



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330233

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*C12N 15/11 (2006.01)*

*C12N 15/45 (2006.01)*

*A61K 39/12 (2006.01)*

*A61K 39/17 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20011294	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.09.14 PCT/US1999/21081
(22)	Inng.dag	2001.03.14	(85)	Videreføringsdag	2001.03.14
(24)	Løpedag	1999.09.14	(30)	Prioritet	1998.09.14, US, 152845
(41)	Alm.tilgj	2001.05.11			
(45)	Meddelt	2011.03.07			
(73)	Innehaver	Mount Sinai School of Medicine of New York University, One Gustave Levy Place, New York, NY 10029-6574, US-, USA			
(72)	Oppfinner	Peter Palese, Leonia, NJ, US-, USA Adolfo Garcia-Sastre, New York, NY, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Rekombinant Newcastle-sykdomsvirus-RNA-ekspressjonssystem, kimært virus, fremgangsmåte for fremstilling, rekombinant celle og vaksiner</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9610400 A1, EP 702085 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse gjelder genetisk modifiserte Newcastle-sykdomsvirus og virusvektorer som uttrykker heterologe gener eller muterte Newcastle-sykdomsvirusgener eller en kombinasjon av virusgener avledet fra forskjellige stammer av Newcastle-sykdomsvirus. Oppfinnelsen gjelder konstruksjon og anvendelse av rekombinante negativ tråd-NDV-virus-RNA-templater som kan anvendes med viral RNA-styrt RNA polymerase for ekspressjon av heterologe genprodukter i egnede vertsceller, og/eller for gjenvinning av det heterologe gen i viruspartikler. I en spesifikk utførelse av oppfinnelsen er det heterologe genprodukt et peptid eller protein avledet fra genomet til et humant immundefisiensvirus. RNA-templatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved transkripsjon av egnede DNA-sekvenser ved anvendelse av enhver DNA-styrt RNA-polymerase, for eksempel polymerase fra bakterie fag T7 eller T3, SP6-polymerase eller eukaryot polymerase I.

## 1. Innledning

Foreliggende oppfinnelse gjelder rekombinante Newcastle-sykdomsvirus-RNA-templater som kan anvendes for ekspresjon av heterologe genprodukter i egnede  
5 vertscellesystemer og/eller for konstruksjon av rekombinante virus som uttrykker, pakker og/eller presenterer det heterologe genprodukt. Ekspresjonsproduktene og de kimære virus kan med fordel anvendes i vaksinepreparater. Foreliggende oppfinnelse gjelder også genetisk modifiserte, rekombinante Newcastle-sykdomsvirus som inneholder modifikasjoner og/eller mutasjoner som gjør det rekombinante virus egnet  
10 for anvendelse i vaksinepreparater, for eksempel en svekket genotype eller forsterket immunogenisitet.

Foreliggende oppfinnelse gjelder rekombinante Newcastle-sykdomsvirus som induserer interferon-reaksjonsveien og beslektede reaksjonsveier. Foreliggende oppfinnelse  
15 gjelder anvendelse av de rekombinante Newcastle-sykdomsvirus og virale vektorer mot et bredt utvalg av patogene organismer og/eller antigener, innbefattet tumorspesifikke antigener. Oppfinnelsen demonstreres ved hjelp av eksempler i hvilke rekombinante Newcastle-sykdomsvirus-RNA-templater som inneholder heterologe genkodende sekvenser i negativ polaritet ble konstruert. Oppfinnelsen gjelder videre konstruksjon  
20 av rekombinante Newcastle-sykdomsvirus-RNA-templater som inneholder heterologe genkodende sekvenser i positiv polaritet. Slike heterologe gensekvenser omfatter sekvenser avledet fra et humant immundefisiensvirus (HIV).

## 2. Oppfinnelsens bakgrunn

25 En rekke DNA-virus har blitt genetisk modifisert slik at de styrer ekspresjonen av heterologe proteiner i vertscellesystemer (for eksempel kukoppevirus, bakulovirus osv.). Nylig har tilsvarende fremskritt blitt gjort med positiv tråd-RNA-virus (for eksempel poliovirus). Ekspresjonsproduktene fra disse konstruksjoner, dvs. det heterologe genprodukt eller det kimære virus som uttrykker det heterologe genprodukt, antas å ha  
30 mulig anvendelse i vaksinepreparater (enten subenhetvaksine eller helvirusvaksiner). En ulempe ved anvendelse av virus, for eksempel kukoppevirus, for konstruksjon av rekombinante eller kimære virus for anvendelse i vaksiner er manglende variasjon i de viktigste epitoper. Denne mangel på variabilitet i virusstammene medfører sterke begrensninger når det gjelder gjentatt anvendelse av kimært kukoppevirus, siden flere  
35 gangers vaksinasjon vil frembringe vertsresistens mot stammen slik at det inokulerte virus ikke kan infisere verten. Inokulasjon av et resistent individ med kimært kukoppevirus vil derfor ikke indusere immunstimulering.

I motsetning til dette vil negativ tråd-RNA-virus være attraktive kandidater for konstruksjon av kimære virus for anvendelse i vaksiner. Negativ tråd-RNA-viruset, for eksempel influensavirus er gunstig, siden den brede genetiske variabilitet tillater konstruksjon av et stort utvalg av vaksinepreparater som stimulerer immunitet uten fare for utvikling av toleranse. Nylig ble konstruksjon av infektiose, rekombinante eller kimære negativ-tråd-RNA-partikler oppnådd med influensavirus (U.S. patentskrift nr. 5,166,057, tildelt Palese et al.)

#### 10 **Newcastle-sykdomsviruset**

Virusfamilier som inneholder innkapslet enkelttrådet RNA som negativ-”sense”-genom klassifiseres i grupper med ikke-segmenterte genomer (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae) eller grupper med segmenterte genomer (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae og Arenaviridae). Paramyxoviridae-familien, som beskrives i detalj 15 nedenfor og som anvendes i eksemplene heri, omfatter virusene Newcastle-sykdomsvirus (NDV), parainfluenzavirus, Sendai-virus, apevirus 5 og kusmavirus.

Newcastle-sykdomsvirus er et innkapslet virus som inneholder et lineært, enkelttrådet, ikke-segmentert, negativ ”sense” RNA-genom. Det genomiske RNA inneholder gener i 20 rekkefølgen av 3’-NP-P-M-F-HN-L, beskrevet i mer detalj nedenfor. Det genomiske RNA inneholder også en ledersekvens i den 3’ ende.

De strukturelle elementer i viruspartikkelen omfatter viruskappen, som er lipid dobbelt-sjikt avledet fra celleplasmamembranen. Glykoproteinet, hemagglutinin-neuraminidase 25 (HN), stikker ut fra kappen og gjør at viruset besitter både hemagglutinin- og neuraminidaseaktivitet. Fusjonsglykoproteinet (F), som også interagerer med virusmembranen, produseres først som en inaktiv forløper og kløyves så posttranslasjonelt for dannelse av to disulfid sammenkoblede polypeptider. Det aktive F-protein deltar i penetrasjon av NDV inn i vertsceller ved å fremme fusjon mellom viruskappen og 30 vertscellens plasmamembran. Matriksproteinet (M) deltar i oppbygning av viruset og interagerer både med virusmembranen og nukleokapsidproteinen.

Den viktigste proteinsubenheter i nukleokapsidet er nukleokapsidproteinet (NP), som gir kapsidet helikal symmetri. Assosiert med nukleokapsidet er proteinene P og L. Fosfo- 35 proteinet (P), som fosforyleres, antas å spille en regulatorisk rolle under transkripsjonen og kan også delta i metylering, fosforylering og polyadenylering. L-genet, som koder for en RNA-avhengig RNA-polymerase, er nødvendig for virus-RNA-syntesen sammen

med P-proteinet. L-proteinet, som utgjør nesten halvparten av virusgenomets kodende kapasitet, er det største av virusproteinene og spiller en viktig rolle både i transkripsjon og replikasjon.

- 5 Replikasjonen av alle negativ-tråd-RNA-virus, innbefattet NDV, kompliseres ved fravær av et cellulært maskineri som kan replikere RNA. I tillegg kan negativ-tråd-genomet ikke transplanteres direkte til protein, men må først transkriberes til en positiv tråd (mRNA)-kopi. Etter inngang i en vertscelle kan derfor genomisk RNA ikke alene syntetisere den nødvendige RNA-avhengige RNA-polymerase. L-, P- og NP-proteinet  
10 må gå inn i cellen sammen med genomet ved infeksjon.

Det antas at de fleste eller alle virusproteiner som transkriberer NDV-mRNA også utfører replikasjonen av dette. Mekanismen som regulerer denne alternative anvendelse (dvs. transkripsjon eller replikasjon) av det samme sett av proteiner er ikke klarlagt,  
15 men synes å omfatte store mengder av frie former av ett eller flere av nukleokapsid-proteinene, særlig NP. Direkte etter penetrasjon av viruset initieres transkripsjonen ved L-proteinet med negativ-”sense”-RNA i nukleokapsidet som templat. Virus-RNA-syntesen reguleres slik at det dannes monosistroniske mRNA under transkripsjonen.

- 20 Etter transkripsjonen er virusgenomreplikasjonen den andre avgjørende begivenhet ved infeksjon med negativ-tråd-RNA-virus. Som for andre negativ-tråd-RNA-virus formidles virusgenomreplikasjonen hos Newcastle-sykdomsvirus (NDV) av virus-spesifikke proteiner. De første produkter fra den replikative RNA-syntese er komplementære kopier (dvs. pluss-polaritet) av NDV-genom-RNA (cRNA). Disse  
25 pluss-tråd-kopier (antigenomer) avviker fra pluss-tråd-mRNA-transkriptene når det gjelder endestrukturene. I motsetning til mRNA-transkriptene mangler de antigenomiske cRNA ”cap” og metylering i 5’-enden, og de er ikke avkortede og polyadenylerte i den 3’ ende. cRNA har felles ende med negativ tråd-templatene og inneholder all den genetiske informasjon i de genomiske RNA-segmenter i  
30 komplementær form. cRNA fungerer som templat for syntese av negativ-tråd-NDV-virusgenomer (vRNA).

Både negativ tråd-NDV-genomene (vRNA) og antigenomene (cRNA) innkapsles av nukleokapsidproteinet, den eneste ikke-innkapslede RNA-type er virus-mRNA. For  
35 NDV er sytoplasmaet setet for virus-RNA-replikasjonen, og også for transkripsjonen. Oppbygning av virusbestanddelene ser ut til å finne sted ved vertscellens plasma-membran, og modne virus frigis ved avsnøring.

## 2.2. Modifiserte negativ-tråd-RNA-virus

RNA-styrte RNA polymeraser fra dyrevirus har blitt omfattende undersøkt når det gjelder mange sider ved proteinstrukturen og reaksjonsbetingelsene. De elementer i templat-RNA som fremmer optimal ekspresjon ved polymerasen kan imidlertid kun undersøktes ved interferens ved anvendelse av foreliggende virus-RNA-sekvenser. Denne promoteranalyse er av interesse siden det ikke er kjent hvordan en virus-polymerase gjenkjenner spesifikke virus-RNA blant de mange vertskodede RNA som foreligger i en infisert celle.

10

Dyrevirus som inneholder pluss-”sense”-genomisk RNA kan replikeres ved innføring av plasmidavledet RNA i celler ved transfeksjon (se for eksempel Racaniello et al., 1981, *Science* 214:916-919; Levis et al., 1986, *Cell* 44: 137-145). Når det gjelder poliovirus vil den rensede polymerase replikere et RNA-genom ved reaksjoner *in vitro* og når dette pluss-”sense”-RNA-preparat transfekteres inn i celler er det infektøst (Kaplan et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8424-8428). Templatelementene som fungerer som transkripsjonspromoter for den polioviruskodede polymerase er imidlertid ukjente, siden til og med RNA-homopolymerer kan kopieres (Ward et al., 1988, *J. Virol.* 62:558-562). SP6-transkripter har også blitt anvendt for fremstilling av modeller for defektive interfererende (DI) RNA for Sindbis-virusgenomet. Ved innføring av dette RNA i infiserte celler replikeres det og pakkes. RNA-sekvensene som var ansvarlige for både gjenkjenning ved Sindbis-viruspolymerasen og pakking av genomet inn i viruspartikler ble vist å ligge innenfor 162 nukleotider (nt) i den 5’ ende og 19 nt i den 3’ende av genomet (Levis et al., 1986, *Cell* 44:137-145). Når det gjelder faksmosaikkvirus (BMV), en positiv tråd-RNA-plantevirus, har SP6-transkripter blitt anvendt for identifisering av promoteren som en tRNA-lignende 3’ ende på 134 nt (Dreher og Hall, 1988, *J. Mol. Biol.* 201: 31-40). Gjenkjenning og syntese ved polymerasen ble vist å avhenge både av sekvens og sekundær strukturegenskaper (Dreher et al., 1984, *Nature* 311: 171-175).

30

Undersøkelser vedrørende sekvenskravene for replikasen i negativ ”sense”-RNA-virus har vært vanskelige. Den rensede polymerase fra vesikuløs stomatittvirus er bare aktiv i transkripsjon dersom virusavlede ribonukleoproteinkomplekser (RNP) inngår som templat (De og Banerjee, 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126:40-49; Emerson og Yu, 1975, *J. Virol.* 15:1348-1356; Naito og Ishihama, 1976, *J. Biol. Chem.* 251:4307-4314). Når det gjelder influensavirus ble det rapportert at nakent RNA renses fra virus ble anvendt for rekonstitusjon av RNP. Det virale nukleokapsidprotein og

35

polymeraseproteinet ble gelrenset og renaturert på virus-RNA med tioredoksin (Szewczyk, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7907-7911). Disse forfattere viste imidlertid ikke at preparatets aktivitet var spesifikk for influensavirus-RNA, og de analyserte heller ikke hvilke signaler som fremmer transkripsjon.

5

Kun nylig har det blitt mulig å gjenvinne negativ tråd-RNA-virus ved anvendelse av en rekombinant revers genetikk-tilnærming (U.S. Patentskrift nr. 5,166,057, tildelt Palese et al.). Selv om denne fremgangsmåte opprinnelig ble anvendt for modifisering av influensavirusgenomer har den blitt anvendt med hell på et bredt utvalg av segmenterte og ikke-segmenterte negativ tråd-RNA-virus, innbefattet rabies (Schnell et al., 1994, EMBO J. 13:4195-4203); respiratorisk synsyttial virus (Collins et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88-9663-9667); og Sendai virus (Park et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Kato et al., 1996, Genes Cells I:569-579). Denne tilnærming har imidlertid ennå ikke blitt anvendt på RNA-genomer for Newcastle-sykdomsvirus.

15

### 3. Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter rekombinant RNA-molekyl, kjennetegnet ved at det omfatter et bindingssete som er spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon, operativt koblet til en heterolog RNA-sekvens, der bindingssetet spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon inngår i de ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder i det NDV-virale RNA-genom, og der nevnte ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder har følgende virus-"sense"-sekvens:

25

```
(3') 5' ACCAAACAGA GAAUCCGUAA GGUACGUUAA AAAGCGAAGG AGCAAUUGAA
      GUCGCACGGG UAGAAGGUGU GAAUCUCGAG UGCGAGCCCC
AAGCACAAC
```

```
UCGAGAAAGC CUUCUACCAA C 3'
```

30

```
(5') 5' CGACAAUCAC AUAUAAUAG GCUCCUUUUC UGGCCAAUUG UAUCCUUGUU
      GAUUUAAUCA UACUAUGUUA GAAAAAAGUU GAACUCCGAC
UCCUUAGGAC
```

```
UCGAACUCGA ACUCAAAUAA AUGUCUUAGA AAAAGAUUGC
```

```
GCACAGUUAU
```

35

```
UCUUGAGUGU AGUCUUGUCA UUCACCAAU CUUUGUUUGG U 3'.
```

## 6

Omfattet av oppfinnelsen er også rekombinant RNA-molekyl, kjenntegnet ved at det omfatter et bindingssete spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon, operativt koblet til et Newcastle-sykdomsvirusgen, hvori RNA-molekylet  
 5 inneholder en mutasjon og resulterer i en svekket fenotype eller økt immunogenisitet, der bindingssetet spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon inngår i de ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder i det NDV-virale RNA-genom, og der nevnte ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder har følgende virus-"sense"-sekvens:

10

```
(3') 5'      ACCAAACAGA GAAUCCGUAA GGUACGUUAA AAAGCGAAGG AGCAAUUGAA
          GUCGCACGGG UAGAAGGUGU GAAUCUCGAG UGCGAGCCCG AAGCACAAAC
          UCGAGAAAGC CUUCUACCAA C          3'
```

15

```
(5') 5'      CGACAAUCAC AUAUUAUAG GCUCCUUUUC UGGCCAAUUG UAUCCUUGUU
          GAUUUAAUCA UACUAUGUUA GAAAAAAGUU GAACUCCGAC UCCUUAGGAC
          UCGAACUCGA ACUCAAAUAA AUGUCUUAGA AAAAGAUUGC GCACAGUUUAA
          UCUUGAGUGU AGUCUUGUCA UUCACCAAU CUUUGUUUGG U 3'.
```

20

Videre omfatter oppfinnelsen rekombinant celle, kjennetegnet ved at den omfatter nukeotidsekvenser som koder for et rekombinant RNA-molekyl ifølge krav 1 eller 2 og NDV-RNA polymeraseproteinene P og L.

25

Oppfinnelsen omfatter også kimært virus, som tilveiebringer et negativ tråd-RNA-virus som inneholder det rekombinante RNA-molekyl ifølge krav 1 eller 2.

30

Omfattet av oppfinnelsen er også fremgangsmåte for fremstilling av et kimært negativ-tråd-RNA-virus, kjennetegnet ved at den omfatter transfeksjon av en vertscelle med nukleotidsekvenser som koder for det rekombinante RNA ifølge krav 1 eller 2 og virusfunksjonene som er nødvendige for replikasjon og transkripsjon, og gjenvinning av det kimære virus fra kulturen.

35

Også vaksinepreparat er omfattet av oppfinnelsen, kjenntegnet ved at det omfatter et genetisk modifisert Newcastle-sykdomsvirus som inneholder det rekombinante RNA-molekylet ifølge krav 2 og en fysiologisk akseptertbar eksipiens, der viruset inneholder modifikasjoner som fører til en svekket fenotype.

Rekombinante Newcastle-sykdomsvirus-RNA-templater som kan anvendes med RNA-styrt RNA-polymerase for ekspresjon av heterologe genprodukter i egnede vertsceller og/eller for innføring av det heterologe gen i viruspartikler beskrives. I en utførelse gjelder oppfinnelsen rekombinante Newcastle-sykdomsvirus som inducerer interferonreaksjonsveien og beslektede reaksjonsveier. Foreliggende oppfinnelse gjelder 5 rekombinante Newcastle-sykdomsvirus som inneholder modifikasjoner som fører til fenotyper som gjør det rekombinante virus mer egnet for anvendelse i vaksinepreparater, for eksempel svekkede fenotyper og forhøyet immunogenisitet. I en annen utførelse gjelder foreliggende oppfinnelse modifikasjon av rekombinante 10 Newcastle-sykdomsvirus og virusvektorer som inneholder heterologe gener, innbefattet gener fra andre virus, virus fra patogene organismer og cellulære gener, tumor antigener osv.

I en annen utførelse gjelder foreliggende oppfinnelse modifisering av rekombinante 15 Newcastle-sykdomsvirus og virale vektorer for anvendelse som vaksiner. Foreliggende oppfinnelse gjelder vaksinepreparater som er egnede for tilførsel til mennesker, samt vaksiner for veterinærmessig anvendelse. Vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan utformes for tilførsel til husdyr, innbefattet katter og hunder, ville dyr, innbefattet rev og vaskebjørn, kveg og fjærfe, innbefattet hest, storfe, sau, kalkun og kylling.

20 I ytterligere en utførelse gjelder oppfinnelsen rekombinante Newcastle-sykdomsvirusvektorer og virus som er modifisert slik at de koder for mutante Newcastle-sykdomsvirusgener eller koder for kombinasjoner av gener fra forskjellige stammer av Newcastle-sykdomsvirus. RNA-templatene ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles 25 ved transkripsjon av egnede DNA-sekvenser med en DNA-styrt RNA-polymerase. De resulterende RNA-templater har negativ polaritet og inneholder egnede endesekvenser som tillater gjenkjenning av templatet ved virus-RNA-syntese av templatet. Alternativt kan RNA-templater med positiv polaritet som inneholder egnede endesekvenser som tillater gjenkjenning av templatet ved virus-RNA-synteseapparatet også anvendes. 30 Ekspresjon fra RNA-templater med positiv polaritet kan oppnås ved transfeksjon av plasmider med promotere som gjenkjennes av DNA-avhengig RNA-polymerase. For eksempel plasmid-DNA som koder for positive RNA-templater under kontroll av en T7-promoter anvendes i kombinasjon med kukoppevirus-T7-systemet.

35 Bisstroniske mRNA kan konstrueres for å oppnå intern initiering av translasjon av virussekvenser og ekspresjon av sekvenser som koder for fremmed protein fra det vanlige, terminale initieringssetet, eller omvendt. Alternativt kan et fremmed protein

uttrykkes fra en intern transkripsjonsenhet hvor transkripsjonsenheten har et initieringssete og et polyadenyleringssete. I en annen utforming innføres det fremmede gen i et NDV-gen slik at det resulterende uttrykte protein er et fusjonsprotein.

5 De rekombinante, mutante Newcastle-sykdomsvirus-RNA-templatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for transfeksjon av transformerte cellelinjer som uttrykker den RNA-avhengige RNA-polymerase og tillater komplementering. Alternativt kan et plasmid som uttrykker genet fra en egnet promoter anvendes for virus-spesifikk (kimær) RNA-transfeksjon. Komplementering kan også oppnås ved  
10 anvendelse av et hjelpervirus som tilveiebringer den RNA-avhengige RNA-polymerase. I tillegg beskrives også et ikke-virusavhengig replikasjonssystem for Newcastle-sykdomsvirus. Den minimale undergruppe av Newcastle-sykdomsvirusproteiner som er nødvendig for spesifikk replikasjon og ekspresjon av viruset er de tre proteinene L, P og NP, som kan uttrykkes fra plasmider ved et kukoppevirus-T7-system. I nok en annen  
15 utførelse, hvor plasmider som koder for den antigenomiske kopi av NDV-genomet anvendes for tilførsel av virusgenomet, er den minimale undergruppe av Newcastle-sykdomsvirusproteiner som er nødvendige for spesifikk replikasjon og ekspresjon av viruset L- og P-proteinet. Dersom den antigenomiske kopi av NDV-genomet transkriberes er NP-polymeraseproteinet det første protein som transkriberes, det er  
20 således ikke nødvendig å tilføre NP-polymerasen i trans i tillegg.

Ekspresjonsproduktene og/eller de kimære viruspartikler som erholdes kan med fordel anvendes i vaksinepreparater. Ekspresjonsproduktene og de kimære viruspartikler ifølge foreliggende oppfinnelse kan modifiseres for dannelsen av vaksiner mot et bredt  
25 utvalg av patogene organismer, innbefattet virusantigener, tumorantigener og autoantigener som inngår i autoimmune forstyrrelser. Nærmere bestemt kan de kimære viruspartikler ifølge foreliggende oppfinnelse modifiseres for dannelsen av anti-HIV-vaksiner, hvori et immunogent polypeptid fra gp160 og/eller fra interne HIV-proteiner innføres i glykoprotein HN-proteinet for konstruksjon av en vaksine som kan utløse  
30 både humorale og celleformidlede immunresponser i vertebrater. Anvendelse av rekombinant Newcastle-sykdomsvirus for dette formål er spesielt attraktivt, siden Newcastle-sykdomsvirus ikke er patogent for mennesker. Anvendelse av rekombinant Newcastle-sykdomsvirus for tilførsel av tumorantigener er spesielt attraktivt, virusets kjente antineoplastiske og immunforsterkende egenskaper tatt i betraktning.

### 3.1. DEFINISJONER

Som benyttet heri vil følgende begreper ha de angitte betydninger:

5	cRNA	= anti-genomisk RNA
	HIV	= humant immunodefisiens virus
	L	= stort protein
	M	= matriksprotein (belegger kappen på innsiden)
	MDCK	= Madin Darby (nyreceller fra hund)
10	MDBK	= Madin Darby (nyreceller fra storfe)
	moi	= infeksjonsmultiplisitet
	NA	= neuraminidase (kappeglykoprotein)
	NDV	= Newcastle-sykdomsvirus
	NP	= nukleoprotein (assosiert med RNA og påkrevet for
15		polymeraseaktivitet)
	NS	= ikke-strukturelt protein (ukjent funksjon)
	nt	= nukleotid
	PA, PB1, PB2	= RNA-styrt RNA-polymerase bestanddeler
	RNP	= ribonukleoprotein
20	rRNP	= rekombinant RNP
	vRNA	= genomisk virus-RNA
	WSN	= influensa A/WSN/33-virus
	WSN/HK-virus	= bred assortert virus som inneholder 7 gener fra WSN-virus og NA-genet fra influensa A/HK/8/68-virus

25

### 4. BESKRIVELSE AV FIGURENE

Fig. 1. Skjematisk fremstilling av NDV-minigenomet. Øvre illustrasjon viser plasmid PNDVCAT som omfatter T7-promoteren, den 5' terminale sekvens (5'-enden av  
30 genomisk RNA, 191 nt), de innsatte nukleotider (CTTAA); 667 nt fra CAT ORF; den  
3' terminale sekvens (3'-enden av genomisk RNA, 121 nt), og setene for Bbs1 og  
nuklease. Den nedre illustrasjonen viser det kimære NDV-CAT RNA som oppstår ved  
*in vitro*-transkripsjon. Som et resultat av den NDV-baserte amplifisering og  
transkripsjon av det kimære NDV-CAT-minigenom påvises CAT-aktivitet i de  
35 transfekterte celler.

Fig. 2A-C. Skjematisk fremstilling av PTMI-ekspressjonsvektorene.

PTM1-NP koder for NDV NP-proteinet.

PTM1-P koder for NDV P-proteinet.

PMT1 L koder for NDV L-proteinet.

5 Fig. 3. RNA-sekvens av de ikke-kodende 5'- og 3'-terminale områder i NDV (pluss-  
 "sense"). Sekvensene 5' for CAT-genet representerer 121 nt av det ikke-kodende 5'-  
 terminale området i NDV-pluss-"sense"-genomet omfattende 65 nt av ledersekvensen (i  
 uthevet skrift), fulgt av 56 nt av UTR fra NP-genet. Sekvensene 3' for CAT-genet  
 10 representerer de innsatte nukleotider cuaaa (med små bokstaver) og 191 nt fra det ikke-  
 kodende terminale området i NDV-pluss-"sense"-genomet, omfattende 127 nt av UTR  
 fra L-genet fulgt av 64 nt fra "trailer"-området (i uthevet skrift).

Fig. 4A-B. Skjematiske fremstillinger av en struktur av rekombinante NDV-kloner. Fig.  
 4B: Skjematiske fremstillinger av infektios NDV som uttrykker HIV Env og Gag. Øvre  
 15 felt: HIV Env og Gag ligger mellom M- og L-genet. Nedre felt: HIV Env og Gag er 3'  
 for NP-genet.

Fig. 5: Skjematiske fremstillinger av 3'- og 5'-enden av NDV, sammenstilt med sekvensen  
 fra Kurilla et al. 1985 *Virology* 145:203-212 (3'-enden) og Yusoff et al. 1987 *Nucleic*  
 20 *Acids Research* 15:3961-3976 (5'-enden).

Fig. 6: Plasmidbasert revers genetisk-fremgangsmåte for NDV-basert ekspresjon av et  
 fremmed gen. Cellene infiseres med et rekombinant kukoppevirus som uttrykker T7  
 polymerase. I tillegg transfekteres cellene med

25

- 1) plasmid-DNA som koder for L-, NP- og P-proteiner fra NDV under  
 transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pTM1-L, pTM1-NP henholdsvis pTM1-  
 P) og
- 2) et plasmid-DNA som koder for et kimært NDV-CAT-minigenom under  
 30 transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pT7-NDV-CAT-RB).

Korrekt 3'-ende i NDV-CAT-minigenomet oppnås ved å benytte kløyving som  
 fremmes av en ribozym sekvens (RB). Amplifisering og transkripsjon av NDV-CAT-  
 minigenomet fører til CAT-aktivitet som kan påvises i de transfekterte celler. De ikke-  
 35 kodende områder i 3'- og 5'-ende av NDV-CAT-minigenomet er representert med  
 svarte bokser.

Figur 7: Gjenvinning av NDV fra syntetisk DNA. Cellene infiseres med et rekombinant kukoppevirus som uttrykker T7 polymerase. I tillegg transfekteres cellene med

- 5 1) plasmid-DNA som koder for L-, NP- og P-proteinet fra NDV under transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pTM1-L, pTM1-NP henholdsvis pTM1-P) og
- 2) et plasmid-DNA som koder for NDV-antigenomet under transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pT7-NDV+RB).

10 Korrekt 3'-ende av NDV-antigenomet oppnås ved å bygge på kløyving fremmet av en ribozym sekvens (RB). Amplifisering og transkripsjon av NDV-antigenomet fører til gjenvinning av infektøs NDV-virus. De ikke-kodende områder i 3'- og 5'-ende av NDV-antigenomet er vist som svarte bokser.

15 Fig. 8: NDV-basert ekspresjon av et fremmed gen innsatt som en intern transkripsjonsenhet i NDV-antigenomet. Cellene infiseres med et rekombinant kukoppevirus som uttrykker T7-polymerase. I tillegg transfekteres cellene med

- 20 1) plasmid-DNA som koder for L-, NP- og P-proteinet fra NDV under transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pTM1-L, pTM1-NP henholdsvis pTM1-P) og
- 2) et plasmid-DNA som koder for et kimært NDV-CAT antigenom under transkripsjonskontroll av en T7-promoter (pT7-NDV+RB). I det kimære NDV-CAT antigenom erstatter den åpne leseramme for CAT den naturlig forekommende
- 25 åpne leseramme for HN i villtype-NDV-antigenomet.

Korrekt 3'-ende av det kimære NDV-CAT-antigenomet oppnås ved å bygge på kløyving fremmet av en ribozym sekvens (RB). Amplifisering og transkripsjon av det kimære NDV-antigenomet fører til CAT-aktivitet som kan påvises i de transfekterte

30 celler. De ikke-kodende områder i 3'- og 5'-ende av det kimære NDV-CAT-antigenomet er vist som svarte bokser.

## 5. BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse gjelder genetisk modifiserte Newcastle-sykdomsvirus og virusvektorer som uttrykker heterologe gener eller muterte Newcastle-sykdomsvirus-

35 gener, eller en kombinasjon av virusgener avledet fra forskjellige stammer av Newcastle-sykdomsvirus. Oppfinnelsen gjelder konstruksjon og anvendelse av

rekombinante negativ tråd-NDV-virus-RNA-templater som kan anvendes med viral RNA-styrt RNA polymerase for ekspresjon av heterologe genprodukter i egnede vertsceller og/eller gjenvinning av det heterologe gen i viruspartikler. I en spesifikk utførelse av oppfinnelsen er det heterologe genprodukt et peptid eller protein avledet fra

5 genomet til et humant immundefisiensvirus. RNA-templatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles enten *in vitro* eller *in vivo* ved konstruksjon av egnede DNA-sekvenser med en DNA-styrt RNA-polymerase, for eksempel RNA-polymerase fra bakteriofag T7, T3 og SP6 polymerase eller en eukaryot polymerase som polymerase I.

10

De rekombinante RNA-templater kan anvendes for transfeksjon av kontinuerlige/transfekterte cellelinjer som uttrykker de RNA-styrte RNA polymerase proteinene, noe som tillater komplementering, som vist ved arbeidseksempler i hvilke RNA-transkripter av klonet DNA som inneholder det kodende området – i negativ "sense"-orientering –

15 for kloramfenikol acetyltransferase (CAT)-genet, flankert av de 5'-terminale og 3'-terminale nukleotider fra NDV-CL (California stamme/11914/1944-lignende stamme) (Meindl et al., 1974 *Virology* 58:457-463) RNA ble transfektet inn i celler som uttrykker NDV-polymerase proteiner. I en foretrukket utførelsesform anvendes et ikke-virus avhengig replikasjonssystem for gjenvinning av kimært NDV, i hvilket plasmid-

20 DND som koder for NDV-genomet eller –antigenomet uttrykkes sammen med plasmid-DNA som koder for den minimale undergruppe av Newcastle-sykdomsvirusproteiner som er nødvendige for spesifikk replikasjon og ekspresjon av viruset, vist som arbeidseksempler som beskrevet nedenfor.

25

Evnen til å rekonstituere NDV *in vivo* tillater utforming av nye, kimære NDV-virus som uttrykker fremmede gener eller som uttrykker mutante NDV-gener. Evnen til å rekonstituere NDV *in vivo* tillater også utforming av nye, kimære NDV som uttrykker gener fra forskjellige NDV-stammer. En måte å oppnå dette mål på omfatter

30 modifisering av eksisterende NDV-gener. For eksempel kan HN-genet modifiseres slik at det inneholder fremmede sekvenser i sine eksterne domener. Dersom den heterologe sekvens er epitoper eller antigener fra patogene organismer kan disse kimære virus anvendes for induksjon av en beskyttende immunrespons mot sykdomsmidlet fra hvilket disse determinanter er avledet.

35

I samsvar med foreliggende oppfinnelse konstrueres et kimært RNA i hvilket en kodende sekvens avledet fra det kodende området for gp160 i humant immun-defisiens virus innsettes i den kodende sekvens for HN fra NDV, og kimært virus fremstilt ved

transfeksjon av dette kimære RNA-segment inn i en vertscelle infisert med villtype-NDV. Videre bør et slikt kimært virus være i stand til å utløse både en humoral og en celle-formidlet immunrespons i en vertebrat. Foreliggende oppfinnelse gjelder videre induksjon av interferonereaksjonsveien og beslektede reaksjonsveier med rekombinante eller kimære NDV-virus.

Foreliggende oppfinnelse gjelder anvendelse av virusvektorer og kimære virus ifølge oppfinnelsen for utforming av vaksiner mot et bredt utvalg av virus og/eller antigener, innbefattet tumorantigener. Virusvektorene og de kimære virus ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for modulering av immunsystemet i et individ med stimulering av en humoral immunrespons, en cellulær immunrespons eller ved å stimulere toleranse overfor et antigen. Som anvendt heri betyr et individ et menneske, en primat, en hest, en ku, en sau, en gris, en geit, en hund, en katt, et fjærfe og en gnager. Ved tilførsel av tumorantigener kan oppfinnelsen anvendes for behandling av individer med sykdommer som kan behandles ved immunformidlet rejeksjon, for eksempel ikke-faste tumorer eller små faste tumorer. Det omfattes også at tilførsel av tumor antigener via de virale vektorer og kimære virus som beskrives heri vil være anvendbart for behandling etter fjerning av store faste tumorer. Oppfinnelsen kan også anvendes for behandling av individer som antas å ha cancer.

20

Oppfinnelsen kan deles i følgende stadier :

- (a) konstruksjon av rekombinante RNA-templater;
- (b) ekspresjon av heterologe genprodukter ved anvendelse av de rekombinante RNA-templater; og
- (c) gjenvinning av det heterologe gen i rekombinante viruspartikler.

25

For klargjøring av diskusjonen beskrives oppfinnelsen i arbeidseksemplene ved anvendelse av NDV-CL (California stamme/11914/1944-lignende stamme), imidlertid kan enhver NDV-stamme anvendes.

30

### **5.1. KONSTRUKSJON AV DE REKOMBINANTE RNA-TEMPLATER**

En spesifikk utførelse av foreliggende oppfinnelse er søkerens identifisering av den korrekte nukleotidsekvensen i 5'- og 3'-ende av negativ-"sense"-genom-RNA fra NDV. Nukleotidsekvensen i 5'- og 3'-ende av negativ-"sense"-genom-RNA fra NDV ifølge foreliggende oppfinnelse avviker signifikant fra sekvensen for den 3'-ende av NDV som tidligere er beskrevet, som vist i figur 5. Identifisering av den korrekte nukleotid-

35

sekvens for 5'- og 3'-ende av NDV tillater for første gang modifisering av rekombinante NDV-RNA-templater, ekspresjon av de rekombinante RNA-templater og gjenvinning av rekombinante NDV-partikler. Foreliggende oppfinnelse omfatter ikke bare 5'- og 3'-ender med nukleotidsekvensen som vist i figur 5, men omfatter også alle  
 5 modifikasjoner eller mutasjoner av endene eller ethvert fragment fra disse som fortsatt bibeholder funksjonen til villtype endene, dvs. signalene som er nødvendige for at det virus-RNA-syntetiserende apparat skal gjenkjenne templatet.

Heterologe genkodende sekvenser flankert av den komplementære sekvens for bindingssetet/promoteren for viruspolymerasen, for eksempel den komplementære  
 10 sekvens av den 3'-ende av NDV-viruset ifølge foreliggende oppfinnelse, eller den komplementære sekvens av både den 3'- og den 5'-ende av NDV-viruset, kan konstrueres ved anvendelse av teknikker som er kjente innen faget. De resulterende RNA-templater kan ha negativ polaritet og inneholde egnede endesekvenser som tillater  
 15 gjenkjenning av templatet via virus-RNA-synteseapparatet. Alternativt kan RNA-templater med positiv polaritet som omfatter egnede endesekvenser som tillater gjenkjenning av templatet via virus-RNA-synteseapparatet også anvendes.

Rekombinante DNA-molekyler som inneholder disse hybridsekvenser kan kloneres og transkriberes av en DNA-styrt RNA-polymerase, for eksempel RNA-polymerase fra  
 20 bakteriofag T7 eller T3, SP6 polymerase eller en eukaryot polymerase som polymerase I og lignende, for fremstilling *in vitro* eller *in vivo* av de rekombinante RNA-templater som besitter egnede virussekvenser som tillater gjenkjenning og aktivitet av virus-polymerase.

25 I ytterligere en utførelse kan nær sagt enhver heterolog sekvens innføres i de kimære virus ifølge foreliggende oppfinnelse, innbefattet, men ikke begrenset til antigener som

- 1) antigener som er særpregede for en patogen organisme;
- 2) antigener som er særpregede for autoimmune sykdommer;
- 30 3) antigener som er særpregede for et allergen; og
- 4) antigener som er særpregede for en tumor.

Heterologe gensekvenser som kan innføres i de kimære virus ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter for eksempel, men er ikke begrenset til, epitoper fra humant  
 35 immundefisiensvirus (HIV) som gp160; hepatitt B-virus overflate antigen (HbsAg); glykoproteinene fra herpes virus (for eksempel gD, gE); VP1 fra poliovirus og antigene

determinanter fra ikke-virale patogener som bakterier og parasitter, for bare å nevne noen få.

Antigener som er særpregede for autoimmune sykdommer vil typisk være avledet fra  
 5 celleoverflaten, sytoplasma, kjerne, mitokondrie og lignende i pattedyrs vev, innbefattet  
 antigener som er spesielle for diabetes mellitus, multippel sklerose, systemisk lupus  
 erytematosus, reumatoid artritt, pernisiøs anemi, Addison's sykdom, skleroderma,  
 autoimmun atrofisk gastritt, ungdoms diabetes, og diskoid lupus erytematosus.

10 Antigener som er allergener er generelt proteiner eller glykoproteiner, innbefattet  
 antigener avledet fra pollen, støv, mugg, sporer, flass, insekter og mat.

Antigener som er typiske for tumorantigener vil typisk være avledet fra celleoverflaten,  
 cytoplasma, kjerne, organeller og lignende i celler fra tumorvev. Eksempler omfatter  
 15 antigener som er typiske for tumorproteiner, innbefattet proteiner som kodes av muterte  
 onkogen, virusproteiner forbundet med tumorer og glykoproteiner. Tumorer  
 omfatter, men er ikke begrenset til, tumorer avledet fra cancer i leppen, nese-  
 svelgrommet, svelg og munnhule, spiserør, mage, kolon, rektum, lever, galleblære,  
 bukspyttkjertel, strupe, lunge og bronkier, melanomer i hud, bryst, livmorhals, uterus,  
 20 eggstokker, blære, nyrer, livmor, hjerne og andre deler av nervesystemet, skjoldbrusk-  
 kjertel, prostata og testes, Hodgkins sykdom, ikke-Hodgkins lymfom, multippel  
 myelom og leukemi.

I en spesifikk utførelse av oppfinnelsen er de heterologe sekvenser avledet fra genomet  
 25 til humant immundefisiensvirus (HIV), fortrinnsvis humant immundefisiensvirus-1 eller  
 humant immundefisiensvirus-2. I en annen utførelse av oppfinnelsen kan de heterologe  
 kodende sekvenser innsettes i en kodende sekvens i et NDV-gen, slik at et kimært gen-  
 produkt som inneholder den heterologe peptidsekvens uttrykkes inne i NDV-  
 virusproteinet. I en slik utførelse av oppfinnelsen kan de heterologe sekvenser også  
 30 være avledet fra genomet til et humant immundefisiensvirus, fortrinnsvis humant  
 immundefisiensvirus-1 eller humant immundefisiensvirus-2.

I de tilfeller hvor de heterologe sekvenser er avledet fra HIV kan de omfatte, men er  
 ikke begrenset til, sekvenser avledet fra env-genet (dvs. sekvenser som koder for hele  
 35 eller deler av gp160, gp120 og/eller gp41), pol-genet (dvs. sekvenser som koder for hele  
 eller deler av revers transkriptase, endonuklease, protease, og/eller integrase), gag-genet

(dvs. sekvenser som koder for hele eller deler av p7, p6, p55, p17/18, p24/25) tat, rev, nef, vif, vpu, vpr, og/eller vpx.

I ytterligere en annen utførelse omfatter heterologe gensekvenser som kan innføres i de  
 5 kimære virus sekvenser som koder for proteiner med immunforsterkende aktivitet. Eksempler på immunforsterkende proteiner omfatter, men er ikke begrenset til, sytokiner, interferon type 1, gamma-interferon, kolonistimulerende faktorer, interleukin-1, -2, -4, -5, -6 og -12.

10 En tilnærming for konstruksjon av disse hybridmolekylene er å innsette den heterologe kodende sekvens inn i et DNA-komplement av et NDV-gen slik at den heterologe sekvens flankeres av virus-sekvensene som er nødvendige for virus-polymeraseaktivitet, dvs. viruspolymerasesbindingssete/promoter, i det påfølgende betegnet virus-  
 15 polymerasens bindingssete, og et polyadenyleringssete. I en foretrukket utførelse flankeres den heterologe kodende sekvens av virussekvensene som utgjør replikasjons-promoterne i 5'- og 3'-ende, genets startsekvens og sluttsekvens og innpakkings-signalene som finnes i den 5'- og/eller den 3'-ende. I en alternativ tilnærming kan oligonukleotider som koder for viruspolymerasens bindingsseter, for eksempel den komplementære sekvens til den 3'-ende eller begge ender av virusgenomsegmentene,  
 20 liggeres til den heterologe kodende sekvens for konstruksjon av hybridmolekylet. Plassering av et fremmed gen eller et segment av et fremmed gen i en målsekvens ble tidligere styrt av nærvær av egnede restriksjonsenzymseter i målsekvensen. Senere fremskritt innen molekylær biologi har i stor grad redusert dette problem. Restriksjonsenzymseter kan lett plasseres hvor som helst i en målsekvens ved  
 25 anvendelse av setestyrte mutagenese (se for eksempel teknikkene beskrevet av Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488). Varianter innen polymerase-kjede-reaksjons(PCR)-teknologien, beskrevet nedenfor, tillater også spesifikk innsetting av sekvenser (dvs. restriksjonsenzymseter) og tillater enkel konstruksjon av hybrid-molekyler. Alternativt kan PCR-reaksjoner anvendes for fremstilling av rekombinante  
 30 templatere uten behov for kloning. PCR-reaksjoner kan for eksempel anvendes for fremstilling av dobbeltrådede DNA-molekyler som inneholder en promoter for en DNA-styrt RNA-polymerase (for eksempel fra bakteriofag T3, T7 eller SP6) og hybrid-sekvensen som inneholder det heterologe gen og NDV-polymerasens bindingssete. RNA-templatene kan så transkriberes direkte fra dette rekombinante DNA. I ytterligere  
 35 en annen utførelse kan de rekombinante RNA-templatere fremstilles ved sammenligning av RNA som spesifiserer den negative polaritet av det heterologe gen og virus-polymerasens bindingssete ved hjelp av en RNA-ligase. Sekvenskravene for virus-

polymeraseaktivitet og konstruksjoner som kan anvendes i samsvar med oppfinnelsen beskrives i underavsnittene nedenfor.

### 5.1.1. INNSETTING AV DEN HETEROLOGE GENSEKVENSI I GENENE FOR 5           HN, P, NP, M, F ELLER L.

Gensegmentene som koder for HN, P, NP, M, F eller L-proteinene kan anvendes for innsetting av heterologe genprodukter. Innsetting av en fremmed gensekvens i et av disse segmenter kan oppnås ved enten en fullstendig erstatning av det kodende området  
10 i viruset med det fremmede gen eller ved en delvis erstatning. Fullstendig erstatning vil trolig best oppnås ved anvendelse av PCR-styrt mutagenese. Kort beskrevet vil PCR-primer A inneholde, fra 5' - til 3'-ende: Et unikt restriksjonsenzymsete, for eksempel et sete for et klasse IIS-restriksjonsenzym (dvs. et "shifter"-enzym som gjenkjenner en spesifikk sekvens, men kutter DNA enten oppstrøms eller nedstrøms for denne  
15 sekvens), et strekk med nukleotider som er komplementære til et område i NDV-genet og et nukleotidstrekk som er komplementært til den karboksyende-kodende del av det fremmede genprodukt. PCR-primer B vil inneholde, fra 5' - til 3'-ende: et unikt restriksjonsenzymsete, et nukleotidstrekk som er komplementært til et NDV-gen og et nukleotidstrekk som tilsvarer den 5'-kodende del av det fremmede gen. Etter en PCR-  
20 reaksjon med disse primere og en klonet kopi av det fremmede gen kan produktet kuttes og klones ved anvendelse av de unike restriksjonsseter. Kutting med klasse IIS-enzymet og transkripsjon med rensset bakteriofag polymerase vil gi et RNA-molekyl som inneholder de eksakte ikke-translaterte ender av NDV-genet med et fremmed gen innsatt. I en alternativ utførelse kan PCR-primede reaksjoner anvendes for fremstilling  
25 av dobbeltrådet DNA som inneholder bakteriofagpromotersekvensen og hybridgen-sekvensen, slik at RNA-templater kan transkriberes direkte uten kloning.

### 5.1.2. INNSETTING AV DEN HETEROLOGE GENSEKVENSI I HN-GENET

30 Hemagglutinin- og neuraminidase-aktiviteten til NDV kodes av et enkelt gen, HN. HN-proteinet er et av virusets viktigste overflateglykoproteiner. For en rekke virus, for eksempel influensa, har hemagglutinin- og neuraminidaseproteinet blitt vist å inneholde en rekke antigene seter. Følgelig er dette protein et mulig mål for den humorale immun-  
respons etter infeksjon. Substitusjon av antigene seter i HN med en del av et fremmed  
35 protein kan derfor tilveiebringe en kraftig humoral respons mot dette fremmede peptid. Dersom en sekvens innsettes i HN-molekylet og uttrykkes på den ytre overflate av HN vil sekvensen være immunogen. For eksempel kan et peptid avledet fra gp160 fra HIV

erstatte et antigensete i HN-proteinet, noe som fører til utløsning av både en humoral immunrespons. I en forskjellig tilnærming kan den fremmede peptidsekvens innsettes i det antigene setet uten at virussekvenser deleres. Ekspresjonsprodukter fra slike konstruksjoner kan være anvendbare i vaksiner mot det fremmede antigen og kan faktisk omgå et problem som er diskutert tidligere, nemlig omformering av det rekombinante virus i den vaksinerte vert. Et intakt HN-molekyl med en substitusjon kun i antigene seter kan tillate HN-funksjon og således tillate konstruksjon av et levedyktig virus. Dette virus kan derfor dyrkes uten behov for ytterligere hjelpefunksjoner. Viruset kan også være svekket på andre måter for å unngå fare for uønsket frisetelse.

Andre hybridkonstruksjoner kan fremstilles for ekspresjon av proteiner på celleoverflaten eller tillate frigivning av den fra cellen. Som et overflateglykoprotein har HN en aminoterminal, avkløyvbar signalsekvens som er nødvendig for transport til celleoverflaten og en karboksyterminal sekvens som er nødvendig for forankring i membranen. For å uttrykke et intakt fremmed protein på celleoverflaten kan det være nødvendig å anvende disse HN-signaler for dannelsen av et hybridprotein. I dette tilfellet kan funksjonsproteinet uttrykkes som et separat fusjonsprotein fra en ekstra intern promotor. Dersom bare transportsignalene foreligger og membranforankringsdomenet mangler kan alternativt proteinet utskilles fra cellen.

### 5.1.3. KONSTRUKSJON AV BISISTRONISK RAN OG HETEROLOG PROTEINEKSPRESJON

Bisstronisk mRNA kan konstrueres for å tillate intern translasjonsinitiering av virussekvenser og ekspresjon av sekvenser som koder for fremmed protein fra det regulære terminale initieringssetet. Alternativt kan en bisstronisk mRNA-sekvens hvori virussekvensen translateres fra den regulære terminale åpne leseramme konstrueres, mens den fremmede sekvens initieres fra et internt sete. Visse interne ribosom-inngangssete (IRES)-sekvenser kan anvendes. De valgte IRES-sekvenser bør være tilstrekkelig korte til at de ikke interferer med pakningsbegrensningene for Newcastle-sykdomsvirus. Det foretrekkes således at den IRES som velges for en slik bisstronisk tilnærming ikke er mer enn 500 nukleotider lang, mens mindre enn 250 nukleotider foretrekkes. Det foretrekkes videre at den anvendte IRES ikke omfatter sekvenser som er identiske med eller viser strukturell homologi med pikornavirus elementer. Foretrukne IRES-elementer omfatter, men er ikke begrenset til, IRES fra BiP fra et pattedyr og IRES fra hepatitt C-virus.

Alternativt kan et fremmed protein uttrykkes fra en ny intern transkripsjonsenhet, hvor transkripsjonsenheten har et initieringssete og et polyadenyleringssete. I en annen utførelse er det fremmede gen innsatt i et NDV-gen slik at det resulterende uttrykte protein er et fusjonsprotein.

## **5.2. EKSPRESJON AV HETEROLOGE GENPRODUKTER VED ANVENDELSE AV ET REKOMBINANT RNA-TEMPLAT**

De rekombinante templat, fremstilt som beskrevet ovenfor, kan anvendes på en rekke måter for ekspresjon av de heterologe genprodukter i egnede vertsceller eller for dannelse av kimære virus som uttrykker de heterologe genprodukter. I en utførelse kan det rekombinante templat anvendes for transfeksjon av egnede vertsceller og styre ekspresjonen av det heterologe genprodukt i høyt nivå. Vertscellesystemer som tillater høye ekspresjonsnivåer omfatter kontinuerlige cellelinjer som bidrar ved virusfunksjoner, for eksempel cellelinjer superinfisert med NDV, cellelinjer modifisert for komplementering av NDV-funksjoner osv.

I en alternativ utførelse av oppfinnelsen kan de rekombinante templat anvendes for transfeksjon av cellelinjer som uttrykker et viralt polymeraseprotein for å oppnå ekspresjon av det heterologe genprodukt. For dette formål kan transformerte cellelinjer som uttrykker et polymeraseprotein, for eksempel L-proteinet, anvendes som egnede vertsceller. Vertscellene kan være tilsvarende modifisert slik at de tilveiebringer andre virusfunksjoner eller ytterligere funksjoner, for eksempel NP eller HN.

I en annen utførelse kan et hjelpervirus tilveiebringe RNA-polymeraseproteinet som anvendes av cellene for å oppnå ekspresjon av det heterologe genprodukt.

I ytterligere en annen utførelse kan cellene være transfektert med vektorer som koder for virusproteiner, for eksempel NP-, P- og L-proteiner. Eksempler på slike vektorer er gitt i fig. 2A-2C.

## **5.3. FREMSTILLING AV KIMÆRT NEGATIVT TRÅD-RNA-VIRUS**

For fremstilling av kimære virus kan modifiserte NDV-virus-RNA, -cDNA eller -RNA som koder for NDV-genomet og/eller fremmede proteiner i pluss- eller minus-"sense" anvendes for transfeksjon av celler som bidrar med virusproteiner og funksjoner som er

nødvendige for replikasjon og virusoppbygging, eller som også er infisert med et "utgangs"-NDV-virus. I en alternativ tilnærming kan plasmider som kodes for genomisk eller antigenomisk NDV-RNA, enten av villtype eller modifisert, kotransfekteres inn i vertsceller sammen med plasmider som koder for virus-polymerase proteiner, for eksempel NP, P eller L. I en annen utførelse kan plasmider som koder for det antigenomiske NDV-RNA kotransfekteres sammen med plasmider som koder for viruspolymeraseproteinene P og L, siden NP-polymeraseproteinene er det første protein som transkriberes fra den antigenomiske kopi av NDV-genomet er det ikke nødvendig å i tillegg tilveiebringe NP-polymerasen i trans.

10

I en utførelse av foreliggende oppfinnelse kan revers genetikk-teknikken anvendes for modifisering av det kimære negativ tråd-RNA-virus, denne teknikk omfatter fremstilling av syntetiske, rekombinante virus-RNA som inneholder de ikke-kodende områder av negativ tråd-virus-RNA som er nødvendig for gjenkjenning av virus-polymeraser og for pakkesignaler som er nødvendige for dannelse av en moden virus-partikkel. De syntetiske, rekombinante plasmid-DNA og -RNA kan replikeres og gjenvinnes som infektøse viruspartikler ved en rekke teknikker som er kjente innen faget, som beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5,166,057, tildelt 24. november 1992, i U.S. patentskrift nr. 5,854,037, tildelt 29. desember 1998, i europeisk patentskrift EP 0702085A1, publisert 20. februar 1996, i U.S. patentsøknad nr. 09/152,845, i de internasjonale patentskrifter PCT WO97/12032 publisert 3. april 1997, WO 96/34625, publisert 7. november 1996, i europeisk patentskrift EP-A780475, WO99/02657, publisert 21. januar 1999, WO 98/53078, publisert 26. november 1998, WO 98/02530, publisert 22. januar 1998, WO 99/15672, publisert 1. april 1999, WO 98/13501, publisert 2. april 1998, WO 97/06270, publisert 20. februar 1997, og EPO 780 475A1, publisert 25. juni 1997, som alle inkorporeres heri ved referanse i sin helhet.

Det finnes en rekke forskjellige tilnærminger som kan anvendes for anvendelse av revers genetikk-tilnærmingen for gjenvinning av negativ tråd-RNA-virus. For det første kan rekombinante RNA syntetiseres fra en rekombinant DNA-templat og rekonstrueres in vitro med rensset viruspolymerasekompleks for dannelse av rekombinante ribonukleoproteiner (RNP) som kan anvendes for transfeksjon av celler. I en annen tilnærming oppnås en mer effektiv transfeksjon dersom de virale polymerase proteiner foreligger under transkripsjonen av de syntetiske RNA, enten *in vitro* eller *in vivo*. Med denne tilnærming kan de syntetiske RNA transkriberes fra cDNA-plasmider som enten kotranskriberes *in vitro* sammen med cDNA-plasmider som koder for polymerase-

35

proteinene, eller transkriberes *in vivo* i nærvær av polymeraseproteiner, dvs. i celler som forbigående eller konstitutivt uttrykker polymeraseproteinene.

I en alternativ utførelse kan en kombinasjon av revers genetiske-teknikker og reassorteringsteknikker anvendes for utforming av svekkede virus som har de ønskede epitoper i segmenterte RNA-virus. For eksempel kan et svekket virus (dannet ved naturlig seleksjon, mutagenese eller ved revers genetiske teknikker) og en stamme som bærer den ønskede vaksineepitop (dannet ved naturlig seleksjon, mutagenese eller revers genetiske teknikker) koinfiseres inn i verter som tillater reassortering av de segmenterte genomer. Reassortert virus som fremviser både den svekkede fenotype og den ønskede epitop kan så selekteres.

Etter reassortering kan de nye virus isoleres og deres genomer identifiseres ved hybridiseringsanalyse. I ytterligere tilnærminger beskrevet heri kan produksjonen av infektøst, kimært virus utføres i vertscellesystemer som uttrykker et NDV-virus polymerase protein (for eksempel i virus/vertscelleeksepresjonssystemer, transformerte cellelinjer modifisert slik at de uttrykker et polymerase protein osv.), slik at infektøst, kimært virus gjenvinnes. I dette tilfellet er det ikke nødvendig å anvende hjelpervirus, siden denne funksjon tilveiebringes av de uttrykte viruspolymerase proteinene.

I samsvar med foreliggende oppfinnelse kan enhver teknikk som er kjent blant fagfolk anvendes for å oppnå replikasjon og gjenvinning av kimære virus. En tilnærming omfatter tilførsel av virusproteiner og funksjoner som er nødvendige for replikasjon *in vitro*, før transfeksjon av vertscellene. I en slik utførelse kan virusproteiner tilføres i form av villtypevirus, hjelpervirus, rensede virusproteiner eller rekombinant uttrykte virusproteiner. Virusproteinene kan tilføres før, under eller etter transkripsjonen av de syntetiske cDNA eller RNA som koder for det kimære virus. Hele blandingen kan anvendes for transfeksjon av vertsceller. I en annen tilnærming kan virusproteiner og funksjoner som er nødvendige for replikasjonen tilføres før eller under transkripsjonen av de syntetiske cDNA eller RNA som koder for det kimære virus. I en slik tilnærming tilføres virusproteiner og funksjoner som er nødvendige for replikasjonen i form av villtypevirus, hjelpervirus, virusekstrakter eller innføring av syntetiske cDNA eller RNA som uttrykker virusproteinene i vertscellen ved infeksjon eller transfeksjon. Denne infeksjon/transfeksjon finner sted før eller samtidig med innføring av de syntetiske cDNA eller RNA som koder for det kimære virus.

I en spesielt foretrukket tilnærming kan celler modifisert slik at de uttrykker alle NDV-virus gener føre til dannelse av infektøst, kimært virus som inneholder den ønskede genotype, noe som fjerner behovet for et seleksjonssystem. Teoretisk sett kan man erstatte ethvert av de seks genene eller deler av ethvert av de seks genene i NDV med en fremmed sekvens. En nødvendig del av denne ligning er imidlertid evnen til å omformere det defekte virus (defekt siden et normalt virusgenprodukt mangler eller er endret). En rekke mulige tilnærminger foreligger for å omgå dette problem. I en tilnærming kan et virus som har et mutant protein dyrkes i cellelinjer som er konstruert for konstitutiv ekspresjon av villtypeversjonen av det samme protein. På denne måte komplementerer cellelinjen mutasjonen i viruset. Lignende teknikker kan anvendes for konstruksjon av transformerte cellelinjer som konstitutivt uttrykker ethvert av NDV-genene. Disse cellelinjer, som er fremstilt for ekspresjon av virusproteinene, kan anvendes for komplementering av defekten i det rekombinante virus og derved omformere det. Alternativt kan visse naturlige vertssystemer være tilgjengelige for omformering av rekombinant virus.

I ytterligere en utforming kan virusproteiner og funksjoner som er nødvendige for replikasjonen tilføres som genetisk materiale i form av syntetiske cDNA eller RNA, slik at disse kotranskriberes sammen med de syntetiske cDNA eller RNA som koder for det kimære virus. I en spesielt foretrukket tilnærming kotransfekteres plasmider som uttrykker det kimære virus og viruspolymerasen og/eller andre virusfunksjoner i vertsceller, som beskrevet i eksemplene, se seksjon 11 nedenfor.

En annen tilnærming for omformering av det rekombinante virus kan omfatte dyrking sammen med villtypevirus. Dette kan gjøres ved ganske enkelt å ta rekombinant virus og koinfiserer celler med dette og et annet villtypevirus (fortrinnsvis en kukoppestamme). Villtypeviruset vil komplementere det defekte virusgenprodukt og tillate vekst av både villtypevirus og rekombinant virus. Alternativt kan et hjelpervirus anvendes for å understøtte omformering av det rekombinante virus.

I en annen tilnærming kan syntetiske templatere replikeres i celler som er koinfisert med rekombinante virus for ekspresjon av NDV-viruspolymeraseproteinene. Faktisk kan denne fremgangsmåte anvendes for gjenvinning av rekombinant, infektøst virus i samsvar med foreliggende oppfinnelse. For dette formål kan NDV-polymeraseproteinene uttrykkes i ethvert ekspresjonsvektor/vertscellesystem, innbefattet, men ikke begrenset til, virale ekspresjonsvektorer (for eksempel kukoppevirus, adenovirus, bakulovirus, osv.) eller cellelinjer som uttrykker et polymeraseprotein (se for eksempel Krystal et al.,

1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2709-2713). Videre kan infeksjon av vertsceller som uttrykker alle seks NDV-proteiner føre til produksjon av infektiose, kimære viruspartikler. Dette system vil fjerne behovet for et seleksjonssystem, siden alle rekombinante virus som dannes vil være av den ønskede genotype. Det bør bemerkes at  
 5 det kan være mulig å konstruere et rekombinant virus uten å endre virusets levedyktighet. Disse endrede virus vil da være vekstkompetente og ikke trenge hjeperfunksjoner for replikasjon.

#### 5.4. VAKSINEPREPARATER VED ANVENDELSE AV DE KIMÆRE VIRUS

10

Foreliggende oppfinnelse omfatter vaksinepreparater som inneholder det modifiserte negativ tråd-RNA-virus ifølge foreliggende oppfinnelse. Oppfinnelsen omfatter  
 anvendelse av rekombinant NDV-virus som har blitt modifisert i vaksinepreparater for å  
 gi beskyttelse mot NDV-infeksjon. I ytterligere en utførelse kan de rekombinante  
 15 NDV-virus ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes som bærer for ekspresjon av fremmede epitoper som induserer en beskyttende respons mot enhver av en rekke patogene organismer.

Oppfinnelsen omfatter vaksinepreparater som skal tilføres til mennesker og dyr.  
 20 Nærmere bestemt omfatter oppfinnelsen vaksinepreparater for tilførsel til kjæledyr, innbefattet hunder og katter, ville dyr, innbefattet rever og vaskebjørner, og husdyr, innbefattet kveg, hester, svin, sauer og geiter, og fjærfe, innbefattet kylling og kalkun.

Oppfinnelsen omfatter vaksinepreparater som er anvendbar mot midler som forårsaker  
 25 sykdom i fjærfe, innbefattet NDV, Marek's sykdomsvirus (MDV), Infeksiøs bursal sykdomsvirus (IBDV), infeksiøs bronkittvirus (IBV), infeksiøs bursittvirus, kylling-anemivirus (CAV), infeksiøs laryngotrakeittvirus (ILV), fugleleukosevirus (ALV), retikuloendoteliosevirus (RV) og fugleinfluensa.

30 I en annen utførelse omfatter oppfinnelsen vaksinepreparater som er anvendbare mot midler som forårsaker sykdom hos kjæledyr, innbefattet rabiesvirus, katteleukemi-virus (FLV) og "canin distemper"-virus. I ytterligere en utførelse omfatter oppfinnelsen vaksinepreparater som er anvendbare for å beskytte husdyr mot vesikuløs stomatittvirus, rabiesvirus, kvegpestvirus, og svinekoppevirus, og videre for beskyttelse av ville dyr  
 35 mot rabiesvirus.

Svekkede virus dannet ved den reversgenetiske tilnærming kan anvendes i vaksinen og de farmasøytiske preparater som beskrives heri. Reversgenetiske teknikker kan også anvendes for innføring av ytterligere mutasjoner i andre virusgener som er viktige for vaksineproduksjonen – dvs. at epitoper i anvendbare vaksinestammevarianter kan

5 innføres i det svekkede virus. Alternativt kan fullstendig fremmede epitoper, innbefattet antigener avledet fra andre virale eller ikke-virale patogene organismer, innføres i den svekkede stamme. For eksempel kan antigener fra ikke-beslektede virus som HIV (gp160, gp120, gp41), parasitt antigener (for eksempel malaria), bakterielle antigener, soppantigener eller tumorantigener innføres i den svekkede stamme. Alternativt kan

10 epitoper som endrer virusets tropisme *in vivo* innføres i de kimære, svekkede virus ifølge oppfinnelsen.

Nær sagt enhver heterolog gensekvens kan innføres i de kimære virus ifølge oppfinnelsen for anvendelse i vaksiner. Fortrinnsvis kan epitoper som inducerer en

15 beskyttende immunrespons mot enhver av en rekke patogene organismer, eller antigener som binder nøytraliserende antistoffer, uttrykkes ved eller som en del av de kimære virus. Heterologe gensekvenser som kan innføres i de kimære virus ifølge oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, influensaglykoproteiner, nærmere bestemt hemagglutinin H5, H5, Marek's sykdomsvirusepitoper, epitoper fra infektios bursal

20 sykdomsvirus (IBDV), infektios bronkittvirus (IBV), kyllinganemivirus (CAV), infektios laryngotrakeitt virus (ILV), fugleleukosevirus (ALV), retikuloendoteliosevirus (RV), fugleinfluensavirus (AIV), rabiesvirus, kattleukemivirus, "canin distemper"-virus, vesikuløstomatittvirus, kvegpestvirus og svinekoppevirus (se Fields et al., (red.), 1991, Fundamental Virology, 2. utgave, Raven Press, New York, som inkorporeres heri

25 i sin helhet ved referanse).

I ytterligere en utførelse omfatter heterologe gensekvenser som kan innføres i de kimære virus sekvenser som koder for proteiner med immunforsterkende aktivitet. Eksempler på immunforsterkende proteiner omfatter, men er ikke begrenset til,

30 sytokiner, interferon type 1, gamma-interferon, kolonistimulerende faktorer, interleukin -1, -2, -4, -5, -6 og -12.

I tillegg omfatter heterologe gensekvenser som kan innføres i de kimære virus ifølge oppfinnelsen for anvendelse i vaksiner, men er ikke begrenset til, sekvenser avledet fra

35 et humant immundefisiensvirus (HIV), fortrinnsvis av type 1 eller type 2. I en foretrukket utførelse kan et immunogent HIV-avledet peptid som kan være kilde for et antigen innføres i et kimært NDV, som så kan anvendes for å utløse en immunrespons i

en vertebrat. Slike HIV-avlede peptider kan omfatte, men er ikke begrenset til, sekvenser avledet fra env-genet (dvs. sekvenser som koder for hele eller deler av gp160, gp120 og/eller gp41), pol-genet (dvs. sekvenser som koder for hele eller deler av revers transkriptase, endonuklease, protease, og/eller integrase), gag-genet (dvs. sekvenser som koder for hele eller deler av p7, p6, p55, p17/18, p24/25), tat, rev, nef, vif, vpu, vpr, og/eller vpx.

Andre heterologe sekvenser kan være avledet fra hepatitt B-virus overflate-antigen (HbsAg); hepatitt A- eller C-virus overflateantigener, glykoproteinene fra Epstein Barr-virus; glykoproteinene fra humant papillomavirus, glykoproteinene fra respiratorisk synsital virus, parainfluenzavirus, Sendai-virus, apevirus 5 eller kusmavirus, glykoproteinene fra influensavirus, glykoproteinene fra Herpesvirus (for eksempel gD, gE); VP1 fra poliovirus, antigene terminanter fra ikke-virale patogener som bakterier og parasitter, for å nevne bare noen få. I en annen utførelse kan hele eller deler av immunglobuliner uttrykkes. For eksempel kan variable områder fra anti-idiotypiske immunglobuliner som etterligner slike epitoper innføres i kimære virus ifølge oppfinnelsen.

Andre heterologe sekvenser kan være avledet fra tumorantigener, og de resulterende kimære virus kan anvendes for frembringelse av en immunrespons mot tumorcellene, noe som fører til tumorregresjon *in vivo*. Disse vaksiner kan anvendes i kombinasjon med andre behandlingsformer, innbefattet, men ikke begrenset til, kjemoterapi, strålebehandling, kirurgiske inngrep, beinmargstransplantasjon osv., for behandling av tumorer. I samsvar med foreliggende oppfinnelse kan rekombinante virus utformes slik at de uttrykker tumorassosierte antigener (TAA), innbefattet, men ikke begrenset til, humane tumorantigener som gjenkjennes av T-celler (Robbins og Kwakami, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8:628-636, som inkorporeres heri ved referanse i sin helhet), melanosyttlinjeproteiner, innbefattet gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tyrosinase; hyppig forekommende, tumorspesifikke antigener, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetylglukosaminyltransferase-V, p15; tumor-spesifikke muterte antigener,  $\beta$ -katenin, MUM-1, CDK4; ikke-melanom antigener for brystkarsinom, ovariekarsinom, livmorhalskarsinom og bukspyttkjertelkarsinom, HER-2/neu, humant papillomvirus -E6, -E7, MUC-1.

Man kan utforme enten en levende, rekombinant virusvaksine eller en inaktivert, rekombinant virusvaksine. En levende vaksine kan foretrekkes siden omformering i verten fører til forlenget stimulering av en tilsvarende type og størrelse som den som

forekommer ved naturlige infeksjoner, og som derfor vil gi vesentlig og langvarig immunitet. Fremstilling av slike vaksinepreparater med levende, rekombinant virus kan oppnås ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter som omfatter omformering av viruset i cellekultur eller i allantois hos kyllingembryoer, fulgt av rensing. Siden  
 5 NDV har blitt vist å være ikke-patogent for mennesker er dette virus i tillegg svært godt egnet for anvendelse som en levende vaksine.

I denne sammenheng kan det ved anvendelse av genetisk modifiserte NDV (vektorer) for vaksineformål være ønskelig at disse stammer har svekkede egenskaper. Innføring  
 10 av egnede mutasjoner (for eksempel delesjoner) i templatene som anvendes for transfeksjon kan gi de nye virus svekkede egenskaper. For eksempel kan spesifikke mis”sense”-mutasjoner som er forbundet med temperatursensitivitet eller kulde-tilpasning innføres i delesjonsmutanter. Disse mutasjoner vil være mer stabile enn punktmutasjonene som er forbundet med kulde- eller temperatursensitive mutanter, og  
 15 reversjonsfrekvensen bør være ekstremt lav.

Alternativt kan kimære virus med ”selvmords”-egenskaper konstrueres. Slike virus vil gjennomgå bare en eller noen få replikasjonsrunder i verten. Ved anvendelse som  
 20 vaksine vil det rekombinante virus gjennomgå et begrenset antall replikasjonsrunder og indusere et tilstrekkelig nivå av immunrespons, men det vil ikke omformes videre i den humane vert og i sykdom. Rekombinante virus som mangler et eller flere av NDV-genene eller som besitter muterte NDV-gener vil ikke være i stand til å gjennomgå flere replikasjonsrunder. Defekte virus kan fremstilles i cellelinjer som permanent uttrykker ett eller flere slike gener. Virus som mangler ett eller flere essensielle gener  
 25 vil replikeres i disse cellelinjer, men vil ved tilførsel til den humane vert ikke være i stand til å fullføre en replikasjonsrunde. Slike preparater kan transkribere og translaterere – i denne fruktesløse syklus – et tilstrekkelig antall gener til at det induseres en immunrespons. Alternativt kan større mengder av stammene tilsettes, slik at disse preparater fungerer som inaktiverte (drepte) virusvaksiner. For inaktiverte  
 30 vaksiner foretrekkes det at det heterologe genprodukt uttrykkes som en virusbestanddel, slik at genproduktet er forbundet med viruspartikkelen. Fordelen ved slike preparater er at de inneholder native proteiner og ikke gjennomgår inaktivering ved behandling med formalin eller andre midler som anvendes ved fremstilling av drepte virusvaksiner. Alternativt kan mutert NDV fremstilt fra cDNA være svært svekket, slik at det kun  
 35 replikeres i noen få runder.

- I en annen utførelse vedrørende denne side av oppfinnelsen kan inaktiverte vaksinepreparater fremstilles ved anvendelse av konvensjonelle teknikker for "dreping" av de kimære virus. Inaktiverte vaksiner er "døde" i den forstand at deres infektivitet er ødelagt. Ideelt sett ødelegges virusets infektivitet uten at immunogenisiteten påvirkes.
- 5 For fremstilling av inaktiverte vaksiner kan det kimære virus dyrkes i cellekultur eller i allantois hos kyllingembryoer, renses ved soneultrasentrifugering, inaktiveres med formaldehyd eller  $\beta$ -propiolakton og slås sammen. Den resulterende vaksine inokuleres vanligvis intramuskulært.
- 10 Inaktiverte virus kan utformes med en egnet adjuvans for å styrke den immunologiske respons. Slike adjuvanser kan omfatte, men er ikke begrenset til, mineralgeler, for eksempel aluminiumhydroksid, overflateaktive forbindelser som lysolesitin, pluronsyre-polyoler, polyanioner, peptider, oljeemulsjoner, og muligens nyttige humane adjuvanser som BCG og *Corynebacterium parvum*.
- 15 Mange fremgangsmåter kan anvendes for innføring av vaksinepreparatene beskrevet ovenfor, disse omfatter, men er ikke begrenset til, oral, intradermal, intramuskulær, intraperitoneal, intravenøs, subkutan og intranasal tilførsel. Det kan være å foretrekke å innføre det kimære virusvaksinepreparat via den naturlige infeksjonsvei for den
- 20 patogene organisme som vaksinen er utformet for.

## 6. EKSEMPEL: EKSPRESJON OG PAKKING AV ET FREMMED GEN VED REKOMBINANT NDV

5 Ekspresjon av kloramfenikol transferasegenet (CAT) ved anvendelse av NDV-minigenom beskrives. NDV-minigenom ble fremstilt ved anvendelse av pNDVCAT, et rekombinant plasmid som inneholder CAT-genet. Plasmid pNDVCAT er et pUC19-plasmid som inneholder, i denne rekkefølge, T7-promoteren, den 5'-ende av genomisk NDV-RNA, omfattende 191 nukleotider av ikke-kodende NDV-RNA-sekvens, 5  
10 innsatte nukleotider (3'C'TAA); den fullstendige kodende sekvens for kloramfenikol transferase (CAT)-genet i revers og komplementær retning, den 3'-ende av den genomiske NDV-RNA-sekvens, omfattende 121 nukleotider av ikke-kodende NDV-RNA-sekvens, et BbsI-kloningssete og flere restriksjonsseter som tillater "run-off"-transkripsjon av templatet. pNDVCAT kan transkriberes ved anvendelse av T7-  
15 polymerase for dannelse av et RNA med flankerende sekvenser fra Newcastle-sykdomsvirus-"sense" rundt et CAT-gen i revers orientering.

Lengden av et paramyksovirus-RNA kan være en hovedfaktor for bestemmelse av RNA-replikasjonsnivået, hvor genomreplikasjonen er mest effektiv dersom det totale  
20 antall nukleotider er et multiplum av seks. For NDV ble spørsmålet hvorvidt denne seks-regel er avgjørende for replikasjonen undersøkt ved fremstilling av CAT-mini-replikoner med varierende lengde, hvor lengden varierte med fra ett til fem nukleotider. Bare en slik konstruksjon, hvis genom var delbart med seks, kunne indusere høy CAT-aktivitet.

25

### 6.1. KONSTRUKSJON AV NEWCASTLE-SYKDOMSVIRUS-MINIGENOMET

For konstruksjon av et NDV-minigenom, som beskrevet nedenfor, ble følgende strategi  
anvendt: Den 5'-terminale sekvens fra genomisk NDV-RNA ble beholdt ved RACE  
30 (Gibco, BRL) ved anvendelse av standard teknikker innen faget. Templatet for RACE-reaksjonen var genomisk RNA som var rensset fra NDV-viruspartikler. NDV-CL: California/11914/1944-lignende). Som vist i figur 3 omfattet denne terminale sekvens 64 nukleotider fra en "trailer"-sekvens pluss 127 nukleotider fra det ikke-translaterte området i L-genet. I nabostilling til virusnukleotidsekvensen på 191 baser ble en  
35 sekvens på 5 nukleotider (3'CCTTAA) innsatt. Et CAT-gen som omfattet 667 nukleotider fra den åpne leseramme for CAT var plassert mellom de ikke-kodende områder fra virusets 5'- og 3'-ende. For beholdelse av det 3'-terminale området fra

NDV-sekvensen ble RT-PCR anvendt. Templatet for RT-PCR-reaksjonen var *in vitro*-polyadnylert genomisk RNA fra NDV. Som vist i figur 3 besto det 3'-terminale området på 121 nukleotider av 56 nukleotider fra det ikke-translaterte området i NP-genet pluss 65 nukleotider fra en ledersekvens. Den resulterende konstruksjon av NDV-minigenomet er vist i figur 1. Nukleotidsekvensene til det 3'- og 5'-ikke-kodende terminale området er vist i figur 3.

## 6.2. KONSTRUKSJON AV EKSPRESJONSPLASMIDER FOR NP, P & L FRA NDV

10

Som beskrevet i seksjon 5 krever transkripsjon eller replikasjon av et negativ tråd-RNA-genom at flere proteinbestanddelere bringes inn sammen med viruset, innbefattet L-proteinet, P-proteinet og NP-proteinet. For å lette ekspresjon fra NDV-minigenomet ble genene som kodet for L-, P- og NP-proteinet klonet inn i pTM1-ekspresjonsvektorer, som illustrert i figur 2A-C. pTM1-ekspresjonsvektorene omfatter en T7-promoter, flere klonings seter for innsetting av genet av interesse (L, P eller NP), en T7-terminator, et replikasjonsorigo fra pUC19 og et ampisillinresistensgen. For konstruksjon av ekspresjonsplasmidene ble fullengde-DNA for NDV-nukleoprotein (NP), fosfoprotein (P) og polymerase (L) erholdt ved RT-PCR-amplifisering. Disse DNA ble klonet hver for seg inn i T7-polymeraseekspresjonsvektoren pTM1.

20

## 6.3. RNA-TRANSKRIPSJON FRA NDV-MINIGENOMET

RNA-transkripsjon fra NDV-minigenoplasmidet ble utført med settet Ribomax (Promega) som beskrevet i manuskriptene. For å oppnå "run-off" transkripsjon ble 1 µg NDV-minigenomplasmid (pNDVCAT) kuttet med Bbs I. Det lineariserte plasmid ble så anvendt som templat i transkripsjonsreaksjonen (i 2 timer ved 37°C). For fjerning av templat-DNA ble den resulterende reaksjonsblanding behandlet med RNase-fri Dnase (i 15 minutter ved 37°C) og rensset ved fenol-kloroform ekstraksjon fulgt av utfelling med etanol.

30

## 6.4. CELLETRANSFEKSJONER

Cos-1-celler eller 293T-celler ble dyrket i 35 mm skåler og infisert med hjelperviruset ved en infeksjonsmultiplisitet (moi) på tilnærmet 1 i 1 time før transfeksjonen. Cellene ble så transfektert med ekspresjonsvektorene som koder for NP-, P- og L-proteinene fra NDV. Nærmere bestemt ble transfeksjonene utført med DOTAP (Boehringer

35

Mannheim). Etter hjelpervirusinfeksjonen ble cellene transfektert med pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg), og pTM1-L (0,1 µg) i 4 timer. Kontrolltransfeksjoner hvor L-proteinet manglet ble utført i et parallelt sett med celler med pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg) og narre-pTM1-L (0 µg). Etter 4 timers inkubering ble cellene transfektert med  
 5 RNA (se fig. 1) med 0,5 µg NDV-CAT. Etter RNA-transfeksjonen ble cellene inkubert i 18 timer. Cellelysaterne ble så fremstilt for CAT-analysen.

### 6.5. CAT-ANALYSER

10 CAT-analyser ble utført ifølge standardfremgangsmåter, tilpasset fra Gorman et al., 1982, Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051. Analyseblandingen inneholdt 10 µl <sup>14</sup>C-kloramenikol (0,5 µCi; 8,3 nM; NEN), 20 µl 40 mM acetyl-CoA (Boehringer) og 50 µl celleekstrakter i 0,25 M Tris-buffer (pH 7,5). Inkubasjonstiden var 16-18 timer.

### 15 6.6. RESULTATER

I alle cellelinjer transfektert med ekspresjonsvektorene for NP, P og L og det kimære NDV-CAT-RNA ble høyt ekspresjonsnivå av CAT erholdt 18 timer etter infeksjonen. Kontrolltransfektete celler som manglet L-proteinet uttrykte ikke CAT.

20

## 7. GJENVINNING AV INFEKTIØSE NDV-VIRUS VED ANVENDELSE AV RNA AVLEDET FRA SPESIFIKT, REKOMBINANT DNA

Eksperimentene som beskrives i underavsnittene nedenfor viser gjenvinning av  
 25 infektios NDV ved anvendelse av RNA avledet fra spesifikke, rekombinante DNA. RNA som tilsvare det kimære NDV-CAT-RNA kan anvendes for å vise at de 191 nukleotidene fra 5'-enden og de 121 nukleotidene fra den 3'-enden av virus-RNA inneholder alle signaler som er nødvendige for transkripsjon, replikasjon og pakking av modell-NDV-RNA. RNA som inneholder alle transkripsjonsheter i NDV-genomet  
 30 kan uttrykkes fra transfektete plasmider. Denne teknologi tillater således utforming av infektios NDV-virus ved anvendelse av cDNA-kloner og setespesifikk mutagenese av deres genomer. Videre kan denne teknologi tillate konstruksjon av infektios, kimære NDV-virus som kan anvendes som effektive vektorer for genekspressjon i vevskultur, dyr og mennesker.

35

## **8. EKSEMPEL: REKOMBINANT NEWCASTLE-SYKDOMSVIRUS INNEHOLDENDE EN HIV-ANTIGEN gp160-EPITOP INNSATT I NDV-GENOMET**

5 I eksemplet som presenteres her konstrueres et kimært NDV for ekspresjon av et heterologt antigen avledet fra gp160 fra HIV. Eksperimentene som beskrives i underavsnittene nedenfor viser anvendelse av et rekombinant RNA-templat for dannelse av et kimært NDV som uttrykker et HIV gp160-avledet peptid inne i NDV-genomet, og dette kimære NDV anvendes videre for utløsning av en humoral og celleformidlet  
10 immunrespons i en vertebrat.

### **8.1. KONSTRUKSJON AV PLASMID**

Rekombinante NDV-cDNA-kloner som uttrykker HIV gp160-proteiner kan konstrueres  
15 på en rekke måter som kjente innen faget. For eksempel kan, som vist i figur 4, Env- og Gag-proteiner fra HIV innsettes i NDV på en rekke steder. I ett eksempel er Env- og Gag-proteinet innsatt mellom M- og L-genet. I et annet eksempel er Env- og Gag-proteinet innsatt 3' for NP-genet (mellom ledersekvensen og NP). Alternativt kan disse HIV-proteiner innføres mellom NDV-kappeproteinene (HN og F) i den 3'-enden. Disse  
20 proteiner kan også innsettes i eller mellom hvilke som helst av NDV-genene.

### **8.2. DANNELSE AV INFEKTIØST, KIMÆRT VIRUS**

Transfeksjon av RNA avledet fra plasmid som omfatter et rekombinant ND-genom inn i  
25 celler som for eksempel COS eller 293 MDBK og seleksjon av infektøst, kimært virus kan utføres som beskrevet tidligere. Se U.S. patentskrift nr. 5,166,057, som inkorporeres heri ved referanse i sin helhet. Det resulterende RNA kan transfekteres inn i celler som er infisert med villtypevirus ved anvendelse av standard fremgangsmåter for transfeksjon. Etter transfeksjonen kan supernatanten oppsamles og anvendes i  
30 forskjellige fortyninger for infeksjon av nye celler i nærvær av NDV-antiserum. Supernatanten kan også anvendes for plaque-analyse i nærvær av det samme antiserum. Gjenvunnet virus kan så renses og karakteriseres og anvendes i for eksempel antistoff-fremstilling.

### 8.3. ANALYSE AV HEMAGLUTINERINGSINHIBERING OG VIRUS NØYTRALISERING

5 Analyser av hemaglutineringsinhibering (HI) utføres som tidligere beskrevet (Palmer,  
D.F. et al. 1975, Immunol. Ser. 6:51-52). De monoklonale antistoffer (2G9, 4B2, 2F10,  
25-5) fremstilles ved standard fremgangsmåter med et humant monoklonalt anti-gp120-  
antistoff. Ascites-væske som inneholder monoklonale antistoffer behandles med  
reseptorødeleggende enzym som tidligere beskrevet (Palmer, D.F. et al., 1975,  
10 Immunol. Ser. 6:51-52).

For virusnøytraliseringsanalyse infiseres celler i skåler med 30 mm-diameter med virus.  
Etter adsorpsjon i 1 time påføres et agarlag som inneholder antistoff i forskjellige  
fortynninger. En-cellelaget farges så med 0,1% krystallfiolett 72 timer etter  
15 infeksjonen.

### 8.4 IMMUNISERING

Seks uker gamle BALB/c-mus infiseres enten med virustilført som en aerosol eller  
20 immuniseres intraperitonealt (i.p) med 10 µg renset virus. For alle forsterker-  
immuniseringer tilføres 10 µg renset virus i.p. Serum oppsamles 7 dager etter hver  
immunisering.

### 8.4. RADIOIMMUNOANALYSE

25 Radioimmunoanalysen utføres som tidligere beskrevet (Zaghouani, H. et al., 1991,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5645-6549). Kort beskrevet belegges mikrotiterplater  
med 5 µg/ml peptid-BSA-konjugat, mettes med 2% BSA i fosfatbufferet saltvann (PBS)  
og inkuberes med forskjellige fortynninger av serum. Bundet antistoff vises ved  
30 anvendelse av <sup>125</sup>I-merket monoklonalt anti-muse-kappa-antistoff.

### 8.5. RADIOIMMUNUTFELLING

Den humane T-cellelinje H9 infiseres akutt med HIV. Fire dager etter infeksjonen  
35 merkes  $5 \times 10^7$  infiserte celler med <sup>35</sup>S-cystein, <sup>35</sup>S-metionin og <sup>3</sup>H-isoleusin ved  $2 \times 10^6$   
celler/ml i medium som inneholder 100 µCi av hver isotop pr. ml. Etter 20 timer med  
metabolsk merking nedsentrifugeres de radioaktive viruspartikler i 1 time ved 45.000

rpm. Nedsentrifugerte celler resuspenderes så i 1,0 ml lyseringsbuffer inneholdende 1% Triton X-100 og 2 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF). Tilnærmet 20 µl serum eller 0,5 µg monoklonalt antistoff (i 20 µl PBS) og 175 µl viruspartikkellysat inkuberes over natten ved 4°C i 0,5 ml immunutfellingsbuffer inneholdende 0,5% natrium dodesylsulfat (SDA), 1 mg/ml BSA, 2% triton X-100 og 50 mM natriumfosfat (pH 7,4). Antigen-antistoffkompleksene bindes til protein A-Sepharose-kuler og analyseres ved elektroforese i 10% SDS-polyakrylamidgel.

## 8.6. HIV-1-NØYTRALISERINGSANALYSER

10

*In vitro*-nøytraliseringsanalysen utføres som beskrevet tidligere (Nara, P.L. et al., 1987, AIDS Res. Hum. Retrovirus 3:283-302). Kort beskrevet inkuberes to gangers seriefortynnet varmeinaktivert serum i 1 time ved romtemperatur med 150-200 syncytiumdannende enheter av HIV-virus, fremstilt i H9-celler. Virus/serum-blandingen inkuberes i 1 time ved 37°C med 50.000 DEAE-dekstranbehandlede CEMss-celler (festet til mikrotiterskåler ved anvendelse av poly-L-lysin), eller 50.000 H9-suspensjonsceller. Etter adsorpsjon av virus fjernes ubundet virus og 200 µl medium tilsettes til hver brønn. Fire dager etter infeksjonen fjernes 50 µl medium supernatant for kvantitering av viralt p24<sup>gag</sup>-protein (Coulter Source, Inc.). Det totale antall syncytia i CEMss-celler telles fem dager etter infeksjonen. Nøytraliserings titeret beregnes ved sammenligning ved kontrollbrønner med virus alene og uttrykkes som den resiproke verdi av den høyeste serumfortynning som reduserte antall synsytia med mer enn 50% eller inhiberte p24-syntesen med mer enn 50%.

## 8.7. INDUKSJON AV CTL-RESPONS

25

BALB/c-mus immuniseres med 0,2 ml av en virussuspensjon inneholdende  $10^7$  PFU kimært NDV-virus. 7 dager senere erholdes miltceller og restimuleres *in vitro* i 5 dager med bestrålte miltceller, alene eller belagt med immunogene peptider, i nærvær av 10% konkanavalin A i supernatanten som beskrevet tidligere (Zaghouani, H. et al., 1992, J. Immunol. 148:3604-3609).

30

## 8.9 SYTOLYSEANALYSE

Målculturene belagt med peptider merkes med  $\text{Na}^{51}\text{Cr}_4$  ( $100 \mu\text{Ci}/10^6$  celler) i 1 time ved 37°C. Etter to gangers vask overføres cellene til 96-brønners plater med V-bunn, effektor-cellene tilsettes og platene inkuberes ved 37°C i 7%  $\text{CO}_2$ . Fire timer senere

35

høstes supernatanten og radioaktiviteten måles. Maksimal frigivelse av krom bestemmes ved å inkubere cellene med 1% Nonidet P40 detergent. Prosent spesifikk lysis beregnes ifølge følgende formel:  $[(\text{cpm av prøver} - \text{cpm spontan frigivelse}) / (\text{cpm maksimal frigivelse} - \text{cpm spontan frigivelse})] \times 100$ .

5

## 9. INTRACELLULÆR EKSPRESJON AV KIMÆRT NDV-CAT-RNA

For å øke ekspresjonseffektiviteten fra NDV-minigenomer ble et plasmid (pT7-NDV-CAT-RB) konstruert for intracellulær ekspresjon av NDV-CAT-RNA. Dette ble  
 10 oppnådd ved å innsette et ribozym avledet fra hepatitt delta-virus direkte etter enden av det 3'-ikke-kodende området i NDV-CAT-RNA. Kotransfeksjon av pTM1-NP, pTM1-P, pTM1-L og pT7-NDV-CAT-RT) i 293, 293T, COS1, CV1, eller kyllingembryo-fibroblast (CEF)-celler som på forhånd var infisert med rVV-T7 eller med modifisert Ankara-kukoppevirus som uttrykker T7-polymerase (MVA-T7) førte til høyt CAT-  
 15 aktivitetsnivå (figur 6). CAT-aktiviteten var tilnærmet 100 til 1.000 ganger høyere enn aktiviteten oppnådd ved direkte RNA-transfeksjon av NDV-CAT-RNA.

## 10. GJENVINNING AV INFEKTIØST NDV-VIRUS VED ANVENDELSE AV RNA-AVLEDET, SPESIFIKT, REKOMBINANT DNA

20

For å oppnå gjenvinning av rekombinant virus fra et ikke-virusavhengig, plasmidavledet system ble et plasmid som tillot intracellulær ekspresjon av fullengde antigenom fra NDV oppbygget. NDV-cDNA ble amplifisert med RT-PCR i flere deler fra rensset RNA fra en California-lignende stamme av NDV (NDV-CL) (Meindl et al., 1974  
 25 Virology 58:457-463). cDNA-bitene ble ligert sammen og oppbygget til et plasmid med T7-promoter og flankerende ribozymsekvenser, noe som førte til plasmid pT7-NDV+RB. En taus mutasjon som ga et nytt XmaI-restriksjonssete ble innført i den åpne leseramme for L-protein i pT7-NDV+RB. Encellelag av CEF-celler i 10 cm skåler ble infisert med MVA-T7 ved en infeksjonsmultiplisitet på tilnærmet 0,1. En time senere  
 30 ble cellene transfektert (lipofektert) med 2,4 µg TM1-NP, 1,2 µg TM1-P, 2, 1,2 µg TM-IL og 1,5 µg pT7-NDV+RB. Etter 8 timers inkubering ved 37°C ble friskt medium tilsatt. 20 timer etter transfeksjonen ble kukoppevirusinhibitoren araC tilsatt i en sluttkonsentrasjon på 60 µg/ml. To dager etter transfeksjonen ble friskt medium inneholdende 100 µg/ml araC tilsatt. Supernatant fra transfekterte celler på dag 4 etter  
 35 transfeksjonen ble anvendt for inokulering av allantoinkammeret i 10 dager gamle kyllingegg med embryoer. Etter to dagers inkubering ved 37°C ble allantoinvæskan høstet og funnet å være positiv for nærvær av NDV-CAT-virus ved hemaglutinering.

Analyse av RNA isolert fra gjenvunnet virus bekreftet nærvær av det nyinnsatte XmaI-setet, noe som bekreftet at viruset var avledet fra det klonede plasmid cDNA. En skjematisk fremstilling av gjenvinningsfremgangsmåten er vist i figur 7.

## 5 11. EKSPRESJON AV ET FREMMED GEN FRA ET INTERNT CISTRON I ET KIMÆRT NDV-GENOM

Plasmid pT7-NDV+-CAT/RN-RB ble konstruert ved å erstatte den åpne leseramme for HN i NDV-CL-cDNA med den åpne leseramme for CAT. Tilleggsnukleotider ble  
10 innført i de ikke-kodende områder for å gi en total lengde i nukleotider av det resulterende kimære NDV-RNA som kunne deles med seks. Kotransfeksjon av pT7-NDV+-CAT/HN-RB sammen med pTM1-NP, pTM1-P og pTM1-L i CEF-encellelag som på forhånd var infisert med MVA-T7-virus førte til CAT-aktivitet, målt på dag 2 etter transfeksjonen (figur 8). Disse resultater viser at det er mulig å anvende NDV som  
15 en vektor for ekspresjon av fremmede gener, klonet som transkripsjonsenheter i NDV-genomet.

P a t e n t k r a v

1.

Rekombinant RNA-molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det  
 5 omfatter et bindingssete som er spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-  
 sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og  
 transkripsjon, operativt koblet til en heterolog RNA-sekvens, der bindingssetet spesifikt  
 for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og signaler som er nødvendige  
 10 for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon inngår i de ikke-kodende 3'- og 5'-  
 flankerende områder i det NDV-virale RNA-genom, og der nevnte ikke-kodende 3'- og  
 5'-flankerende områder har følgende virus-"sense"-sekvens:

(3') 5' ACCAAACAGA GAAUCCGUAA GGUACGUUAA AAAGCGAAGG AGCAAUUGAA  
 GUCGCACGGG UAGAAGGUGU GAAUCUCGAG UGCGAGCCCC  
 15 AAGCACAAAC  
 UCGAGAAAGC CUUCUACCAA C 3'  
 (5') 5' CGACAAUCAC AUAUAAUAG GCUCCUUUUC UGGCCAAUUG UAUCCUUGUU  
 GAUUUAAUCA UACUAUGUUA GAAAAAAGUU GAACUCCGAC  
 UCCUUAGGAC  
 20 UCGAACUCGA ACUCAAAUAA AUGUCUUAGA AAAAGAUUGC  
 GCACAGUUAU  
 UCUUGAGUGU AGUCUUGUCA UUCACCAAU CUUUGUUUGG U 3'.

2.

Rekombinant RNA-molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det  
 25 omfatter et bindingssete spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-  
 sykdomsvirus og signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og  
 transkripsjon, operativt koblet til et Newcastle-sykdomsvirusgen, hvori RNA-molekylet  
 inneholder en mutasjon og resulterer i en svekket fenotype eller økt immunogenisitet,  
 30 der bindingssetet spesifikt for en RNA-polymerase fra et Newcastle-sykdomsvirus og  
 signaler som er nødvendige for NDV-formidlet replikasjon og transkripsjon inngår i de  
 ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder i det NDV-virale RNA-genom, og der  
 nevnte ikke-kodende 3'- og 5'-flankerende områder har følgende virus-"sense"-sekvens:

35

## 37

(3') 5' ACCAAACAGA GAAUCCGUAA GGUACGUUAA AAAGCGAAGG AGCAAUUGAA  
 GUCGCACGGG UAGAAGGUGU GAAUCUCGAG UGCGAGCCCG AAGCACAAAC  
 UCGAGAAAGC CUUCUACCAA C 3'

(5') 5' CGACAAUCAC AUAUUAUAG GCUCCUUUUC UGGCCAAUUG UAUCCUUGUU  
 5 GAUUUAAUCA UACUAUGUUA GAAAAAAGUU GAACUCCGAC UCCUUAGGAC  
 UCGAACUCGA ACUCAAAUAA AUGUCUUAGA AAAAGAUUGC GCACAGUUUU  
 UCUUGAGUGU AGUCUUGUCA UUCACCAAU CUUUGUUUGG U 3'.

3.

10 Rekombinant RNA-molekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t  
 v e d at det heterologe RNA koder for et viralt antigen.

4.

15 Rekombinant RNA-molekyl ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t  
 v e d at det virale antigen er avledet fra humant immundefisiensvirus, Newcastle-  
 sykdomsvirus, influensavirus, respiratorisk synsyttialvirus, Marek's sykdomsvirus,  
 infektøs bursalsykdomsvirus, infektøs bronkittvirus, infektøst bursittvirus,  
 kyllinganemivirus, infektøs laryngotrakeittvirus, fugleluekosevirus, retikulo-  
 endoteliosevirus, fugleinfluensavirus, rabiesvirus, "feline distemper"-virus, vesikuløs  
 20 stomatittvirus, kvegpestvirus, eller svinekoppevirus.

5.

15 Rekombinant celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter  
 nukeotidsekvenser som koder for et rekombinant RNA-molekyl ifølge krav 1 eller 2 og  
 25 NDV-RNA polymeraseproteinene P og L.

6.

15 Kimært virus, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et  
 negativ tråd-RNA-virus som inneholder det rekombinante RNA-molekyl ifølge krav 1  
 30 eller 2.

7.

15 Kimært virus ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det  
 heterologe RNA er avledet fra et viralt antigen.

35

8.

Kimært virus ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det

virale antigen er avledet fra humant immundefisiensvirus, Newcastle-sykdomsvirus, influensavirus, respiratorisk synsytialvirus, Marek's sykdomsvirus, infektøs bursalsykdomsvirus, infektøs bronkittvirus, infektøst bursittvirus, kyllinganemivirus, infektøs laryngotrakeittvirus, fugleluekosevirus, retikulo-endoteliøsevirus,  
 5 fugleinfluensavirus, rabiesvirus, "feline distemper"-virus, vesikuløs stomatittvirus, kvegpestvirus, eller svinekoppevirus.

9.

Kimært virus ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det  
 10 heterologe RNA ligger inne i HN-genet i Newcastle-sykdomsvirus.

10.

Fremgangsmåte for fremstilling av et kimært negativ-tråd-RNA-virus, k a r -  
 a k t e r i s e r t v e d at den omfatter transfeksjon av en vertscelle  
 15 med nukleotidsekvenser som koder for det rekombinante RNA ifølge krav 1 eller 2 og virusfunksjonene som er nødvendige for replikasjon og transkripsjon, og gjenvinning av det kimære virus fra kulturen.

11.

Vaksinepreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et  
 20 genetisk modifisert Newcastle-sykdomsvirus som inneholder det rekombinante RNA-molekylet ifølge krav 2 og en fysiologisk akseptert eksipiens, der viruset inneholder modifikasjoner som fører til en svekket fenotype.

25 12.

Vaksinepreparat ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 modifikasjonen er avledet fra en naturlig forekommende mutant.

13.

Vaksinepreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et  
 30 genetisk modifisert, kimært Newcastle-sykdomsvirus som inneholder det rekombinante RNA-molekylet ifølge krav 1 og en fysiologisk akseptert eksipiens, der virusgenomet koder for en heterolog epitop.

35 14.

Vaksinepreparat ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 den heterologe epitop er et viralt antigen.

15.

Vaksinepreparat ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
det virale antigen er avledet fra humant immundefisiensvirus, Newcastle-sykdomsvirus,  
5 influensavirus, respiratorisk synsytialvirus, Marek's sykdomsvirus, infektøs  
bursalsykdomsvirus, infektøs bronkittvirus, infektøst bursittvirus, kyllinganemivirus,  
infektøs laryngotrakeittvirus, fugleluekosevirus, retikulo-endoteliøsevirus,  
fugleinfluensavirus, rabiesvirus, "feline distemper"-virus, vesikuløs stomatittvirus,  
kvegpestvirus, eller svinekoppevirus.

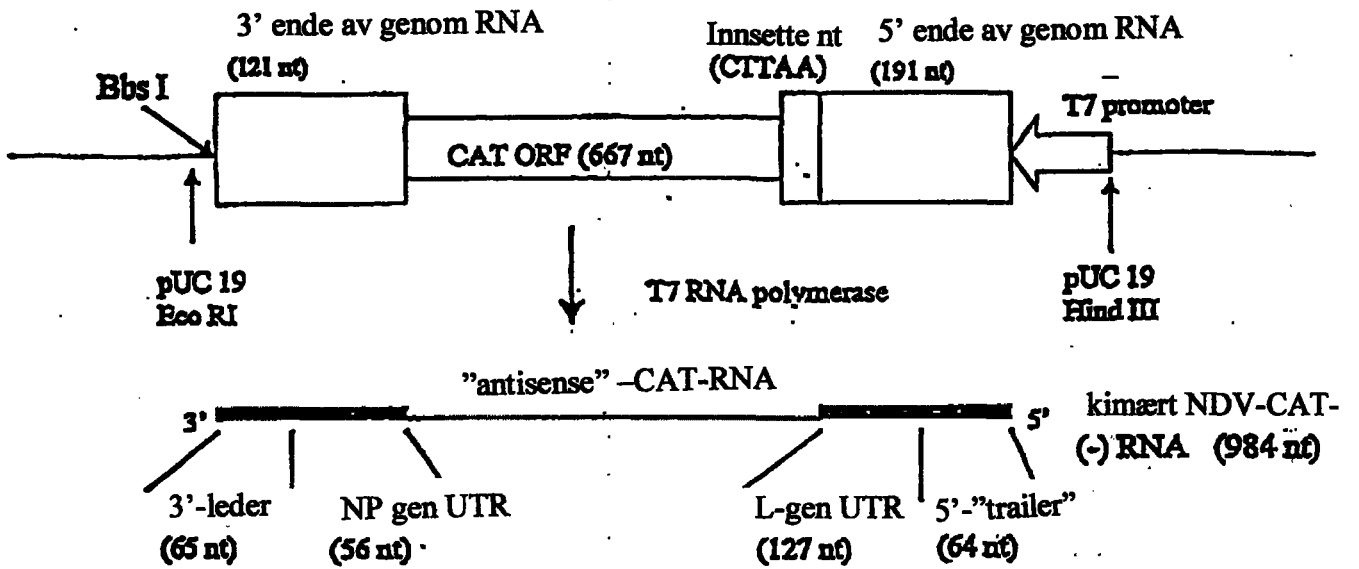
10

16.

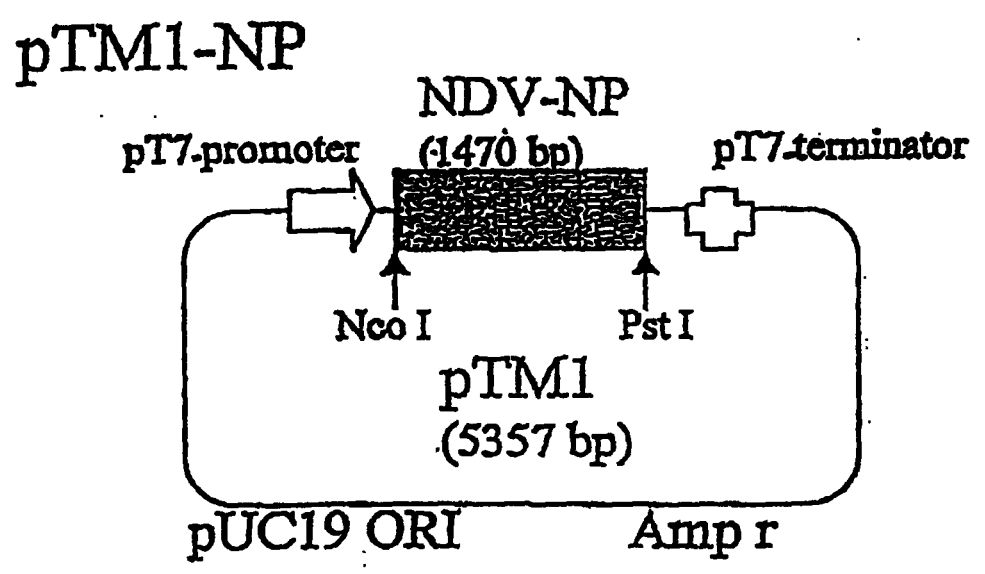
Vaksinepreparat ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
den heterologe epitop er et immunforsterkende protein.

15 17.

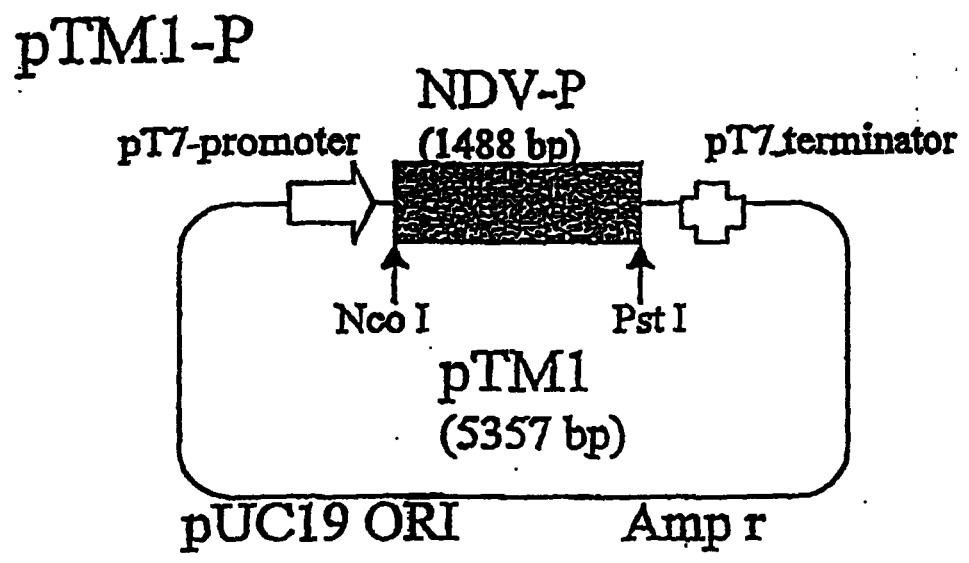
Vaksinepreparat ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
den heterologe epitop er et tumorantigen.



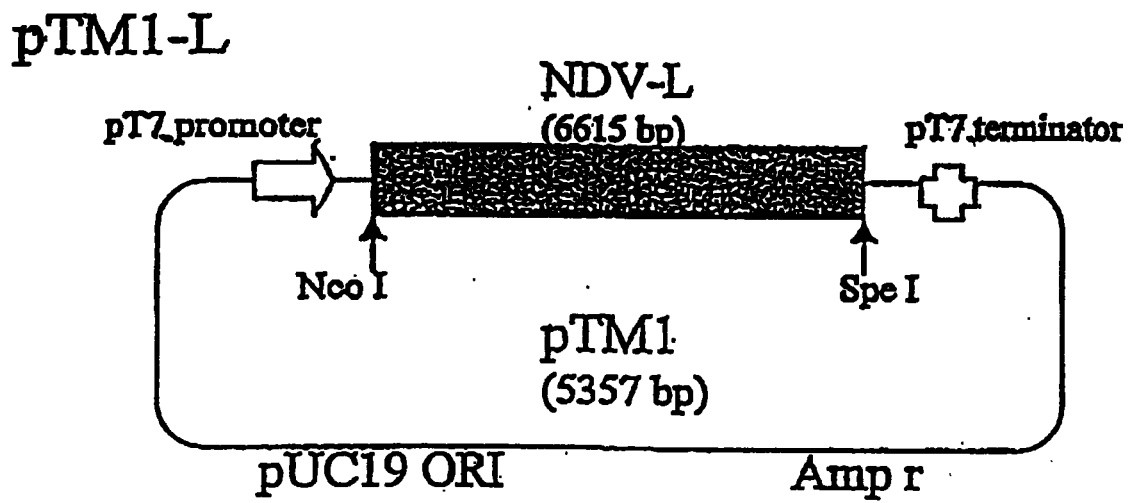
**FIG. 1**



**FIG. 2A**

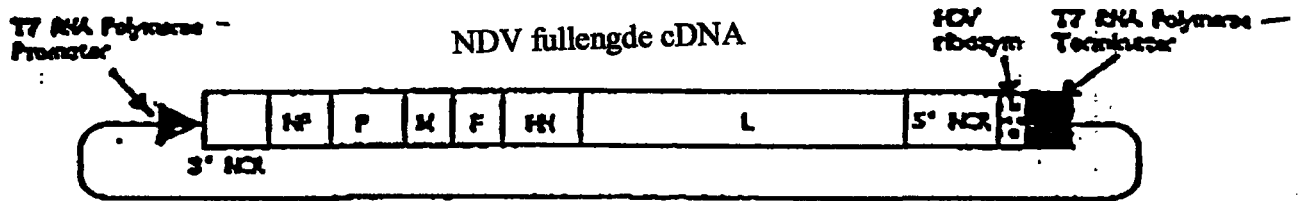


**FIG. 2B**

**FIG. 2C**

5' ACCAAACAGAGAAUCCGUAAGGUACGUUAAAAGCGAAGGAGCAAUUGAAGUOGCACGGG  
UAGAAGGUGUGAAUCUCGAGUGCGAGCCCGAAGCACAAACUCGAGAAAGCCUUCUACCAAC-  
-----CAT-gene (667 nt)-----CUUAA  
CGACAAUCACAUUAUUAUAGGCUCUUUUUCUGGCCAAUUGUAUCUUUGUUGAUUUAUUAUA  
CUAUGUUAGAAAAAGUUGAACUCCGACUCCUUAGGACUCGAACUCGAAUCUCAAUAAAUGU  
CUUAGAAAAAGAUUGCGCACAGUUAUUCUUGAGUGUAGUCUUUGUCAUUCACCAAUUCUUUGU  
UUGGU-3'

**FIG. 3**



**FIG. 4A**

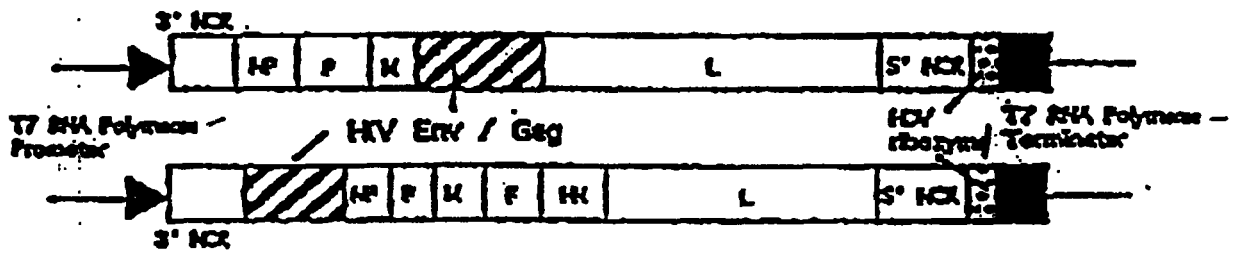


FIG. 4B

8/11

```

1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCCATGCAATTTTTCGCTTCCTCGTTAACTT   50
1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCAATGCTATTTTCCGCTTCCTCGTTAACTT   50
*****
51  CAGCGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
51  CAACGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
** *****
101 AGCTCTTTCGGAAGATGGTTG      121
101 AGCTCTTTCGGAAGACGGTTG      121
*****

```

5'-end

```

1   ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACAAGACTACACTCAAGAATAACTGTG   50

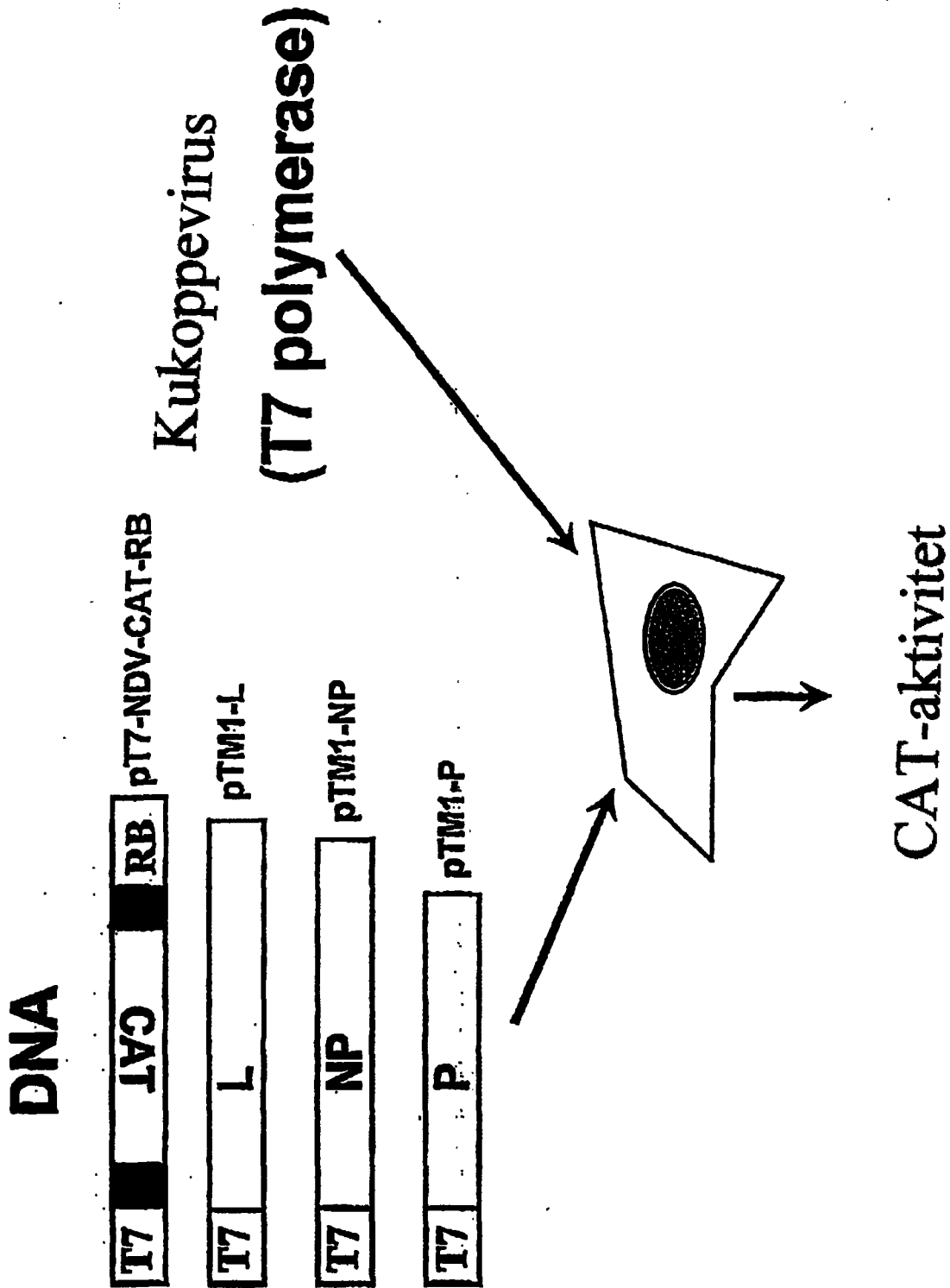
51  cgcaatcctttctcAAGACATTTATTTGAGTTCGAGTTCGAGTCCTAAGG   100
      nnnnnnAAGACATTTATTTGAGTTCGAATTCGAGCTCTAAGG
      *****

101 AGTCGGAGTTCAACTTTTTTCTAACATAGTATGATTAATCAACAAGGAT   150
AGTCGGAGTTCAATTTTTTTCTAACATAGTATAATTAATCACCAAGGAT
*****

151 ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTGTGCG      191
ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTTTCG
*****

```

FIG. 5



**FIG. 6**

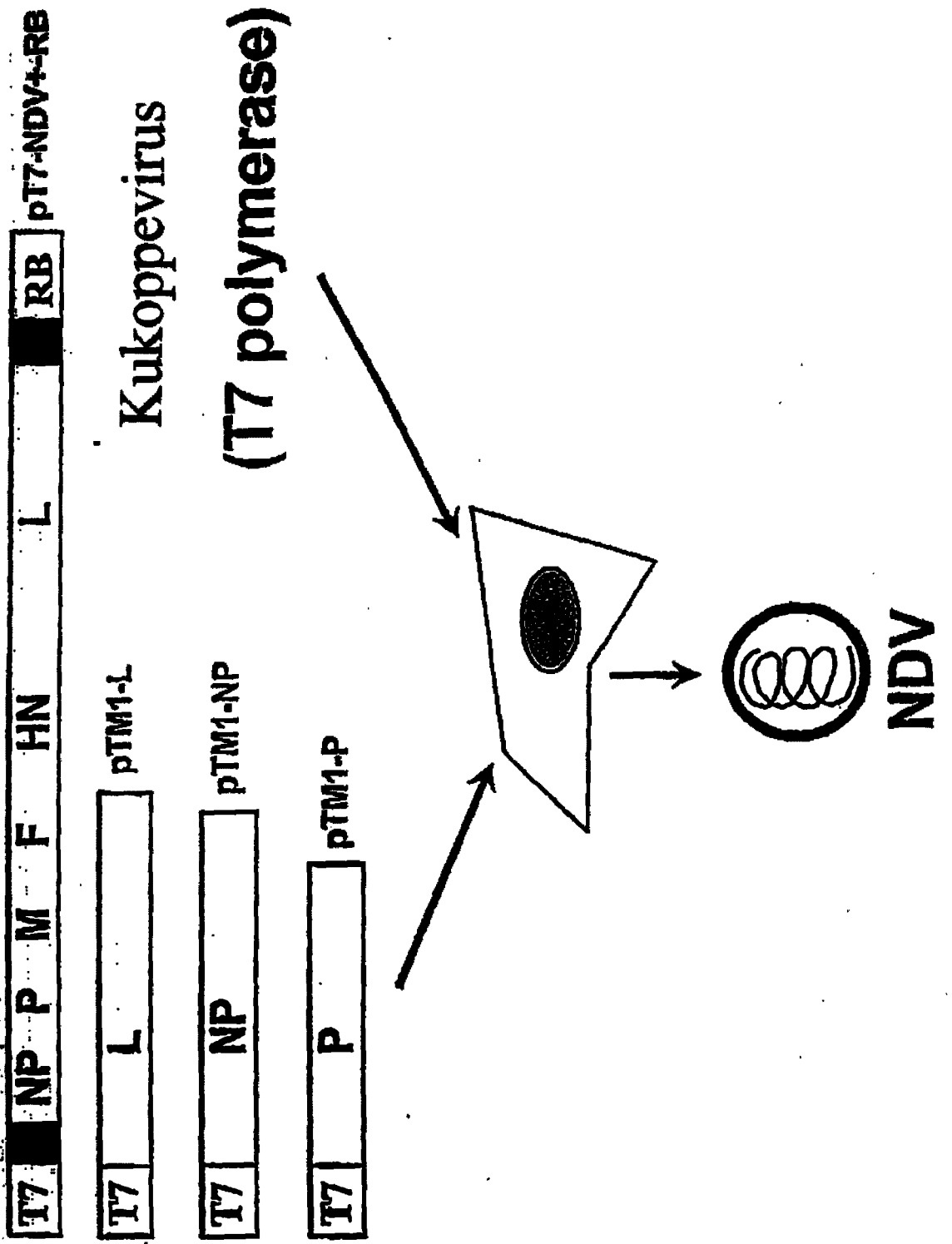


FIG. 7

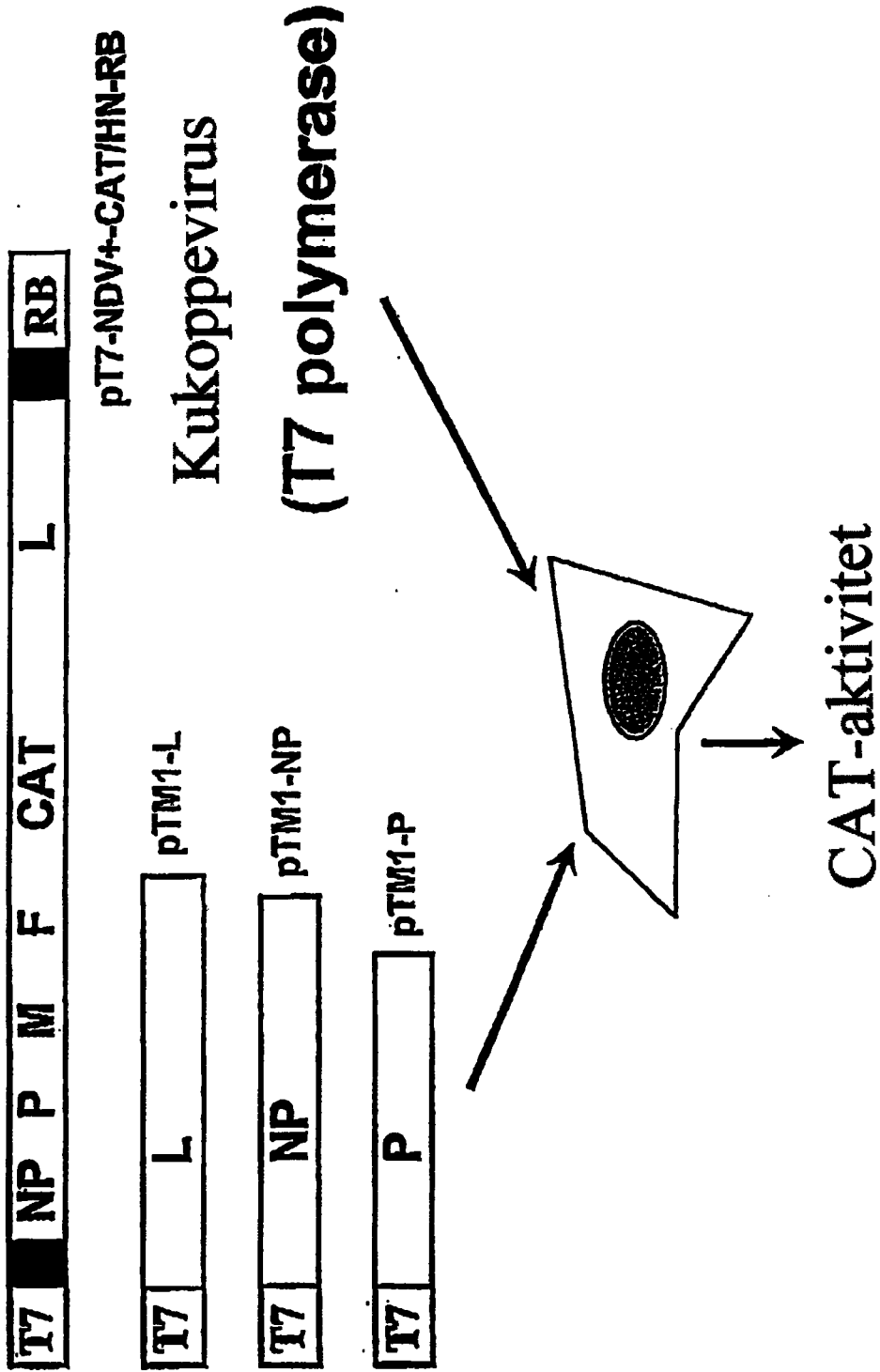


FIG. 8