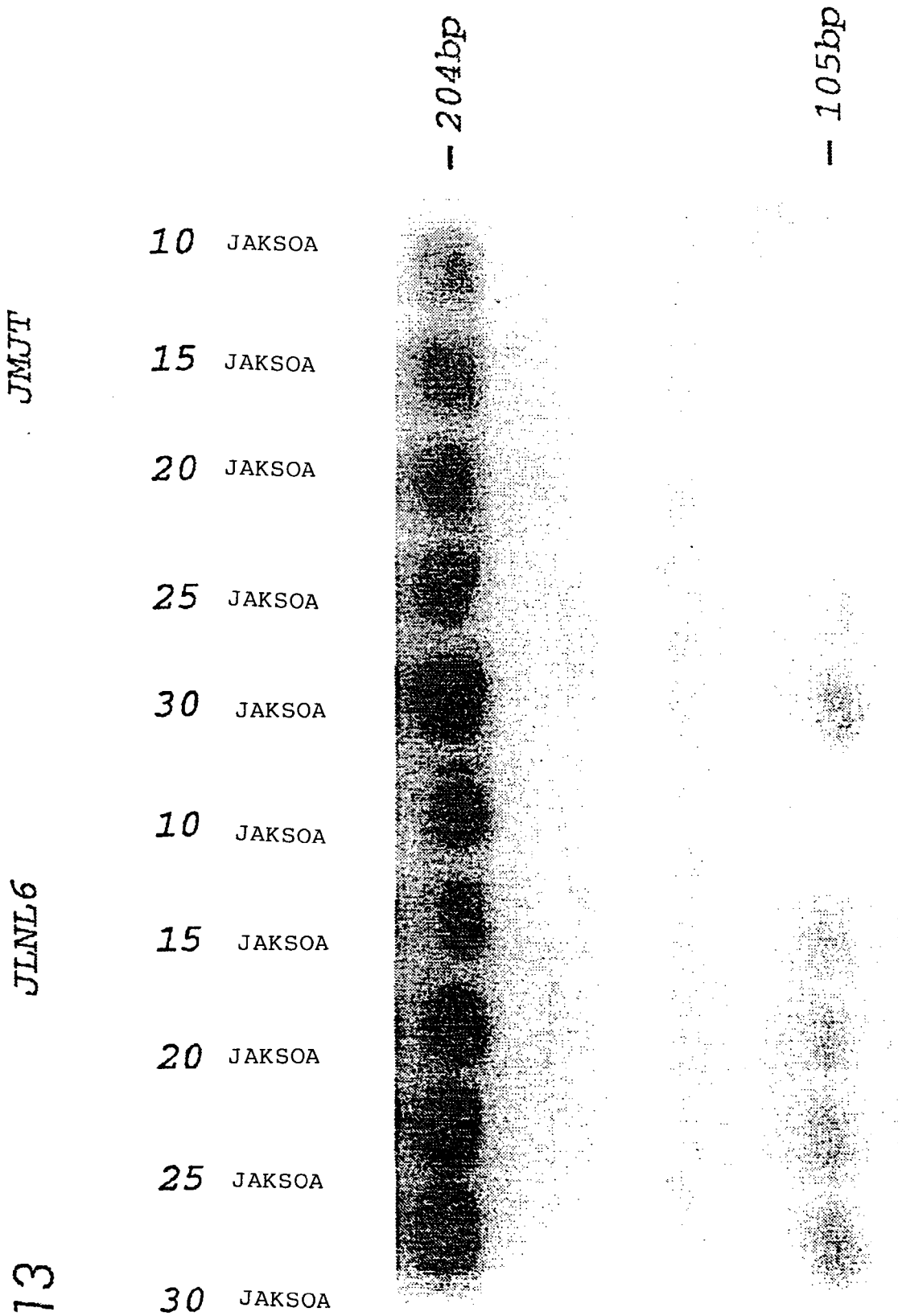

204bp
105bp
JMJT
10 JAKSOA
15 JAKSOA
20 JAKSOA
25 JAKSOA
30 JAKSOA
JLNL6
10 JAKSOA
15 JAKSOA
20 JAKSOA
25 JAKSOA
30 JAKSOA

FIG. 13

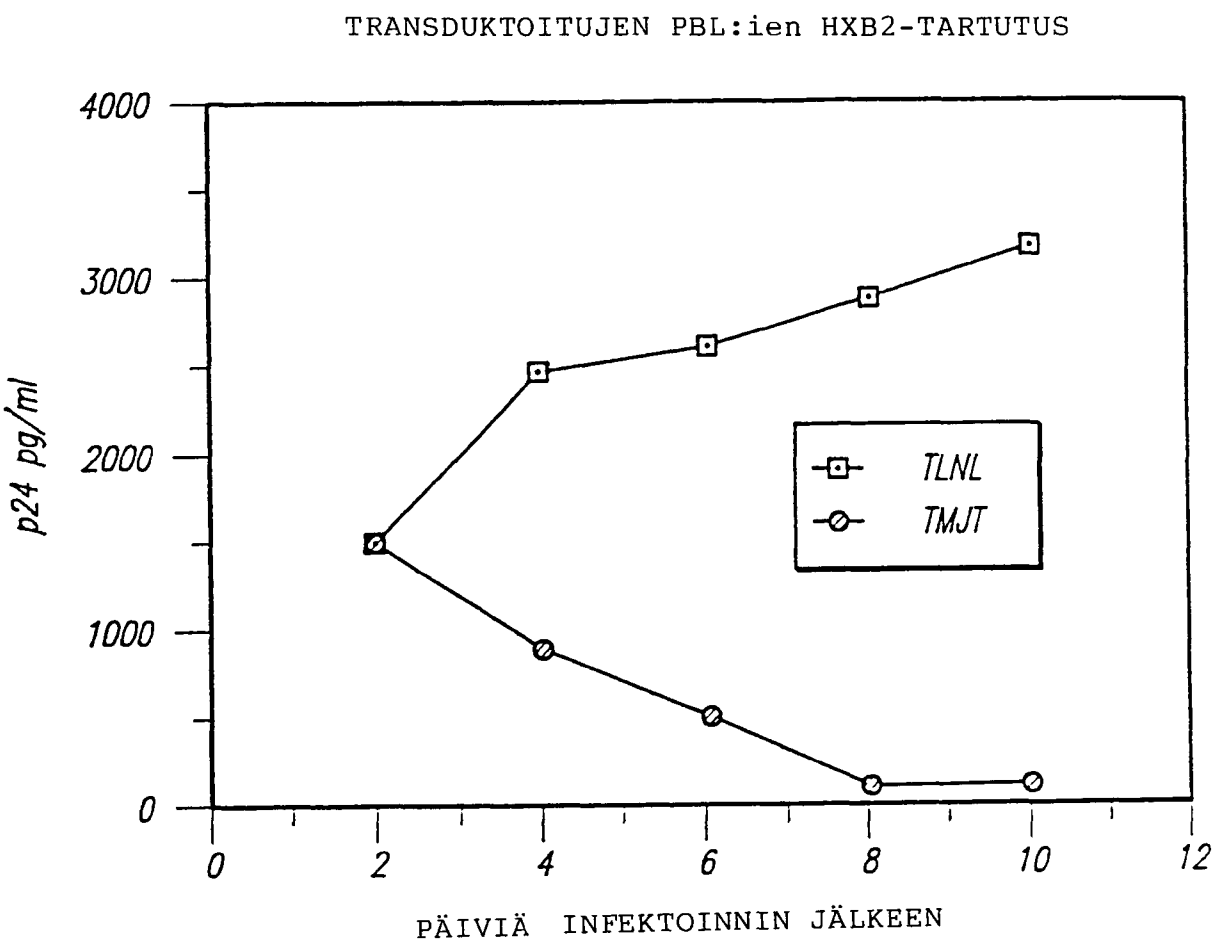
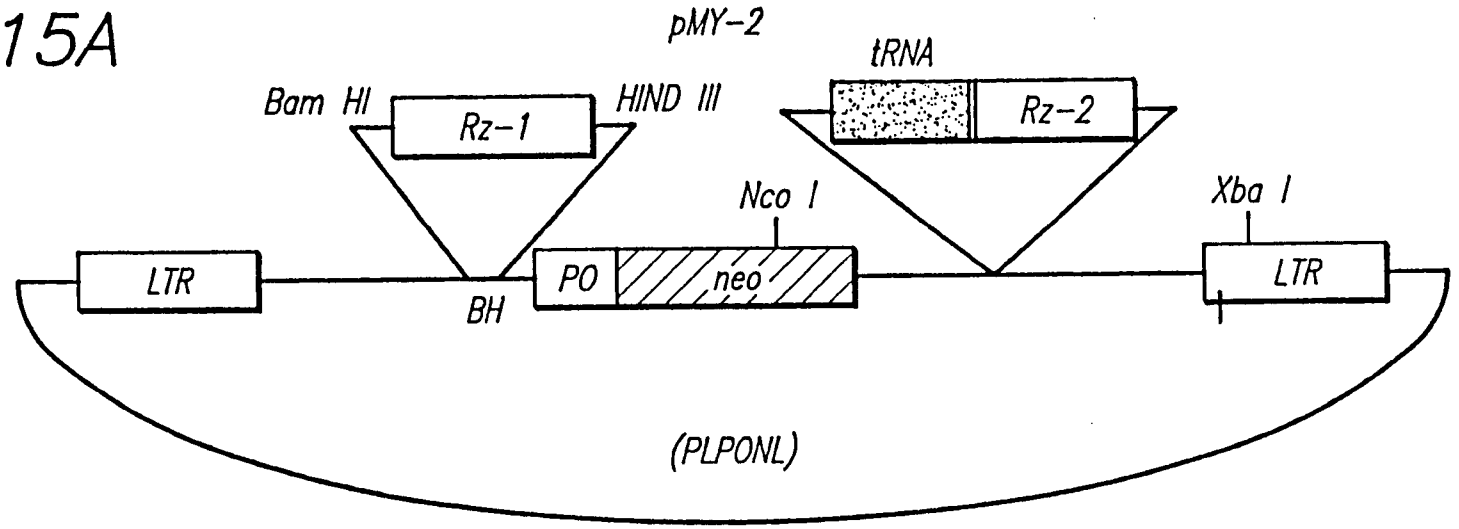

TRANSDUKTOITUJEN PBL:ien HXB2-TARTUTUS
4000
3000
2000
1000
0
p24 pg/ml
TLNL
TMJT
0
2
4
6
8
10
12
PÄIVIÄ INFEKTOINNIN JÄLKEEN

FIG. 14

FIG. 15A



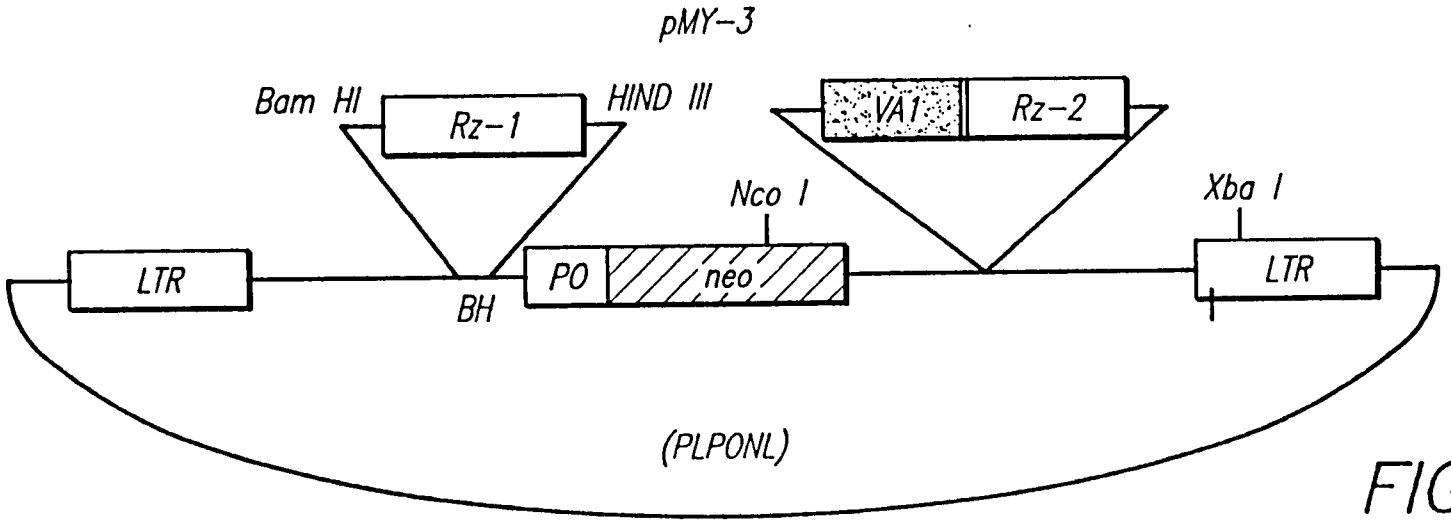
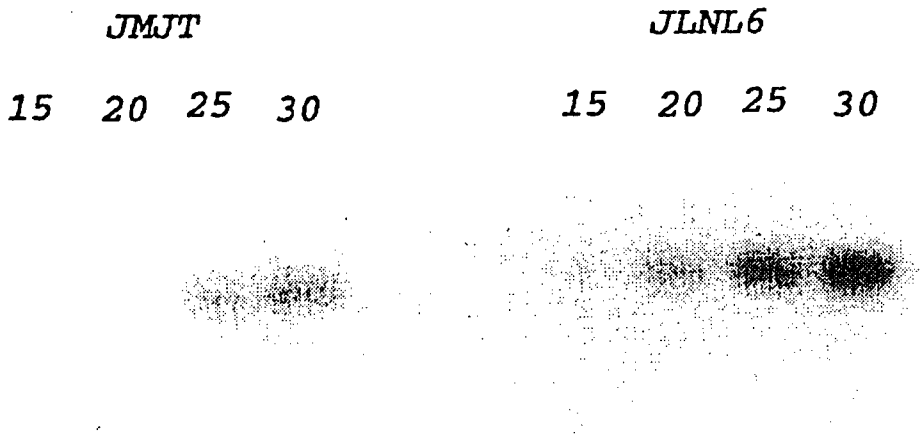


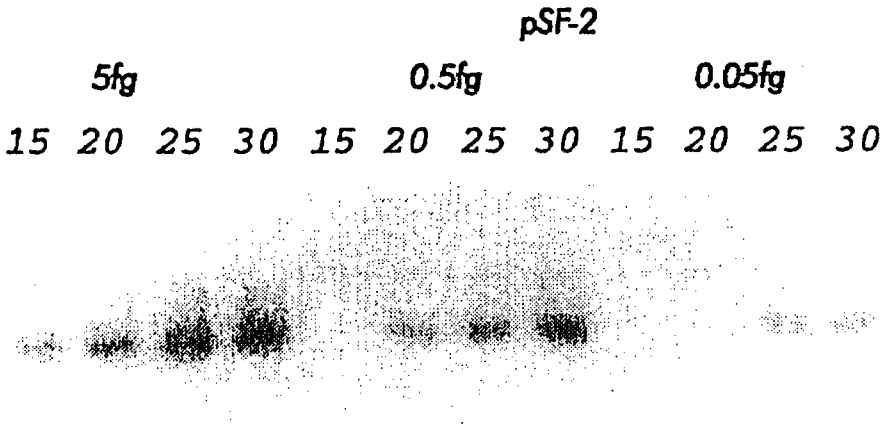
FIG. 15B

FIG. 16(A)



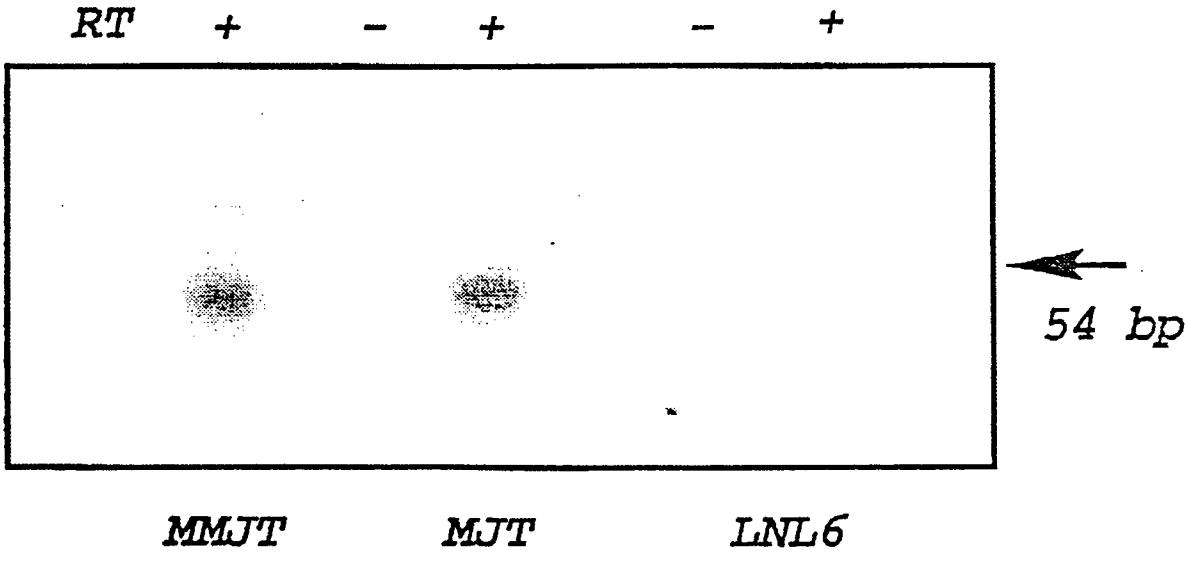
(2. PCR:N JAKSOJA)

FIG. 16(B)



(2. PCR:N JAKSOJA)

FIG. 17



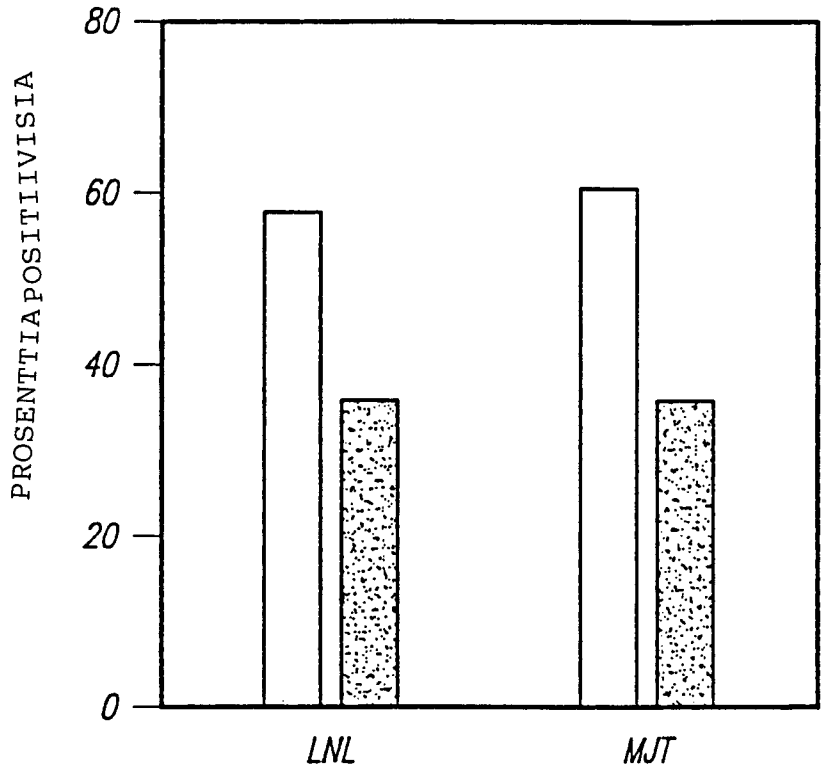


FIG. 18B

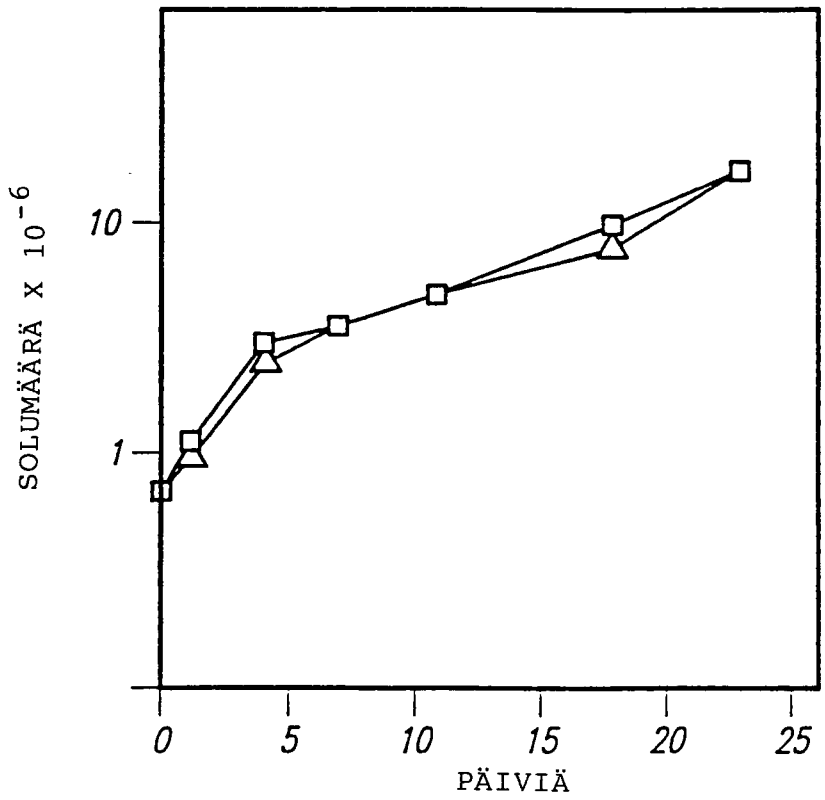


FIG. 18A

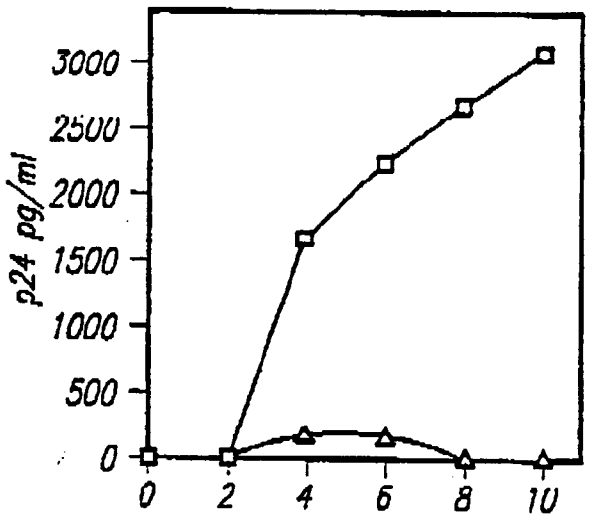


FIG. 19A

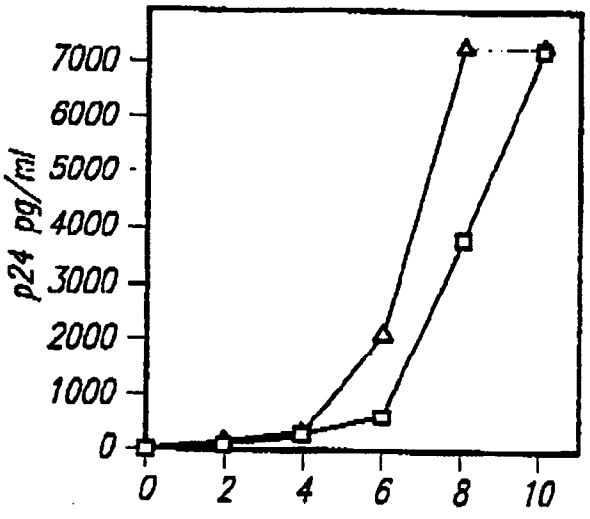


FIG. 19B

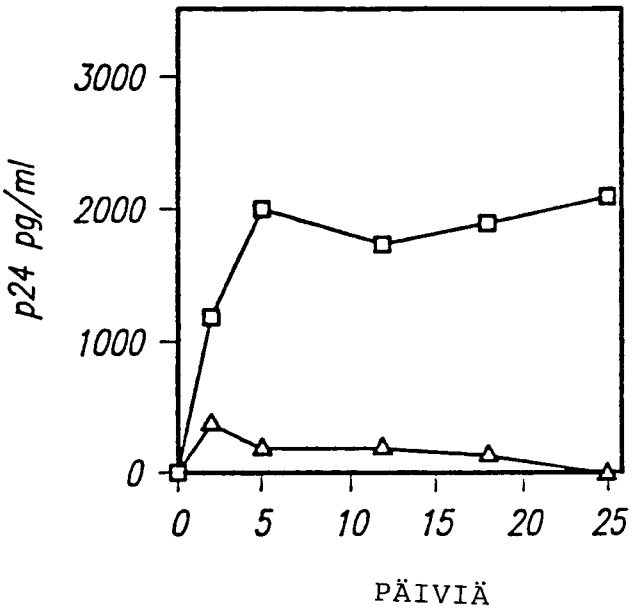


FIG. 19C

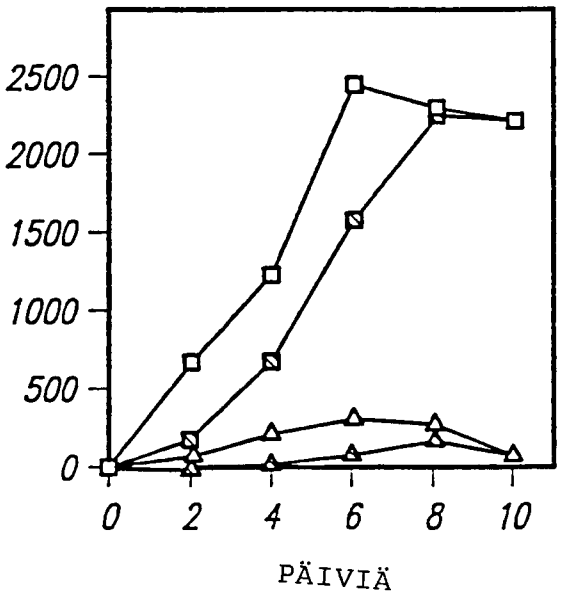


FIG. 19D

FIG. 20A

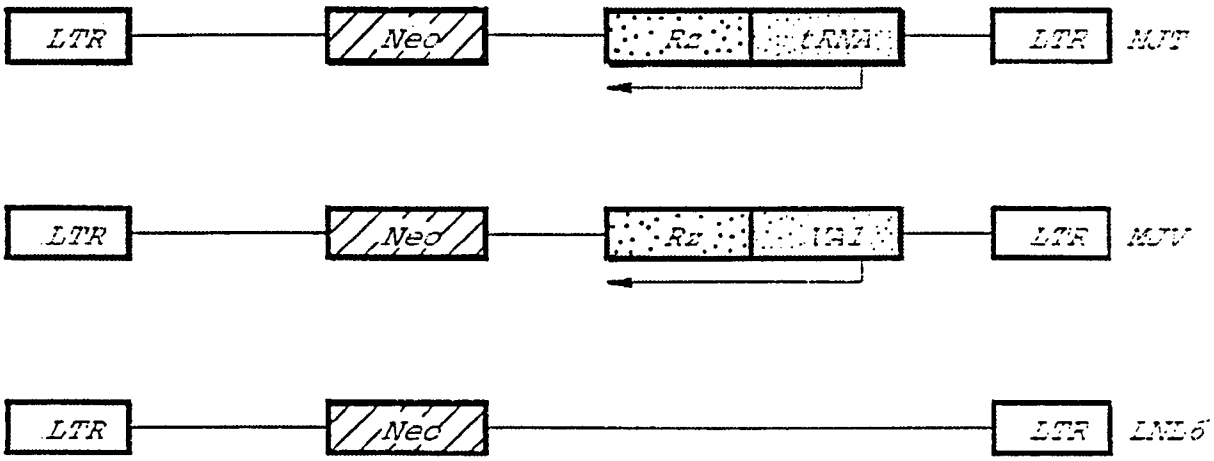
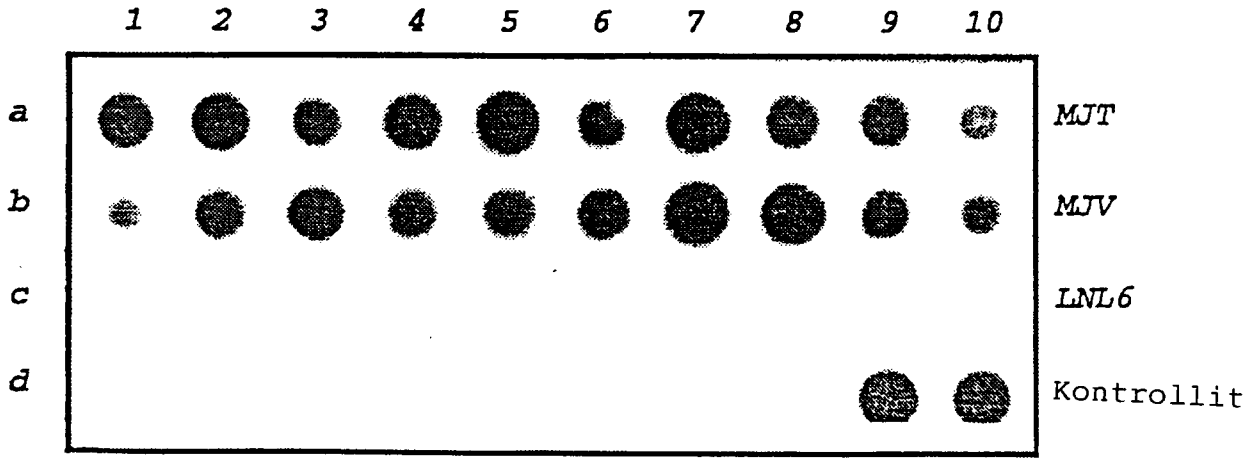


FIG. 20B



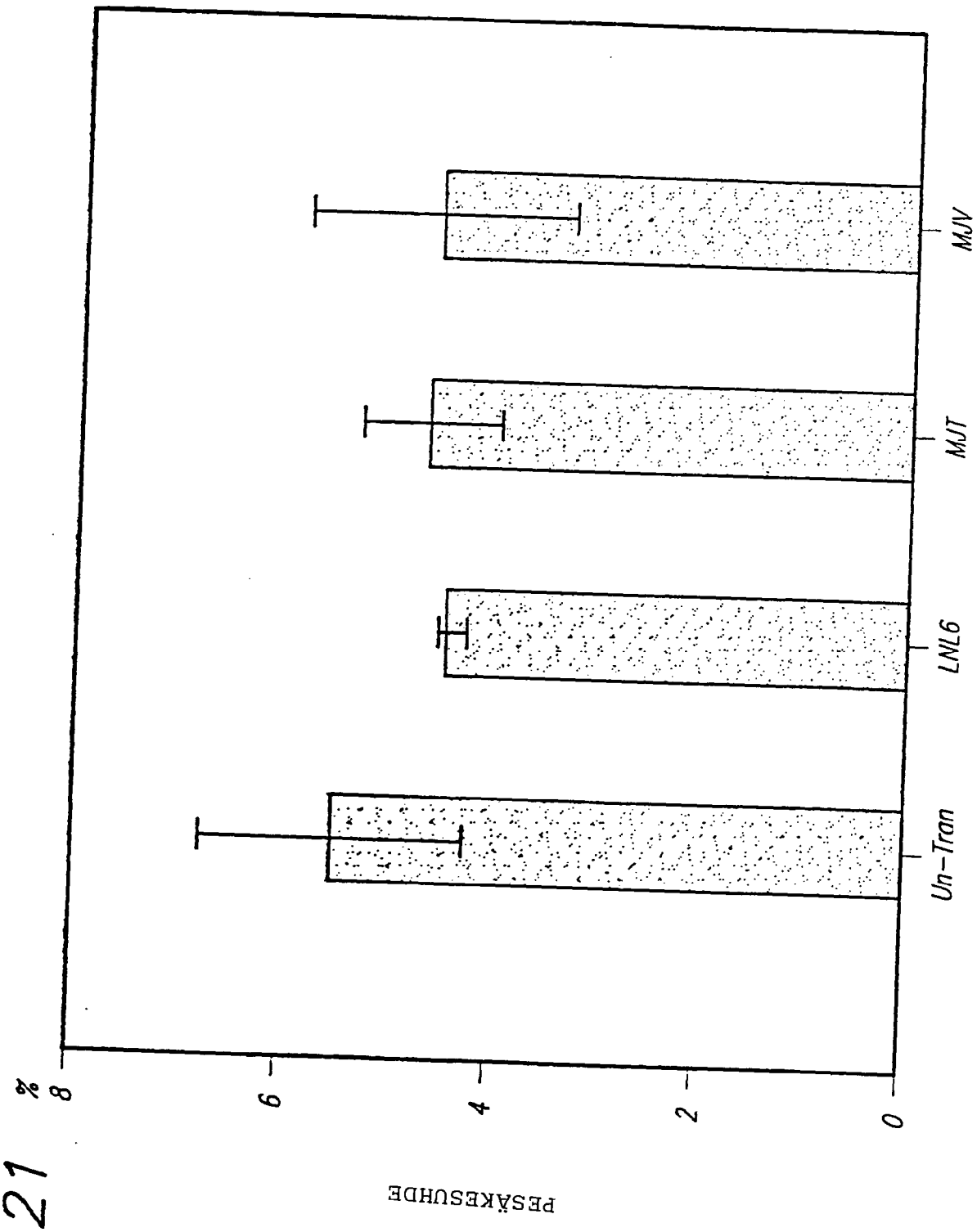


FIG. 21

FIG. 22A

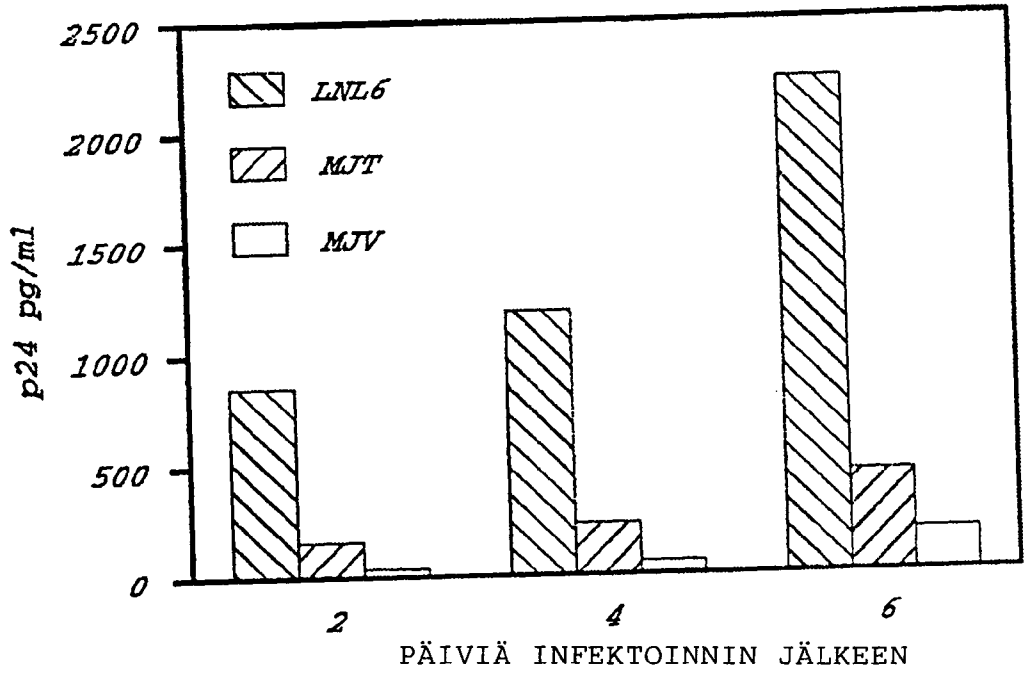


FIG. 22B

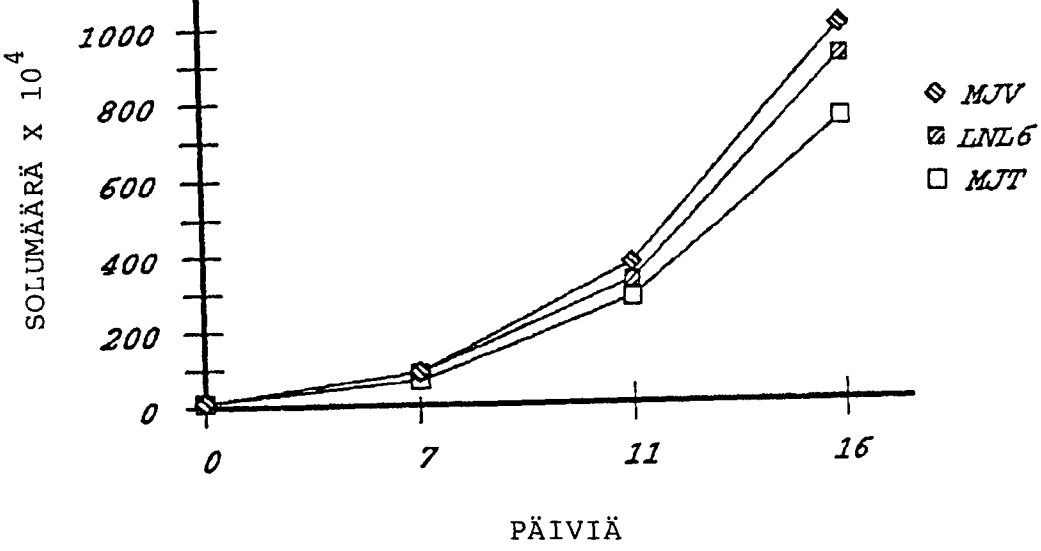


FIG. 22C

