



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314550**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 7/04

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19931057	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.09.23, PCT/GB91/01632
(22) Inng. dag	1993.03.23	(85) Videreføringsdag	1993.03.23
(24) Løpedag	1991.09.23	(30) Prioritet	1990.09.25, GB, 9020799
(41) Alm. tilgj.	1993.05.03		1991.03.08, GB, 9104903
(45) Meddelt dato	2003.04.07		

(71) Patenthaver	Cantab Pharmaceuticals Research Ltd, Cambridge Science Park, 184 Milton Road, Cambridge CB4 4GN, England, GB
(72) Oppfinner	Stephen Charles Inglis, Cambridge CB4 4GN, England, GB Michael Edward Griffith Boursnell, Cambridge CB4 4GN, England, GB Anthony Charles Minson, Great Shelford, Cambridge CB2 5JJ, England, GB
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et mutant herpesvirus**

(56) Anførte publikasjoner NO 301284, EP A 213894, EP A 386882, WO 90/05538, WO 89/09271

(57) Sammendrag

Mutant virus for anvendelse som en vaksine hvor genomet til viruset er defekt med hensyn på et gen som er essensielt for produksjonen av infeksjons virus er beskrevet. I et aspekt kan den mutante virusen beskytte en mottagelig art immunisert dermed mot infeksjon av den tilsvarende vill-type virus. I et annet aspekt virker den mutante virusen som en vektor for et immunogent protein avledet fra et patogen og som blir kodet av fremmed DNA inkorporert i det mutante viruset. Det mutante viruset kan bli produsert i en rekombinant vertscelle som uttrykker et gen som komplementerer defekten. Mutantviruset er fortrinnsvis infeksiosøst for verten som skal bli beskyttet, men det defekte genet muliggjør for ekspressjon i den infiserte verten av minst noen av de virale genene som kan vekke en celleformidlet immunrespons.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av virale vaksiner. Den vedrører spesielt genmodifiserte mutante virus for anvendelse som vaksiner, vaksiner omfattende de mutante virusene, og fremgangsmåter vedrørende produksjon av vaksiner.

5

Det er vanligvis to typer av virale vaksiner. Den første typen er "drepe"-vaksiner, som er et viruspreparater som er blitt behandlet med en egnet kjemisk forbindelse så som beta-propiolacton. Den andre typen er levende "attenuerte" vaksiner, der virusene er blitt behandlet slik at de er mindre patogene overfor verten, enten ved spesifikk genetisk manipulasjon av virusgenomet, eller, som er mer vanlig, ved overføring i en type vevskultursystem. Disse to typene av vaksiner har begge ulemper. På grunn av at drepte vaksiner ikke replikerer i verten må de bli administrert ved injeksjon og kan derfor danne en uhensiktsmessig type av immunrespons. Salk-vaksinen, som er en drept preparering av poliovirus, produserer en immunoglobulin (Ig) G antistoffrespons, den stimulerer ikke produksjonen av IgA i tarmen som er det naturlige stedet for primærinfeksjonen. Denne vaksinen, til tross for at den kan beskytte individet fra neurologiske komplikasjoner ved poliomyelitt, blokkerer ikke den primære infeksjonen og utviser derfor ikke "herd immunitet". Drepte virus går ikke inn i og replikerer ikke i vertscellene. Derfor er det ikke tilgjengelig noen fordelaktig immunologisk respons overfor ikke-strukturelle proteiner produsert i løpet av replikasjonen. De kan heller ikke stimulere produksjonen av cytotoksiske T-celler rettet mot virusantigener. "Døde" antigener kan bli plukket opp av antigen presenterende celler og presentert for T-celler. Presentasjonen oppstår derimot via MHC klasse II molekyler og fører til stimulering av T-hjelper cellene. T-hjelper cellene hjelper deretter B-cellene til å produsere spesifikke antistoffer mot antigenet. For å stimulere produksjonen av cytotoksiske T-celler må virus-antigener bli prosessert gjennom en bestemt reaksjonsvei inne i den infiserte cellen, og presentert som oppbrutte peptidfragmenter på MHC klasse I molekyler. Denne reaksjonsveien for degradering virker mest effektivt for proteiner som blir syntetisert inne i den infiserte cellen og derfor kan bare virus som går inn i vertsceller og uttrykker immunogent viralt protein danne virusspesifikke cytotoksiske T-celler. Drepte vaksiner er derfor dårlige induserere av cellulær immunitet overfor virusinfeksjon. Fra dette standpunktet er levende, attenuerte vaksiner mer tilfredsstillende.

Frem til nå er levende, attenuerte virus blitt dannet ved deletering av et ikke-essensielt gen eller delvis ødeleggelse av en eller flere essensielle gener (hvor skaden er slik at genene fortsatt er funksjonelle, men ikke fungerer så effektivt). Levende, attenuerte virus har ofte beholdt gjenværende patogenisitet som kan ha en ødeleggende virkning

35

på verten. Dersom ikke attenueringen blir forårsaket av en spesifikk delesjon gjenstår i tillegg muligheten av reversjon til en mer virulent form. Det faktumet at en viss viral proteinproduksjon oppstår i verten betyr at de ofte er mer effektive enn drepte vaksiner som ikke kan produsere et slikt viralt protein.

5

Levende, attenuerte virus, som i tillegg til å bli anvendt som vaksiner i seg selv, kan også bli anvendt som "vaksinevektorer" for andre gener, med andre ord bærere for gener fra et annet virus (eller annet patogen) som en ønsker beskyttelse mot. Vanligvis blir medlemmer av pox virusfamilien for eksempel vacciniavirus anvendt som vaksinevek-
 10 torer. Når et virus blir anvendt som en vaksinevektor er det viktig at det ikke forårsaker patogene virkninger. Det kan kanskje behøve å bli attenuert på samme måte som en enkel virus vaksine blir attenuert. De samme ulempene som de som er beskrevet ovenfor gjelder derfor også i dette tilfellet.

- 15 Det er nå mulig å deletere et gen fra et viralt genom og tilveiebringe en såkalt "komple-
 menterende" celle som gir viruset muligheten til produksjon av det deleterte genet. Dette er oppnådd for visse virus, for eksempel adenovirus, herpesvirus og retrovirus. For adenovirus ble en human cellelinje transformert med fragmenter av adenovirus type 5 DNA (Graham, Smiley, Russel & Nairn, J. Gen. Virol., 36, 59-72, 1977). Cellelinjen
 20 uttrykte visse virale gener og det ble oppdaget at den kunne understøtte veksten av vi-
 rusmutanter hvor disse genene var deletert eller inaktivert (Harrison, Graham & Williams, Virology 77, 319-329, 1977). Til tross for at viruset vokste tilfredsstillende på denne cellelinjen ("komplementerende cellelinje") og produserte standard-virale partik-
 25 ller, kunne det ikke vokse på normale humane celler. Celler som uttrykker den T-
 antigen-kodende regionen til SV40 virusgenomet (et papovavirus) har også vist
 muligheten av å understøtte replikasjonen av virus som spesifikt er deletert i denne
 regionen (Gluzman, Cell, 23, 182-195, 1981). For herpes simplex virus er cellelinjene
 som uttrykker gB glycoprotein (Cai et al., J. Virol. 62, 714-721, 1987) gD glycopro-
 teinet (Ligas og Johnson, J. Virol. 62, 1486, 1988) og "immediate" Early-protein ICP4
 30 (Deluca et al., J. Virol., 56, 558, 1985) blitt produsert, og disse har vist seg å kunne un-
 derstøtte replikasjonen av virus med spesifikt inaktiverte kopier av de tilsvarende ge-
 nene.

- Den foreliggende oppfinnelsen angår fremstilling av et mutant herpesvirus med defekt i
 35 ett spesifikt gen som er essensielt for produksjon av infeksiose viruspartikler, slik at
 viruset er i stand til å infisere normale vertsceller, replikere og uttrykke virale gener i
 nevnte celler, men ikke er i stand til å produsere nye infeksiose partikler i nevnte celler,

at nevnte virus produseres i en komplimenterende vertscelle som har blitt fremstilt for å bære og uttrykke en heterolog nukleotidsekvens som tilveiebringer funksjonen av det defekte genet i nevnte virus, slik at infeksiose viruspartikler kan gjenvinnes fra en kultur av nevnte komplimenterende vertscelle infisert med nevnte virus.

5

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en vaksine som omfatter en virus som beskrevet ovenfor, sammen med en eller flere eksipienter og/eller adjuvants. Det virale genomet kan i seg selv tilveiebringe immunogene, eller kan inneholde et heterologt gen-innskudd som uttrykker det immunogene proteinet.

10

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte som omfatter anvendelse av et virus som beskrevet ovenfor ved fremstilling av en vaksine for terapeutisk eller profylaktisk behandling av en sykdom.

15

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine som omfatter: dyrking av en celle infisert med et virus som har et deletert eller inaktivert viralt gen kodende for et protein som er essensielt for produksjonen av infeksiosøst virus, og hvori vertscellen har en heterolog nukleotidsekvens omfattende nevnte virale gen og som kan uttrykke det essensielle proteinet kodet for av nevnte gen, høsting av viruset som dermed blir produsert og anvendelse av det i en vaksine.

20

Viruset kan være avledet fra herpes simplex virus (HSV) hvor for eksempel genet kodende for glycoprotein H (gH) er blitt inaktivert eller deletert.

25

Det mutante viruset kan også omfatte en heterolog sekvens kodende for et immunogen avledet fra et patogen. vertscellen vil fortrinnsvis være en rekombinant eukaryot cellelinje inneholdende genet kodende for HSV glycoprotein H. Et annet eksempel er at viruset kan være avledet fra en orthopox virus, for eksempel, vaccinia virus, som igjen kan omfatte en heterolog sekvens kodende for et immunogen avledet fra et patogen.

30

Foreliggende oppfinnelse viser en unik måte som kombinerer effektiviteten og tryggheten ved en drept vaksine idet den ekstra immunologiske responsen er induisert av in vivo-produksjonen av det virale proteinet av den attenuerte vaksinen. I foretrukne utførelsesformer omfatter den to trekk. For det første blir et selektert gen inaktivert innenfor virusgenomet, vanligvis ved å danne en spesifikk delesjon. Dette genet vil være involvert i produksjonen av infeksiosvirus, men vil fortrinnsvis ikke forhindre replikasjonen av det virale genomet. Den infiserte cellen kan derved produsere mer viralt protein fra det replikerte genetiske materialet, og i noen tilfeller kan nye viruspartikler bli produ-

35

sert, men disse vil ikke være infeksjøs. Dette betyr at den virale infeksjonen ikke kan spres fra inokulasjonsstedet.

Det kan også anvendes en celle som tilveiebringer viruset med produktet til det deleterte genet og muliggjør derfor at virusen kan vokse i vevskultur. Til tross for at viruset mangler et gen kodende for et essensielt protein, dersom det blir dyrket i den hensiktsmessige vertscellen, vil det formere seg og produsere fullstendige viruspartikler som utenpå ikke kan skjelnes fra det opprinnelige viruset. Dette mutante virus-preparatet er inaktivt idet at det har et defekt genom og ikke kan produsere infeksjøs virus i en normal vert, og kan derfor bli administrert på en trygg måte i mengden som er nødvendig for å danne direkte en humoral respons i verten. Det mutante viruset trenger ikke å være infeksjøs for at cellene til verten blir beskyttet og at de virker på samme måte som en konvensjonelt drept eller attenuert virusvaksine. Det immuniserende viruset er fortrinnsvis i seg selv fortsatt infeksjøs og kan bli bundet til en celle, gå inn i den og initiere den virale replikasjonssyklusen og kan derfor initiere en infeksjon innenfor en vertscelle av artene som skal beskyttes, og deri produsere noe virusantigen. Det er derfor en ytterligere mulighet for å stimulere den cellulære armen til vertens immun system.

Det deleterte eller inaktiverte genet er fortrinnsvis et som er involvert så sent som mulig i den virale syklusen for å tilveiebringe så virale proteiner som mulig in vivo for dannelsen av en immunogen respons. Genet kan for eksempel være involvert i pakkingen eller en annen post-replikativ hendelse, så som gH glycoprotein til HSV. Det selekterte genet kan derimot være et som er involvert i den virale genome replikasjonen og området av proteiner som blir uttrykt in vivo vil avhenge av hvilket stadium genet normalt blir uttrykt. Når det gjelder human cytomegalovirus (HCMV) kan det selekterte genet være et (annet enn Immediate Early gen) som effektivt forhindrer viral genom replikasjon in vivo på grunn av at Immediate Early genet som blir produsert før den virale genom-replikasjonen (og som er essensiell for denne) er sterkt immunogen.

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes for et hvilket som helst virus hvor en eller flere essensielle gener kan identifiseres og deleteres fra eller inaktiveres innenfor virusgenomet. For DNA virus, så som adeno-, herpes-, papova-, papilloma- og parvovirus, kan dette bli oppnådd direkte ved (i) in vitro manipulasjon av klonede DNA kopier av det selekterte, essensielle genet for å danne spesifikke DNA forandringer og (ii) gjeninnføring av den endrede versjonen inn i virusgenomet gjennom standardprosedyrer for rekombinasjon og markør "rescue". Foreliggende oppfinnelse kan også anvendes for RNA virus. Teknikker som muliggjør komplementære DNA kopier av et RNA virusgenom å

bli manipulert in vitro ved standard genetiske teknikker og deretter overført til RNA ved in vitro transkripsjon er nå tilgjengelige. De resulterende RNA kan deretter bli gjeninnført inn i virusgenomet. Teknikken er blitt anvendt for å danne spesifikke forandringer i genomet til både positivt og negativt trådet RNA-virus, for eksempel poliovirus

5 (Racaniello og Baltimore, Science, 214, 916-919, 1981) og influenza virus (Lutyes et al., Cell, 59, 1107-1113, 1989).

I teorien bør et hvilket som helst gen kodende for et essensielt protein, være et potensielt mål for denne tilnærmelsen for å fremstille attenuerte virus. Seleksjonen av genet vil
10 i praksis derimot være basert på et antall betraktninger.

1. Genet bør fortrinnsvis være et som er nødvendig senere i infeksjonen. Replikasjonen av det attenuerte viruset blir derfor ikke avbrutt i den tidlige fasen. Dette betyr at de fleste og muligens alle andre virusantigener vil bli produsert i den infiserte cellen og presentert for vertens immunsystem i sammenheng med vertscelle MHC klasse I molekyler. En slik presentasjon fører til utvikling av cellulær immunitet overfor virusinfeksjon ved produksjon av cytotoksiske T-celler. Cytotoksiske T-celler kan gjenkjenne disse antigenene og derfor drepe virusinfiserte celler. Det er mulig at det deleterte genet kan
15 representere ett som ikke er nødvendig for sammenstilling av virus, men som er nødvendig for at det sammenstilte viruset kan infisere de nye cellene. Et eksempel på et slikt protein er HCV gH proteinet. I fravær av dette proteinet blir HSV virus fortsatt produsert, men de er ikke infeksiose.

25 2. Produktet av det selekterte genet bør ikke i seg selv være toksisk for den eukaryote cellen slik at en komplementerende celle kan bli produsert relativt lett. Dette er derimot ikke et absolutt krav på grunn av at genet kan bli plassert under kontroll av en induserbar promoter i den komplementerende cellen slik at dets ekspresjon kan bli aktivert kun etter behov.

30

Egenskapen til mutasjonen som blir dannet i målgenet er også valgfritt. I en hvilken som helst forandring som produserer et ikke-funksjonelt genprodukt er tilfredsstillende dersom risikoen for reversjon til en villtype struktur er minimalisert. Slike forandringer innbefatter å avbryte målet med ytre sekvenser og danne spesifikke delesjoner. Den
35 mest tilfredsstillende strategien for at en vaksine blir anvendt som terapeutisk og/eller profylaktisk vil være at det dannes en delesjon som omfatter hele sekvensen som skal bli innført i den komplementerende cellen. Denne tilnærmelsen minimaliserer risikoen

for regenerering av villtypevirus gjennom rekombinasjon mellom viruset og celle DNA i den komplementerende cellen.

- Til tross for at det er flere eksempler på kombinasjoner av spesifikt inaktiverte virus og komplementerende celler (se tidligere diskusjon) er disse frem til nå blitt anvendt enten for grunnleggende forskning på virus eller som i tilfelle av retrovirus, for å danne en tryggere vektor for produksjon av transgene dyr. De er ikke blitt anvendt for vaksineformål og det er heller ikke blitt foreslått denne typen av anvendelse.
- 10 Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av en slik inaktivert virus/komplementerende cellekombinasjon for å produsere trygge vaksiner overfor villtype virus og også anvendelse av det samme systemet for å produsere trygge virale vektorer for anvendelse som vaksiner overfor fremmede patogener.
- 15 Et eksempel på en slik vektor er en som er basert på HSV. HSV genomet er stort nok for å romme betraktelig ytterligere genetisk informasjon og flere eksempler på rekombinante HSV virus som bærer og som uttrykker fremmed genetisk materiale er blitt beskrevet (for eksempel Ligas og Johnson, J. Virol. 1988, op.cit.). Et virus med en dele-
 20 sjon i et essensielt virusgen som beskrevet ovenfor, og som også bærer og uttrykker et definert fremmed gen, kan bli anvendt som en trygg vektor for vaksinasjon for å danne en immunrespons overfor det fremmede proteinet.

- Et spesielt kjennetegn på HSV er at det kan bli latent i neuroner til infiserte individer og av og til reaktivere, noe som fører til en lokal lesjon. En HSV med en dele-
 25 sjon i et essensielt virusgen og uttrykking av et fremmed gen kan bli anvendt for å produsere latent infeksjon av neuroner med hensikt i det behandlede individet. Reaktivering av en slik latent infeksjon vil ikke føre til produksjonen av en lesjon på grunn av at virusvektoren ikke vil kunne replikere fullstendig, men vil resultere i opprinnelse av den opprinnelige delen av virusets replikasjonsyklus. I løpet av denne tiden vil ekspresjon av det frem-
 30 mede antigenet kunne oppstå og dette fører til dannelsen av en immunrespons. I en situasjon hvor det deleterte HSV genet spesifiserte et protein som ikke var nødvendig for virussammenstilling, men bare for infektiviteten til de sammenstilte virusene, kan et slikt fremmed antigen bli inkorporert inn i de sammenstilte viruspartiklene og føre til forsterkning av dets immunogene effekt. Denne ekspresjonen av det fremmede genet og
 35 inkorporering av dets protein i en viral partikkel kan selvfølgelig også oppstå ved det stadiet hvor det mutante viruset først blir produsert i dets komplementerende vert,

hvorpå det mutante viruset når anvendt som en vaksine, øyeblikkelig ville presentere det fremmede proteinet for artene som blir behandlet.

I et annet eksempel kan vaccinia viruset, et poxvirus, bære og uttrykke gener fra forskjellige patogener, og det er blitt vist at disse danner effektive vaksiner når anvendt i eksperimentelle systemer i dyr. Potensialet for anvendelse i mennesker er stort, men på grunn av de kjente bivirkningene som er assosiert med den spredte anvendelsen av vaccinia som en vaksine overfor koppper, er det motstand mot anvendelse av et umodifisert vacciniavirus i stor skala i mennesker. Det har vært forsøk på å attenuere vaccinia virus ved deletering av ikke-essensielle gener så som vekstfaktorgenet til vaccinia (Buller, Chakrabarti, Cooper, Twardzik & Moss, J. Virology 62, 866-874, 1988). Slike attenuerte virus kan derimot fortsatt replikere in vivo, men i redusert nivå. Vaccinia virus med en delesjon i et essensielt gen er enda ikke blitt produsert, men et slikt virus som er deletert i et essensielt gen som beskrevet ovenfor, med dets komplementerende celle for vekst, vil gi en tryggere versjon av denne vaksinevektoren.

En ytterligere fordel med denne generelle strategien for immunisering overfor heterologe proteiner er at det kan være mulig å utføre flere effektive vaksinasjoner med samme virusvektor på en måte som ikke er mulig med konvensjonelle levende virusvektorer. På grunn av at en standard levende virusvaksine sannsynligvis er avhengig av evnen til å replikere i vertedyret gjennom mange infeksjonssykluser for effektivitet, vil nytten bli meget forringet i et individ med immunitet overfor det viruset. En andre depotering for samme virus, enten for å gi en booster-immunisering overfor samme proteinet, eller en ny respons overfor et annet protein, er sannsynligvis ikke effektivt. Ved anvendelse av en virusvektor med en delesjon i et essensielt gen, hvor multi-syklus-replikasjon ikke er ønskelig eller nødvendig, vil hendelsene som fører til effektiv immunisering oppstå meget kort etter immuniseringen. Dosen til det mutante viruset kan være relativt stort (siden det skal være fullstendig trygt) og det er derfor usannsynlig at disse tidlige hendelsene vil bli blokkert av vertens immunrespons som vil kreve en viss tid for å bli fullstendig mobilisert.

Til tross for at det ovenfor er referert til et mutant virus som er defekt i et essensielt gen, og eventuelt som inneholder et gen for et immunogent patogen protein, bør mutantene være defekt i mer enn et essensielt gen og/eller inneholde mer enn et immunogent, patogen protein. Mutantviruset kan derfor innbefatte genet for HIV gp 120, for å virke som en vaksine på en måte som foreslått ovenfor, og også genet for HIV gag proteinet

skal bli uttrykt i den vaksinerte verten og presentert på overflaten til vertscellen sammen med MHC-I for å stimulere en T-cellerespons i verten.

For at oppfinnelsen skal bli lettere å forstå, vil den nå bli beskrevet med eksempler som ikke skal medføre begrensninger, og med referanse til følgende figurer hvor:

- Fig. 1 illustrerer produksjon av plasmid pGH1;
- Fig. 2 illustrerer produksjon av plasmid pGH2;
- Fig. 3a viser paret av komplementære oligonukleotider som blir anvendt for å danne plasmidet pSP64Ta;
- Fig. 3b illustrerer produksjon av plasmid pSP64TA;
- Fig. 4a viser de to oligonukleotidene anvendt for å danne plasmid pCMVIEP;
- Fig. 4b illustrerer plasmid pCMVIEP;
- Fig. 5 illustrerer plasmid pCMVlacZ; og
- Fig. 6 illustrerer plasmid pGH3.
- Fig. 7 illustrerer strategien for konstruksjon av plasmid pGH-120.

Herpes Simplex virus deletert i glycoprotein H (gH-HSV)

- Herpes simplex virus (HSV) er et stort DNA virus som forårsaker mange forskjellige patogene symptomer i mennesker, inkludert tilbakevendende sår i ansikt og genitalier, og en sjelden, men ofte fatal encephalitt. Infeksjon med dette viruset kan i en viss grad kontrolleres ved kjemoterapi ved anvendelse av medikamentet Acyclovir, men det er for tiden ikke tilgjengelig noen vaksine for å forhindre primærinfeksjonen. En vanskelighet med vaksinering overfor HSV er at viruset generelt blir spredd innenfor kroppen ved direkte overføring fra celle til celle. Humoral immunitet er derfor sannsynligvis ikke effektiv, på grunn av at sirkulerende antistoff bare kan nøytralisere det ekstracellulære viruset. Av større viktighet for kontroll av virusinfeksjon er den cellulære immuniteten, slik at en vaksine som kan danne både humoral og cellulær immunitet, men som også er trygg, vil være en betraktelig fordel.

- Et egnet målgen for inaktivering innenfor HSV genomet er glycoprotein H genet (gH). gH proteinet er et glycoprotein som er til stede på overflaten av virus envelopen. Dette proteinet antas å være involvert i prosessen med membranfusjon i løpet av innførsel av viruset inn i den infiserte cellen. Dette skyldes at temperatursensitive virusmutanter med en lesjon i dette genet ikke blir utskilt fra virusinfiserte celler ved den ikke-permissive temperaturen (Desai et al., J. Gen. Virol. 69, 1147-1156, 1988). Proteinet blir uttrykt

sent i infeksjonen og derfor kan det ved fravær derav fortsatt oppstå en betraktelig mengde av virusproteinsyntese.

- Alle prosedyrer for genetisk manipulasjon blir utført ifølge standardmetodene beskrevet i "Molecular Cloning", A Laboratory manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

A. Dannelse av en cellelinje som uttrykker HSV gH genet

- gH genet er tilstede i Unique Long region (U_L) til HSV type 1 genomet, mellom nukleotidene 46382 og 43868 (McGeoch et al, J. Gen. Virol. 69, 1531-1574, 1988). En klonet kopi av dette genet er tilgjengelig innenfor plasmidet pAF2. Dette plasmidet ble produsert ved utspaltnig av et BgIII-XhoI fragment, omfattende den fullstendige gH kodende sekvensen, fra plasmid pTZgH, og kloning av dette inn i BgIII setet til plasmid pSP64T som beskrevet (Gompels og Minson, J. Virol., 63, 4744-4755, 1989). Et HindIII fragment inneholdende promotersekvensen til glycoprotein D (gD) genet (utgående fra nukleotidene -392 til +11, med hensyn til begynnelsen av gD genet) blir deretter spaltet fra plasmid pSVD4 (Everett, Nucl. Acids Res., 11, 6647-6667, 1983), og klonet inn i det unike HindIII setet til pAF2 for å danne pGH1 (figur 1) slik at promotersekvensen er i riktig orientering for å drive ekspresjonen av gH genet. Dette plasmidet inneholder derfor den fullstendige gH kodende sekvensen under kontroll av HSV type 1 gD gen promoteren. Dette plasmidet blir deretter rensset og deretter ko-transfektet inn i Vero celler med et plasmid pNEO (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) ved anvendelse av standard kalsium fosfat ko-presipiteringsteknikken (Graham og Van der Eb, Virology 52, 456-467, 1973). Vero celler som har ervervet resistens overfor neomycin blir deretter selektert ved å føre cellene i medikament G418, og koloni av disse cellene blir klonet ved begrensende fortykning. Disse neomycinresistente cellene blir deretter amplifisert i vevskultur, og prøver blir deretter infisert med HSC type 2 virus. Infeksjon med HSV type 2 virus har virkningen av å indusere transkripsjon fra typw 1 gD promoteren til stede i det komplementerende cellegenomet, og derfor stimulering av produksjonen av type 1 gH proteinet i den komplementerende cellen. Lysater av de infiserte cellene blir deretter screenet for ekspresjon av gH proteinet ved Western blotting ved anvendelse av et polyklonalt antiaerum kjent for å gjenkjenne spesifikk type 1 gH proteinet (Desai et al., 1988 op cit.). Celler som uttrykker det nødvendige proteinet blir deretter beholdt, og frosne stammer blir dannet. Dette materialet representerer den gH+ komplementerende cellelinjen.

B. Produksjon av HS type 1 virus med et avbrutt gH gen

Et 6432 basepar BgIII fragment inneholdende den sekvensen til gH sammen med HSV flankerende sekvenser blir spaltet fra plasmid pUG102 (Gompels og Minson, Virology
 5 153, 230-247, 1986) og klonet inn i plasmid pAT153 (Twigg og Sherrat, Nature, 283,216, 1980) for å danne pGH2 (figur 2). Dette plasmidet blir spaltet med PvuII som bare spalter innenfor den gH kodende sekvensen ved to posisjoner (nukleotidene 44955 og 46065 ifølge nummereringsskjema til McGeoch et al, 1988, op cit.), og det største av de to fragmentene blir renset. Et DNA fragment bestående av det fullstendige Bgalactosidase genet fra E. coli nedstrøms for Immediate Early genpromoteren fra cytomegalovirus (CMV) blir deretter dannet ved følgende prosedyre. Først blir et par av komplementære oligonukleotider (vist i figur 3a) sammensmeltet og ligert med BgIII-spaltet, fosfatasebehandlet pSP64T (Krieg og melton, Nucl. Acids. Res. 12, 7057-7071, 1984) for å danne plasmid pSP64Ta som vist i figur 3b. Den tilsatte linkerenn innbefatter også
 10 initieringskodonet og de første tre kodonene til B-galactosidase genet (lacZ) til E. coli. Deretter blir "kjerneregionen" til Immediate Early gen promoteren til CMV amplifisert fra plasmid pUG-H1 (Gompels og Minson, 1989, op cit.) ved polymerasekjedereaksjonsteknikken (PCR-Molecular Cloning, ed. Sambrook et al., op cit.) ved anvendelse av de to oligonukleotidene vist i figur 4a, som tilsvarer sekvensene fra -302 til -288, og
 20 fra -13 til -36 (nummerert i relasjon til begynnelsen av CMV Immediate Early genet som beskrevet av Akrigg et al., Virus Research, 2, 107-121, 1985). Disse oligonukleotidene inneholder også ved deres 5'-ender seter for restriksjonsenzymet HindIII og når det gjelder oligonukleotidet som blir sammensmeltet oppstrøms for promotere et ytterligere SmaI sete. Det PCR-amplifiserte produkt DNA blir deretter spaltet med HindIII og klonet inn i HindIII-spaltet pSP64Ta, for å danne plasmid pCMVIEP (figur 4b). Til slutt
 25 blir et DNA fragment inneholdende en fullstendig kopi av E. coli β -galactosidase genet som bare mangler ekstrem 5'-ende av den kodende sekvensen, isolert ved spaltning av plasmid pSC8 (Chakrabarti et al., Mol. Cell. Biol., 5, 3403-3409, 1985) med BamHI, og klonet inn i det unike BgIII setet til pCMVIEP for å danne pCMVIacZ (figur 5). Et
 30 DNA-fragment inneholdende B-galactosidase genet under kontroll av CMV IE promoteren blir deretter isolert ved spaltning av pCMVIacZ med SmaI, og ligert med det rensete PvuII fragmentet til pGH2 beskrevet ovenfor, for å danne pGH3 som består av en kopi av gH genet avbrutt av et funksjonelt B-galactosidase gen (figur 6). Det neste trinnet er å erstatte villtype gH genet i HSV genomet med den avbrutte versjonen, og dette
 35 blir utført ved å muliggjøre rekombinasjon mellom HSV DNA og plasmid pGH3, etterfulgt av seleksjon av de virusene som har ervervet et funksjonelt β -galactosidase gen. Plasmid pGH3 DNA blir derfor kotransfektet inn i celler som uttrykker gH genet (den

gH+ komplementerende cellelinjen beskrevet i seksjon A) sammen med rensed HSV DNA isolert fra rensede HSV virus (Killington og Powell, i "Techniques in Virology: A practical Approach" (ed. B.W.J. Mahy) s 207-236, IRL Press, Oxford (1985)) ved standard kalsium fosfatpresipiteringsteknikken (Graham og Van der Eb, 1973, op cit.).

- 5 Avkom av HSV virus produsert fra dette transfeksjonseksperimentet blir deretter sådd ut på monolag av gH+ komplementerende celler ved standard plaque analyse, ved anvendelse av et agarlag, i nærvær av 5-brom-klor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-gal), et kromogent substrat som blir omdannet til en blå forbindelse av enzymet β -galactosidase. Plaque som resulterer fra infeksjon med virusgenomer inneholdende og som ut-
- 10 trykker B-galactosidasegenet vil fremkomme med blå farge. Disse virusgenomene bør derfor være en avbrutt versjon av gH genet. Virus blir isolert fra disse plaquene ved å plukke agarpluggen fra hensiktsmessige deler av skålen, og virusstammer preparert ved vekst av virus i gH+ komplementerende cellelinje. Disse virus bør på grunn av at de bærer ikke-funksjonelle versjoner av gH genet kunne danne plaque på celler som ikke
- 15 inneholder og uttrykker en endogen funksjonell kopi av gH genet. Og for å bekrefte dette blir en prøve av viruset analysert for dets evne til å danne plaque på villtype Vero celle monolagene sammenlignet med gH-komplementerende celler. Deretter blir virus DNA preparert fra disse stammene og den ventede DNA strukturen rundt gH genet blir undersøkt ved Southern blotting. Etter bekreftelse på riktig genetisk struktur blir en stor
- 20 stamopløsning av gH gen-manglende virus deretter preparert ved inokulering av en prøve av viruset inn i en stor-strek skala kultur av den gH+ komplementerende cellelinjen (multiplisitet til infeksjon er lik 0,01), og 3 dager senere blir de infiserte cellene høstet. De infiserte cellene blir ødelagt ved sonikering for å frigjøre celle-assosiert virus og den totalt sonikerte blandingen blir lagret ved -70° som hovedvirusstamopløsning-
- 25 gen. Titere til virus-stammen blir deretter bestemt ved plaqueanalyse av den gH+ komplementerende cellelinjen. Prøver av denne virusstokken blir deretter anvendt for å preparere arbeidsstamopløsninger som før, og disse arbeidsstamopløsningene blir deretter anvendt for å infisere laboratoriedyrene som beskrevet nedenfor.

30 C. Studier av den beskyttende effekten til gH- HSV sammenlignet med varmedrept virus

For å vurdere vertens immunologiske respons overfor dette viruset ble utsettingseksperimenter utført i mus ifølge den eksperimentelle planen beskrevet nedenfor.

35

Den beskyttende virkningen av et levende gH⁻ viruspreparat ble sammenlignet med et inaktivert preparat av villtype (WT) virus (stamme SC16) som følger.

Preparering av inaktiv villtypevirus for vaksinerer.

HSV type 1 (stamme SC16) ble dyrket ved lav infeksjonsmultiplisitet (0,01 pfu/celle) av Vero cellene. Etter tre dager ble viruset høstet og cytoplasmavirus isolert ved Dounce homogenisering. Kjernen ble fjernet ved sentrifugering ved 500xg i 15 minutter og virus ble isolert fra supernatanten ved sentrifugering på en 40% sukkrose pose ved 12K i 60 minutter Beckman Sw27 rotor. Virusene i båndene ble fortynnet, pelletert og rensset ved sukkrose gradient sentrifugering (Killington og Powell, 1985, op. cit.). Virusbåndet ble høstet fra gradienten og viruset isolert ved sentrifugering. Virus ble resuspendert i fosfatbuffret saltvann (PBS), analysert for infektivitet ved plaque titrering på baby hamsternyre (BHK) celler og partikkeltallet bestemt ved elektronmikroskopi. Partikkel: infektivitetsforholdet til preparatet var 110 partikler/pfu. Viruset ble fortynnet til $2,5 \times 10^{10}$ pfu/ml i PBS og inaktivert ved behandling med β -propiolacton i 60 min. ved 20°C. Alikvotene ble deretter lagret ved -70°C.

Preparering av levende gH⁻ virus for vaksinerer

Dette materialet ble preparert som beskrevet for villtypevirus, med unntagelse av at viruset ble dyrket i den gH⁺ komplementerende cellelinjen inneholdende og som uttrykker HSV type 1 gH genet. Det ble ikke inaktivert av behandling med β -propiolactone. Partikkel: infektivitetsforholdet til dette preparatet var 150:1. Konsentrasjonen av dette preparatet ble justert til $2,5 \times 10^{10}$ pfu/ml, og alikvoter ble lagret i PBS ved -70°C.

Vaksineringsprotokoll

4 uker gamle hunn balb/C mus (forhandlet fra Tukk U.K. Ltd) ble vaksinert med forskjellige doser av inaktivert WT virus eller levende gH⁻ virus i 2 μ l volum fosfatbuffret saltvann ved dråpeapplikasjon og opprissing med nål i høyre øre som følger:

30

Gruppe A	Kontroll - ingen virus
Gruppe B	5×10^4 pfu virusvaksine
Gruppe C	5×10^5 pfu virusvaksine
Gruppe D	5×10^6 pfu virusvaksine
Gruppe E	5×10^7 pfu virusvaksine

35

Etter 14 dager ble alle musene utsatt for lignende inokulasjon av det venstre øre med 2×10^6 pfu HSV-1 stamme SC16 (villtype virus). Musene ble drept etter 5 dager og analysert for virusinfektivitet i det venstre øret og venstre cervical ganglia cII, cIII og cIV (kombinert). For latensstudier ble andre vaksinerte og utsatte dyr drept etter 1 måned og testet for latent infeksjon ved utdissekering av cII, cIII og cIV ganglia. Disse ble inkubert i medium i 5 dager og deretter homogenisert og analysert for tilstedeværelse av infeksjons virus ved standard plaque-analyse. Alle følgende resultater er uttrykt som pfu/organ.

Tabell 1 - Titerer til tilføringsviruset til stede i løpet av den akutte fasen av infeksjonen etter vaksinerings med levende gH-virus

		Virustiter - log ₁₀ pfu (WT SC16)			
	Mus nr.	Ører	gj.snitt	cervical ganglia*	gj. snitt
5					
	1	4,2		3,3	
	Gruppe A	2	4,2	4,3	3,4
		3	4,6	3,4	
		4	4,3	3,4	
10					
	1	3,4		1,5	
	Gruppe B	2	ingen	0,85	1,8
		3	ingen	2,0	
		4	ingen	1,5	
15					
	1	ingen		ingen	
	Gruppe C	2	ingen	-	-
		3	ingen	ingen	
		4	ingen	ingen	
20					
	1	ingen		ingen	
	Gruppe D	2	ingen	-	-
		3	ingen	ingen	
		4	ingen	ingen	
25					
	1	ingen		ingen	
	Gruppe E	2	ingen	-	-
		3	ingen	ingen	
		4	ingen	ingen	
30					

* Sammenslåtte cervical ganglia cII, cIII og cIV

Tabell 2 - Titere til tilføringsviruset til stede i løpet av den akutte infeksjonsfasen etter vaksinerings med inaktivert WT HSV-1 virustiter

Virus titer - log ₁₀ pfu (WT SC16)					
	Mus nr.	Øre	gj.snitt	cervical ganglia*	gj.snitt
5					
	1	5,7		2,6	
	Gruppe A 2	4,4	5,2	2,3	2,3
	3	5,7		2,1	
10					
	1	4,2		1,9	
	Gruppe B 2	3,6	3,8	3,1	1,2
	3	3,5		ingen	
	4	3,8		ingen	
15					
	1	ingen		ingen	
	Gruppe C 2	2,5	2,0	ingen	-
	3	2,9		ingen	
	4	2,7		ingen	
20					
	1	3,9		ingen	
	Gruppe D 2	2,0	2,6	ingen	-
	3	2,0		ingen	
	4	2,3		ingen	
25					
	1	ingen		ingen	
	Gruppe E 2	ingen	-	ingen	-
	3	ingen		ingen	
	4	ingen		ingen	
30					

* Sammenslåtte cervical ganglia cII, cIII og cIV

Tabell 3 - Titer til tilførsingsviruset til stede som latent virus i cervical ganglia etter vaksinerings med levende gH-HS-1

		Mus nr.	Virus titere i cervical ganglia* (log ₁₀ pfu WT)	Reaktiverings- frekvens
5	Gruppe A	1	5,4	5/5
		2	4,6	
		3	5,0	
		4	4,8	
		5	5,3	
10	Gruppe B	1	ingen	3/4
		2	1,5	
		3	5,1	
		4	5,3	
20	Gruppe C	1	ingen	1/3
		2	ingen	
		3	3,2	
25	Gruppe D	1	ingen	0/4
		2	ingen	
		3	ingen	
		4	ingen	
30	Gruppe E	1	ingen	0/4
		2	ingen	
		3	ingen	
		4	ingen	

* Sammenslåtte cervical ganglia cII, cIII og cIV

Tabell 4 - Titerer til latent tilførringsvirus i cervical ganglia etter vaksinerings med inaktivert WT HSV-1

		Muse nr.	Virustiter i cervical ganglia* (log ₁₀ pfu WT)	Reaktiverings- frekvens
5	Gruppe A	1	ingen	
		2	5,0	
10		3	5,0	3/4
		4	5,2	
	Gruppe B	1	3,5	
		2	4,0	3/4
15		3	5,5	
		4	ingen	
	Gruppe C	1	3,6	
		2	5,1	2/4
20		3	ingen	
		4	ingen	
	Gruppe D	1	ingen	
		2	4,8	1/4
25		3	ingen	
		4	ingen	
	Gruppe E	1	ingen	
		2	ingen	0,4
30		3	ingen	
		4	ingen	

* Sammenslåtte cervical ganglia cII, cIII og cIV

35 (p.f.u. = plaque dannende enheter; gH- er et virus med et defekt gH gen).

Disse resultatene viser titere til tilførringsviruset wt SC16 til stede i ører og cervical ganglia i løpet av den akutte infeksjonsfasen. Et lavt titer indikerer derfor god effektivitet ved vaksineringsregimet med gH- virus, mens et høyere titer indikerer dårligere effektivitet. Det fremgår fra resultatene at vaksineringsregimet med levende gH- HSV virus er meget mer effektivt enn en ekvivalent mengde av inaktivert WT virus. I den inaktiverede prepareringen var en dose på 5×10^7 pfu nødvendig for å forhindre replikasjon av tilførringsvirus i øret, mens levende gH-virus var 100-1000 ganger mindre virus nødvendig. Levende gH-virus vaksineringsregimet med 5×10^5 pfu og over kunne også blokkere replikasjonen av tilførringsviruset i cervical ganglia i løpet av den akutte infeksjonsfasen, og viste videre en klar beskyttende effekt overfor etablering av latent infeksjon i cervical ganglia.

HSV som mangler gH genet som en vektor for immunisering mot et fremmed antigen: innføring av gp120 genet til SIVmac stammen 142 inn i genomet til gH- HSV virus

Virus med delesjoner i essensielle gener kan, som beskrevet ovenfor, bli anvendt som trygge vektorer for levering av fremmede antigener til immunsystemet, og gH- HSV viruset beskrevet ovenfor gir et godt eksempel på en slik vektor. Dette viruset kan bli anvendt for å uttrykke et hvilket som helst ønsket fremmed antigen, men en spesielt attraktiv mulighet vil være de viktigste antigene proteinene til AIDS virus human immunsviktvirus (HIV). Disse sekvensene kunne derfor bli skutt inn i gH- HSV genomet på en måte som vil forsikre ekspresjon derav i løpet av infeksjon av normale celler (dvs. ikke-komplementerende celler) ved rekombinant virus. Infeksjon av et individ med et slikt virus vil føre til en latent infeksjon som i løpet av reaktiveringstiden vil føre til en eksplosjon av produksjonen av fremmed antigen som resulterer i stimulering av immunresponsen til det proteinet.

På grunn av at studier som undersøker denne tilnærmingemetoden direkte i mennesket ikke for tiden er mulig, som et innledende stadium, kan denne tilnærmingemetoden bli undersøkt i aper ved anvendelse av Simian AIDS virus SIV_{mac} (Simian immunsviktvirus isolert fra macaques). Et egnet SIV gen for denne hensikten er det som koder for gp120 proteinet som er et av de viktigste antigene målne for dette viruset. Dette genet blir derfor introdusert inn i gH- HSV genomet, og effektiviteten som dette viruset har som vaksine for å beskytte aper mot utsetting for SIV blir vurdert.

SIV gp120 genet blir fortrinnsvis klonet ved siden av cytomegalovirus IE kjernepromoteren (Gompels og Minson, 1989, op. cit.), og deretter blir en DNA kassett bestående av

- gp120 genet og oppstrøm CMV promoteren klonet inn i plasmid pGH2 (figur 2). Det resulterende plasmidet blir deretter ko-transfektet inn i den gH+ komplementerende cellelinjen sammen med DNA rensset fra gH- HSV og rekombinant virus som har ervervet gp120 genet i stedet for β -galactosidase genet til stede i gH- HSV viruset blir isolert ved screening for avbud av β -galactosidase genet.

A. Kontruksjon av plasmid for rekombinasjon av SIV gp120 kodende sekvensen inn i HSV genomet

- Oppsettet for denne prosedyren er vist i figur 7. Et SacI restriksjonsenzymfragment (tilsvarende til basene 5240-8721) blir spaltet ut fra en klonet DNA kopi av SIV genomet (Chakrabarti et al., Nature 328, 543 (1987), og klonet inn i SacI setet til plasmid pUC118 (Viera og Messing, Methods in Enzymology, 153, 3, 1987) for å danne plasmid pSIV1 som kan bli omdannet til enkelttrådet DNA for manipulering ved seterettet mutagenese. Denne DNA regionen som innbefatter SIV env genet (som ligger mellom 6090-8298) blir deretter endret ved seterettet mutagenese (Brierley et al., Cell 57, 537, 1989) for å innføre et restriksjonsenzymsete for enzymet EcoRV ved posisjonene 6053-6058 ved anvendelse av det syntetiske oligonukleotidet

- 5'GAAGAAGGCTATAGCTAATACAT. Et annet EcoRV sete blir

deretter innført i posisjon 7671-7676 innenfor SIV env genet tilsvarende spaltningssete mellom gp120 og gp40 domenene til env gen sekvensen ved anvendelse av det syntetiske oligonukleotidet

- 5'CAAGAAATAAACTATAGGTCTTTGTGC

for å danne plasmid pSIV2. Et DNA fragment (1617 basepar) tilsvarende gp120 delen av SIV env genet ble deretter preparert ved spaltning av SIV2 med EcoRV.

- Kjerneregionen til CMV øyeblikkelig tidlig gen promoteren blir oppnådd fra plasmid pUG-H1 (Gompels og Minson, 1989, op cit.) ved PCR teknikken ved anvendelse av følgende to syntetiske oligonukleotider.

Oppstrømsprimer

5' ATC GAATTC CTATAG CCTGGCATTATGCCCAGTACATG

5 EcoRI EcoRV

Nedstrømsprimer

5' TCAAAGCTT CTATAG CCCGGGGAGCTCTGATTATATAGACCTCCC

10 HindIII EcoRV SmaI

Produksjon av denne reaksjonen ble deretter spaltet med enzymene EcoRI og HindIII for å danne et DNA fragment som deretter blir klonet inn i EcoRI- og HindIII-spaltet plasmid pUC118 for å danne plasmid pCMVIE2 som har et unikt SmaI sete beliggende like nedstrøms for CMV promotersekvensen. EcoRV fragmentet inneholdende SIV_{mac} gp120 kodende sekvens preparert som beskrevet ovenfor blir deretter klonet inn i dette SmaI setet, og plasmid pSIV3, med SIV kodende region orientert riktig for å muliggjøre ekspresjon av den kodende sekvensen fra promoteren, blir deretter selektert. Dette plasmidet blir deretter spaltet med EcoRV for å tilveiebringe et butt-endet DNA fragment bestående av SIV sekvensen sammen med SMV promoteren som deretter blir klonet inn i PvuII-spaltet pGH2 (figur 2) for å danne pGH-120-

B. Konstruksjon av SIV gp120 inneholdende rekombinant gH- HS

25 DNA blir renset fra gH- HSV virus konstruert som beskrevet ovenfor og ko-transfektet inn i gH+ komplementerende celler sammen med renset pGH-120 DNA. Virusavkom isolert fra denne transfeksjonsprosedyren blir deretter platet på monolag av den gH+ komplementerende cellelinjen ved standard plaque analyse som før ved anvendelse av et agar overlag i nærvær av X-gal. Parental gH-virus bærer et funksjonelt β -galactosidase gen beliggende innenfor residual gH kodende sekvenser og i nærvær av X-gal vill de danne blå plaque. Rekombinante virus som har ervervet SIV gp120 kodende sekvensen i stedet for β -galactosidase genet vil produsere hvite plaque. Virus blir isolert fra disse hvite plaquene ved å plukke agar plugger, og virusstokker blir preparert gjennom veksten av virus i den gH+ komplementerende cellelinjen. Virus DNA blir preparert fra disse stamopløsningene og undersøkt for tilstedeværelse av riktig DNA struktur rundt gH genet ved Southern blotting ved anvendelse av hensiktsmessige prober avledet fra

den SIV kodende sekvensen. Til slutt blir stamopløsninger av viruset preparert som før for vaksineringsstudiene i dyrene.

- 5 En vaksine omfattende det attenuerte viruset kan bli preparert og anvendt ifølge standardteknikker som er kjente i dette fagområdet. For eksempel kan vaksinen også omfatte en eller flere eksipienter og/eller adjuvants. Den effektive dosen til det attenuerte viruset som blir gitt ved vaksinen kan bli bestemt ifølge teknikker som er velkjente innenfor dette fagområdet.

P a t e n t k r a v

1.

5 Femgangsmåte for fremstilling av et mutant herpesvirus med defekt i ett spesifikt gen som er essensielt for produksjon av infeksjose viruspartikler, slik at viruset er i stand til å infisere normale vertsceller, replikere og uttrykke virale gener i nevnte celler, men ikke er i stand til å produsere nye infeksjose partikler i nevnte celler, k a r - a k t e r i s e r t v e d at nevnte virus produseres i en komplimenterende vertscelle som har blitt fremstilt for å bære og uttrykke en heterolog nukleotidsekvens som tilveiebringer funksjonen av det defekte genet i nevnte virus, slik at infeksjose viruspartikler kan gjenvinnes fra en kultur av nevnte komplimenterende vertscelle infisert med nevnte virus.

2.

15 Fremgangsmåte for fremstilling av et vaksinepreparat bestående av mutant herpesvirus, k a r a k t e r i s e r t v e d at mutant herpesvirus, fremstilt som angitt i krav 1, kombineres med en farmasøytisk akseptabel bærer, slik at det tilveiebringes en farmasøytisk blanding inneholdende opptil 5×10^7 infeksjose enheter av nevnte herpesvirus per ml. Bærer.

20

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor det farmasøytiske preparatet omfatter et mutant herpesviruspreparat i en dose som inneholder opptil 5×10^6 pfu av viruset, k a r a k t e r i s e r t v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

25

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor det farmasøytiske preparatet omfatter et mutant herpesviruspreparat i en dose som inneholder opptil 5×10^5 pfu av viruset, k a r a k t e r i s e r t v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

30

5.

Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvor det farmasøytiske preparatet omfatter et mutant herpesviruspreparat i en dose som inneholder opptil 5×10^4 pfu av viruset, k a r a k t e r i s e r t v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

35

6.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor viruset er en mutant av herpes simplex-viruset (HSV), k a r a k t e r i s e r t v e d at et
5 tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

7.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor defekten er i et gen som er operativt sent i den virale syklusen, k a r a k t e r i s e r t
10 v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

8.

Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor defekten er i et gen som er involvert i pakking, k a r a k t e r i s e r t v e d at et
15 tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

9.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor defekten er i et gen involvert i en post-replikativ hendelse, k a r a k t e r i s e r t
20 v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

10.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor defekten er i et gen som ikke kreves for virusmontering (assembly), k a r a k t e r i s e r t
25 v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

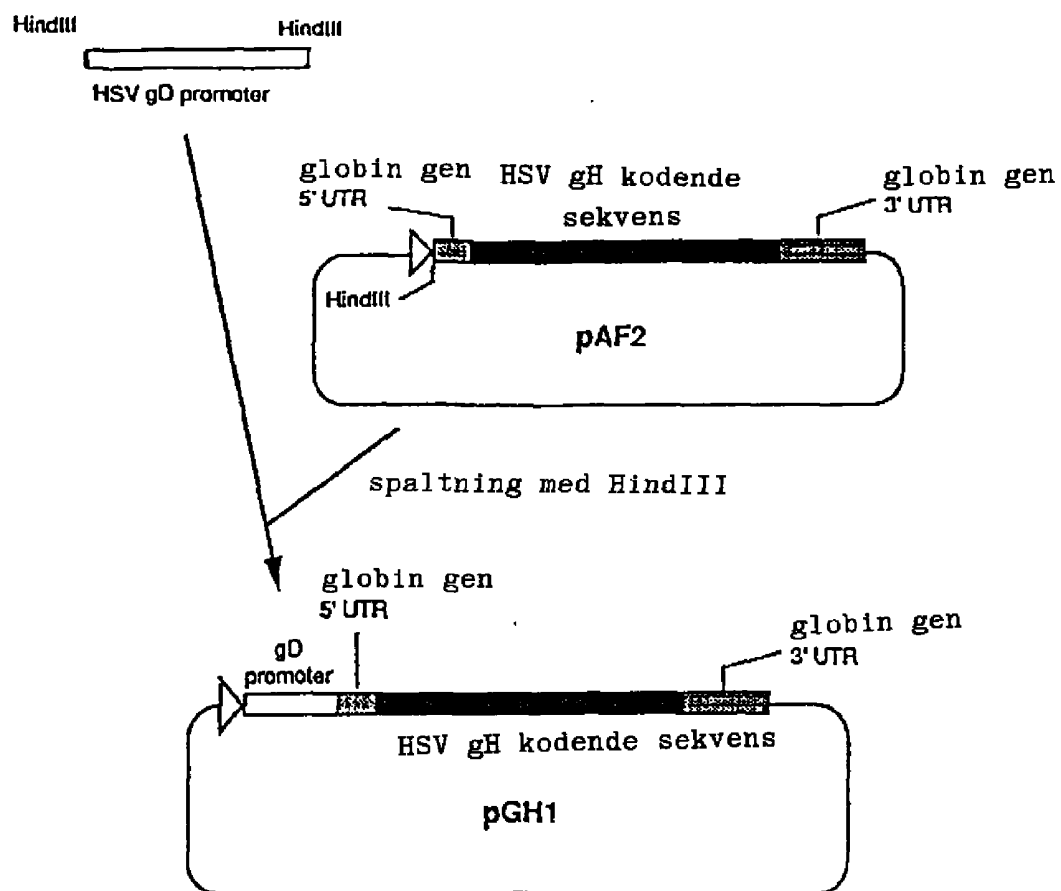
11.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor defekten er i et glykoproteingen, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at et tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.
30

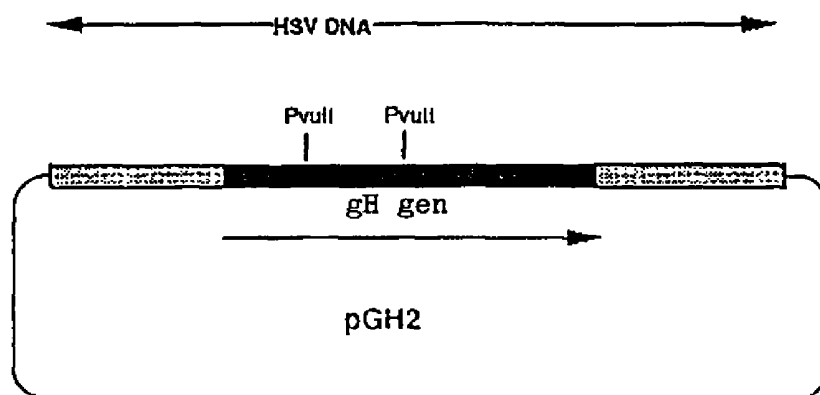
12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor defekten i virusgenomet er i glykoproteinet gH-genet, k a r a k t e r i s e r t v e d at et tilsvarende ekspresjons-
system anvendes.
35

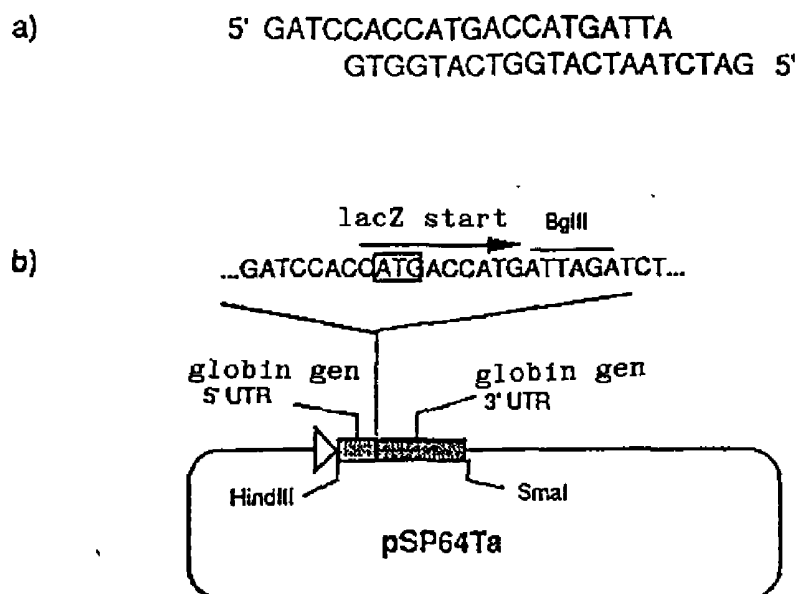
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

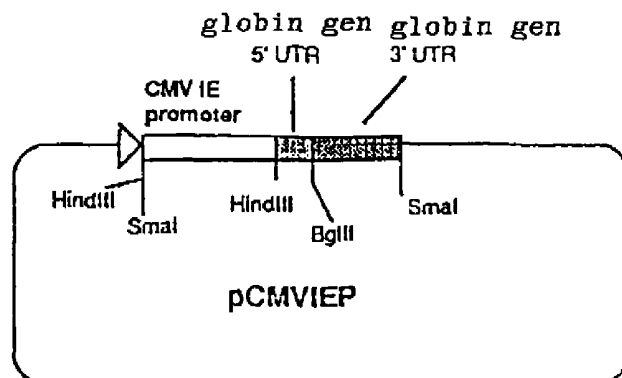
a) Primer oppstrøms

HindIII SmaI CMV sekvens
5' ATCAAGCTTCCCGGGCCTGGCATTATGCCAGTACATG

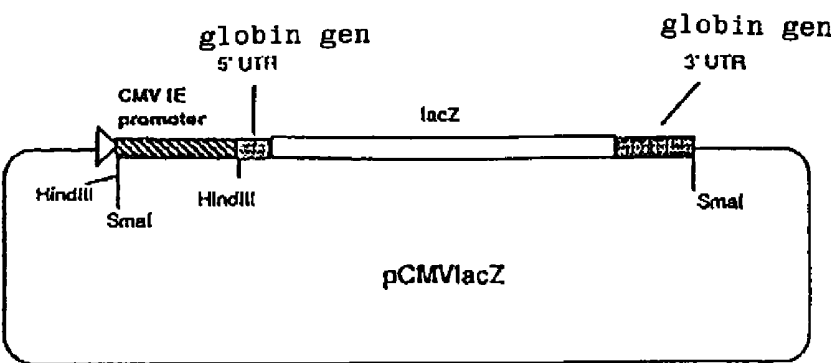
Primer nedstrøms

HindIII CMV sekvens
5' TCAAAGCTTGAGCTCTGATTATATAGACCTCCC

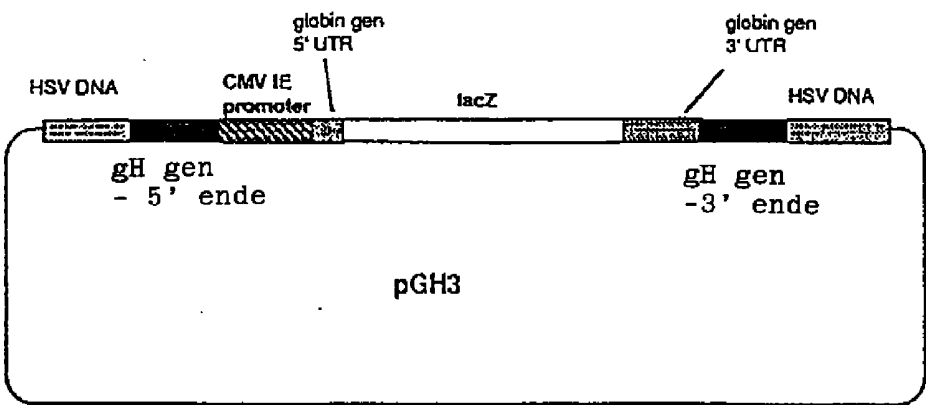
b)



FIGUR 5



FIGUR 6



FIGUR 7

