

(19) **DANMARK**

(11)

DK 176165 B1



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.®: **C 12 N 15/863 (2006.01)** **A 61 K 39/275 (2006.01)** **A 61 K 39/285 (2006.01)**
 C 12 N 15/86 (2006.01)

(21) Patentansøgning nr: **PA 2005 01622**

(22) Indleveringsdag: **2005-11-21**

(24) Løbedag: **1988-08-24**

(41) Alm. tilgængelig: **2005-11-21**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2006-11-06**

(30) Prioritet: **1987-08-28 US 090.711 1987-10-20 US 110.335 1988-04-25 US 186.054 1988-08-23 US 234.390**

(73) Patenthaver: **Health Research Inc., Empire State Plaza Tower, Albany, NY 12237, USA**

(72) Opfinder: **Enzo Paoletti, 31 Putland Street, Albany, NY 12209, USA**

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Rekombinant fjerkræpoxvirus samt anvendelsen af samme**

(57) Sammendrag:

Opfindelsen angår et rekombinant fjerkræpoxvirus, som indeholder DNA fra en ikke-avipox-kilde og som koder for et antigen af et vertebratpatogen og er ligeret til en promotor for ekspression af DNA'et, hvor det nævnte DNA og promotor er indsat i et ikke-essentielt område af fjerkræpoxgenomet. Endvidere angår opfindelsen anvendelsen af dette virus ved fremstilling af et lægemiddel for behandling af sygdomme i vertebrater.

Den foreliggende opfindelse er fremkommet ved afdeling fra PA 2005 01220.

Den foreliggende opfindelse omhandler inducering af et immunologisk respons i vertebrater, herunder ikke-fugle vertebrater, under anvendelse af syntetisk rekombinant avipoxvirus. Opfindelsen omhandler inducering af et immunologisk respons i en vertebrat, især et pattedyr, mod et vertebratpatogen ved inokulering af vertebraten med et syntetisk rekombinant avipoxvirus indeholdende DNA, der koder for og udtrykker de antigene determinanter af nævnte patogen, og vacciner indeholdende et sådant modificeret avipoxvirus. Opfindelsen angår rekombinant fjerkræavipoxvirus og anvendelse af et sådant virus.

OPFINDELSENS BAGGRUND

Avipox eller avipoxvirus er en slægt af nært forbundne poxvira, der inficerer fugle. Slægten avipox omfatter arterne fjerkræpox, kanariepox, snefuglepox, duepox, vagtelpox, spurvepox, stærepox og kalkunpox. Slægten avipox deler mange karakteristika med andre poxvira og er et medlem af den samme underfamilie, poxvira hos vertebrater, som vaccinia er. Poxvira, inklusive vaccinia og avipox, replikerer i eukaryote værtsceller. Disse vira skelnes ved deres store størrelse, kompleksitet og ved det cytoplasmiske replikationssted. Vaccinia og avipox er dog forskellige slægter og er ikke ens, hvad angår deres respektive molekylvægte, antigene determinanter og værtsarter, som rapporteret i Intervirology, vol. 17, side 42-44, Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (1982).

Avipoxviraene inficerer ikke på produktiv vis ikke-fugle vertebrater såsom pattedyr, herunder mennesker. Endvidere formerer avipox sig ikke ved inokulering i cellekulturer fra pattedyr (inklusive mennesker). I sådanne pattedyr-cellekulturer inokuleret med avipox dør cellerne på grund af en cytotoxisk virkning, men viser ingen tegn på produktiv virusinfektion.

Inokulering af en ikke-fugle vertebrat, såsom et pattedyr, med levende avipox resulterer i dannelsen af en læsion på inokuleringsstedet, der ligner en vaccinia-inokulering. Der opnås dog ingen produktiv virusinfektion. Ikke desto mindre har man nu fundet, at et således inokuleret pattedyr responderer immunologisk på avipoxviruset. Dette er et uventet resultat.

Vacciner bestående af dræbt patogen eller oprensede antigene komponenter af sådanne patogener skal injiceres i større mængder end levende virusvacciner for at skabe et effektivt immunrespons. Dette skyldes, at inokulering med levende virus er en meget mere effektiv vaccinationsmetode. Et relativt lille inokulum kan frembringe et effektivt immunrespons, fordi de antigener, man er interesseret i, forstærkes under replikation af viruset. Fra et lægeligt synspunkt giver levende virusvacciner en immunitet, der er mere effektiv og længerevarende end inokulering med en vaccine med et dræbt patogen eller oprenset antigen. Således kræver vacciner bestående af dræbt patogen eller oprensede antigene komponenter af sådanne patogener produktion af større mængder vaccinemateriale, end det er nødvendigt med levende virus.

Fra den foregående diskussion er det klart, at der er lægelige og økonomiske fordele ved at anvende levende virusvacciner. En sådan levende virusvaccine omfatter vaccinia-virus. Dette virus er fra litteraturen kendt som et nyttig virus, hvori der ved hjælp af rekombinant DNA-metoder kan indsættes DNA repræsenterende de genetiske sekvenser for antigener fra pattedyr-pato-gener.

I litteraturen er der således udviklet metoder, der tillader dannelsen af rekombinant vaccinia-vira ved indsættelse af DNA fra en vilkårlig kilde (f.eks. viral, prokaryotisk, eukaryotisk, syntetisk) i en ikke-essentiell region af vaccinia-genomet, herunder DNA-sekvenser der koder for de antigene determinanter i en patogen organisme. Visse rekombinant vaccinia-vira

dannet ved disse metoder er blevet brugt til inducering af specifik immunitet i pattedyr mod forskellige pattedyr-patogener, alle som beskrevet i US patent nr. 4 603 112, der er inkorporeret i denne beskrivelse med krav ved henvisning.

5

Umodificeret vaccinia-virus har længe været kendt for at være relativt sikkert og effektivt til anvendelse ved inokulering mod småkopper. Dog var der før udryddelsen af småkopper, hvor det var almindeligt at indgive umodificeret vaccinia, en lille, men reel risiko for komplikationer i form af generaliseret vacciniainfektion, specielt hos de, der lider af eksem eller immunsuppression. En anden sjælden, men mulig komplikation, der kan resultere fra vaccinia-inokulering, er encephalitis postvaccinalis. De fleste af disse reaktioner var resultat af inokulering af individer med hudsygdomme, såsom eksem, eller med svækkede immunsystemer, eller individer i husstande, hvor andre havde eksem eller svækket immunologisk respons. Vaccinia er et levende virus og er normalt uskadelig for et sundt individ. Det kan dog overføres mellem individer i adskillige uger efter inokulering. Hvis et individ med en svækkelse af det normale immunrespons inficeres, enten ved inokulering eller ved smitsom overførelse fra et nylig inokuleret individ, kan det få alvorlige konsekvenser.

20

Det vil således forstås, at en fremgangsmåde, der tilfører faget fordelene ved inokulering med levende virus, men som nedsætter eller eliminerer de ovenfor beskrevne problemer, ville være et særdeles ønskeligt fremskridt i forhold til det nuværende teknologiske stade. Dette er endog vigtigere i dag med fremkomsten af sygdommen kendt som erhvervet immunforsvarssyndrom (AIDS). Ofte for denne sygdom lider af alvorlig immunologisk dysfunktion og kunne let skades af et ellers sikkert levende viruspræparat, hvis de kom i kontakt med en sådan virus, enten direkte eller gennem kontakt med en person, der nyligt er immuniseret med en vaccine indeholdende en sådan levende virus.

30

OPFINDELSENS FORMÅL

Det er et formål med opfindelsen at tilvejebringe rekombinant fjerkræpoxvirus, der kan anvendes i en vaccine, der kan immunisere
5 vertebrater mod en patogen organisme, som har en levende vaccines fordele, og som har få eller ingen af ulemperne ved enten en levende virus-vaccine eller en dræbt virusvaccine som opregnet ovenfor, især når anvendt til immunisering af ikke-fugle vertebrater.

10 Det er endvidere et formål med opfindelsen at angive en anvendelse af et sådant virus ved fremstilling af et lægemiddel for behandling af sygdomme i vertebraten.

15 BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN

Et aspekt af opfindelsen angår syntetisk rekombinant fjerkræavipoxvirus modificeret ved indsættelse af DNA fra en vilkårlig kilde, og især fra en ikke-fugle kilde, i et ikke-essentielt område af avipox-genomet. Syntetisk
20 modificeret avipoxvirusrekombinanter, der bærer exogene (dvs. ikke-avipox) gener, som koder for og udtrykker et antigen, hvilke rekombinanter i en vertebratvært udløser dannelsen af immunologiske responser på antigenet og derfor på det exogene patogen, bruges ifølge opfindelsen til at danne hidtil ukendte vacciner, der ikke har ulemperne ved konventionelle vacciner,
25 som anvender dræbte eller svækkede levende organismer, især ved anvendelse til inokulering af ikke-fugle vertebrater.

Det skal igen fremhæves, at avipoxvirus kun kan replikere produktivt i eller blive videreført gennem fuglearter eller cellelinjer fra fugle. De rekombinante
30 avipoxvira høstet fra fugle-værtceller, danner en inokuleringslæsion uden produktiv replikation af avipoxviruset, når de inokuleres i en ikke-fugle

vertebrat, såsom et pattedyr, på en måde, der er analog til inokuleringen af pattedyr med vaccinia-virus. Trods avipoxvirusets manglende evne til at replikere produktivt i en sådan inokuleret ikke-fugle vertebrat, forekommer der tilstrækkelig udtrykkelse af viruset, til at det inokulerede dyr responderer immunologisk på det rekombinante avipoxvirus' antigene determinanter og også på de antigene determinanter indkodet i exogene gener deri.

Når det anvendes til inokulering af fuglearter, frembringer et sådant syntetisk rekombinant avipoxvirus ikke blot et immunologisk respons på antigener kodet af exogent DNA fra en vilkårlig kilde, der kan være tilstede deri, men resulterer også i produktiv replikation af viruset i værten med fremkaldelsen af et forventet immunologisk respons på avipox-vektoren som sådan.

Adskillige forskere har foreslået dannelsen af rekombinant fjerkræpox, specielt vira til brug som veterinære vacciner til beskyttelse af fjerkræbestande. Boyle og Coupar, J. Gen. Virol., 67:1591-1600 (1986) og Binns et al., Isr. J. Vet. Med, 42:124-127 (1986). Hverken forslag eller egentlige rapporter angående brugen af rekombinant avipoxvira som en fremgangsmåde til inducering af specifik immunitet i pattedyr er blevet fremlagt.

Stickl og Mayer, Fortschr. Med. 97(40):1781-1788 (1979) beskriver injektion af avipoxvirus, specifikt fjerkræpox, i mennesker. Disse undersøgelser angår dog kun brugen af almindelig fjerkræpox til at forhøje ikke-specifik immunitet i patienter, der lider af eftervirkningerne af cancer-kemoterapi. Der anvendes ingen rekombinant DNA-teknikker. Der informeres ikke om en avipox, hvori er indsat DNA, som koder for antigener fra vertebrat-patogener, eller om en fremgangsmåde til inducering af specifik immunitet i vertebrater. I stedet regnede man i litteraturen med en generel og ikke-specifik tonisk virkning på den humane vært.

En mere indgående diskussion af grundlaget for genetisk rekombination kan måske hjælpe til at forstå, hvorledes de modificerede rekombinant vira ifølge den foreliggende opfindelse er dannet.

- 5 Generelt består genetisk rekombination af udvekslingen af homologe sektioner af deoxyribonukleinsyre (DNA) mellem to DNA-streng. (I visse vira kan ribonukleinsyre [RNA] erstatte DNA). Homologe nukleinsyresektioner er nukleinsyresektioner (RNA eller DNA), der har den samme nukleotidbasesekvens.

10

- Genetisk rekombination kan forekomme naturligt under replikationen eller ved dannelsen af nye virale genomer inde i den inficerede værtcelle. Således kan genetisk rekombination mellem virale gener ske under den virale replikationscyklus, der foregår i en værtcelle, som er co-inficeret med to eller
15 flere forskellige vira eller andre genetiske konstruktioner. En DNA-sektion fra et første genom bruges udskifteligt til konstruktion af genomsektionen i et andet coinficerende virus, i hvilket DNA'et er homologt med DNA'et i det første virale genom.

- 20 Imidlertid kan rekombination også forekomme mellem DNA-sektioner i forskellige genomer, der ikke er fuldstændig homologe. Hvis en sådan sektion er fra et første genom, der er homologt med en sektion af et andet genom, med undtagelse af tilstedeværelsen i den første sektion af for eksempel en genetisk markør eller et gen kodende for en antigen
25 determinant indsat i en del af det homologe DNA, kan rekombination stadig forekomme, og produkterne af denne rekombination er således detekterbare ved tilstedeværelsen af denne genetiske markør eller gen.

- Der kræves to betingelser, for at den modificerede infektiøse virus
30 gennemfører en vellykket udtrykkelse af den indsatte genetiske DNA-sekvens.

- For det første skal indsættelsen ske i et ikke-essentielt område af viruset, for at det modificerede virus forbliver levedygtigt. Hverken fjerkræpox eller de andre avipoxvira har indtil nu udvist ikke-essentielle regioner analoge til de, der er beskrevet for vaccinia-viruset. Derfor blev der ved den foreliggende opfindelse fundet ikke-essentielle områder i fjerkræpox ved at kløve fjerkræpox-genomet op i fragmenter med efterfølgende adskillelse af fragmenterne efter størrelse og indsættelse af disse fragmenter i plasmidkonstruktioner med henblik på amplifikation. (Plasmider er små cirkulære DNA-molekyler, der findes som ekstrakromosomale elementer i mange bakterier incl. E. coli. Metoder til indsættelse af DNA-sekvenser, såsom generne for antigene determinanter eller andre genetiske markører, i plasmider er velkendte inden for faget og er beskrevet i detaljer i Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory New York [1982]). Dette blev efterfulgt af indsættelse af genetiske markører og/eller gener, der koder for antigener, i de klonede fjerkræpox-fragmenter. De fragmenter, der førte til vellykket rekombination, som vist ved vellykket genvinding af den genetiske markør eller antigener, var de, der indeholdt DNA indsat i et ikke-essentielt område af fjerkræpox-genomet.
- Den anden betingelse for udtrykkelse af indsat DNA er tilstedeværelsen af en promotor med en passende beliggenhed i forhold til det indsatte DNA. Promotoren skal være placeret således, at den befinder sig opstrøms fra den DNA-sekvens, der skal udtrykkes. Fordi avipox-vira ikke er velkarakteriserede, og der ikke tidligere er identificeret avipox-promotorer, kan promotorer fra andre poxvira med fordel indsættes opstrøms for det DNA, der skal udtrykkes som en del af den foreliggende opfindelse. Fjerkræpox-promotorer kan også med held anvendes til at udføre fremgangsmåderne og lave produkterne ifølge opfindelsen. Ifølge opfindelsen er promotorer fra fjerkræpox, vaccinia og entomopox fundet at promotere transkription i rekombinant poxvirus.

Boyle og Coupar, J. Gen. Virol. 67:1591 (1986) har offentliggjort spekulation om, at vaccinia-promotorer "måske kan forventes at fungere i (fjerkræpox) virus". Forfatterne lokaliserede og klonede et fjerkræpox TK-gen (Boyle et al., Virology 156:355-365 [1987]) og indsatte det i et vaccinia-virus. Dette TK-gen
5 blev udtrykt, formodentlig fordi fjerkræpox TK-promotorsekvensen genkendes af vaccinia-polymerasefunktioner. På trods af deres spekulation, indsatte forfatterne imidlertid ikke nogen vaccinia-promotor i et fjerkræpoxvirus eller observerede nogen udtrykkelse af en fremmed DNA-sekvens tilstede i et fjerkræpox-genom. Det var ikke kendt før den foreliggende opfindelse, at
10 promotorer fra andre poxvira, såsom vaccinia-promotorer, rent faktisk ville promotere et gen i et avipox-genom.

BESKRIVELSE AF VISSE FORETRUKNE UDFØRELSESFORMER

15 Ifølge den foreliggende opfindelse er fjerkræpoxvirus blevet anvendt som avipox-art, der modificeres ved rekombination ved indbyggelse af exogent DNA deri.

Fjerkræpox er en art af avipox, der især inficerer høns, men som ikke
20 inficerer pattedyr. Fjerkræpox-stammen, der heri er designeret som FP-5, er en kommerciel fjerkræpoxvirus-vaccinestamme med oprindelse i kyllinge-embryoner, tilgængelig fra American Scientific Laboratories (Underafdeling af Schering Corp.) Madison, WI, United States Veterinary License nr. 165, Serie nr. 30321.

25 Fjerkræpox-stammen, der heri er designeret FP-1, er en Duvette-stamme modificeret til anvendelse som en vaccine i daggamle kyllinger. Stammen er en kommerciel fjerkræpoxvirus-vaccinestamme designeret O DCEP 25/CEP67/ 2309 Oktober 1980 og er tilgængelig fra Institute Merieux, Inc.

30

Kanariepox er en anden avipoxart. Analogt med fjerkræpox, inficerer kanariepox især kanariefugle, men inficerer ikke pattedyr. Kanariepox-stammen, der her er designeret som CP er en kommerciel kanariepox-vaccinestamme designeret LF2 CEP 524 24 10 75 og er tilgængelig fra
5 Institute Merieux, Inc.

De genetiske DNA-sekvenser, indsat i disse avipoxvira ved genetisk rekombination ifølge opfindelsen, omfatter Lac Z-genet af prokaryotisk oprindelse; rabies-glycoprotein (G) genet, der er et antigen fra et ikke-
10 fuglepatogen (specifikt af pattedyroprindelse); kalkuninfluenza-hæmagglutinin-genet, som er antigenet fra et patogent fuglevirus, der ikke er et avipoxvirus; kappegenet gp51.30 fra bovint leukæmivirus, der er et pattedyrvirus; fusionsprotein-genet fra Newcastle disease-virus (Texas-stamme), der er et fuglevirus; FeLV-kappegenet fra katteleukæmivirus, der er et pattedyr-
15 virus; RAV-1 env-genet fra det Rous-associerede virus, der er et fuglevirus/fjerkræsygdom; nucleoprotein (NP) genet fra hønse/Pennsylvania/1/83 influenzavirus, der er et fuglevirus; matrixgenet og peplomergen et fra infektiøs bronchitisvirus (stamme Mass 41), der er et fuglevirus; og glycoprotein-D-genet (gD) fra herpes simplex-virus, der er et pattedyrvirus.

20

Isolering af Lac Z-genet er beskrevet af Casadaban et al., *Methods in Enzymology* 100:293-308 (1983). Strukturen af rabies-G-genet er for eksempel beskrevet af Anilionis et al., *Nature* 294:275-278 (1981). Dets indbygning i vaccinia og udtrykkelse i denne vektor diskuteres af Kieny et al.,
25 *Nature* 312:163-166 (1984). Kalkuninfluenza-hæmagglutinin-genet er beskrevet af Kawaoka et al., *Virology* 158:218-227 (1987). Det bovine leukæmivirus gp51.30 env-gen er blevet beskrevet af Rice et al., *Virology* 138:82-93 (1984). Fusionsgenet fra Newcastle disease-virus (Texas stamme) er tilgængeligt fra Institute Merieux, Inc. som plasmid pNDV 108. Katte-
30 leukæmivirus-env-genet er blevet beskrevet af Guilhot et al., *Virology* 161:252-258 (1987). Det Rous-associerede virus type 1 er tilgængeligt fra

Institute Merieux, Inc. som to kloner, penVRVIPT og mp19env (190). Hønseninfluenza-NP-gen er tilgængeligt fra Yoshihiro Kawaoka, St. Jude Children's Research Hospital som plasmid pNP33. En infektiøs-bronchitis-virus cDNA-klon af IBV Mass 41 matrixgenet og peplomergen et er
 5 tilgængelig fra Institute Merieux, Inc. som plasmid pIBVM63. Herpes simplex-virus gD-genet er beskrevet i Watson et al., Science 218:381-384 (1982).

De rekombinante avipoxvira, der beskrives mere detaljeret nedenfor, omfatter én af tre vacciniapromotorer. Pi-promotoren, fra AvalH-regionen af
 10 vaccinia, er beskrevet i Wachsman et al., J. of Inf. Dis. 155:1188-1197 (1987). Mere bestemt er denne promotor afledt fra AvalH(XhoI G)-fragmentet af L-variant-WR-vacciniastammen, hvori promotoren leder transkriptionen fra højre til venstre. Kortbeliggenheden af promotoren er ca. 1,3 kbp (kilobasepar) fra den venstre ende af AvalH, ca. 12,5 kbp fra den venstre ende af
 15 vacciniagenomet, og ca. 8,5 kbp til venstre for HindIII-C/N-forbindelsen. Promotorsekvensen er:

**(GGATCCC) -ACTGTAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGT-
 AGTAGGGTACTCGTGATTAATTTTATTGTTAAACTTG- (AATTC) ,**

20

hvori symbolerne i parentes er koblingssekvenser.

HindIIH-promotoren (også kaldet "HH" og "H6" heri) blev defineret ved standard-transkriptionelle kortlægningsteknikker. Den har sekvensen:

25

**ATTCTTTATTCTATACTTAAAAATGAAAA
 TAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATA-
 AATT**

30

**ATTCATTATCGCGATATCCGT
 TAAGTTTGTATCGTAATG .**

Sekvensen er identisk med den, som af Rosen et al., J. Virol. 60:436-449 (1986) er beskrevet som værende opstrøms fra åben læseramme H6.

11K-promotoren er som beskrevet af Wittek, J. Virol. 49:371-378 (1984) og
5 Bertholet, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2096-2100 (1985).

De rekombinante avipoxvira ifølge opfindelsen er konstrueret ved to inden for faget kendte trin, der er analoge med dem beskrevet i førnævnte US patent 4 603 112 til dannelsen af syntetiske rekombinanter af vacciniaviruset.

10

Først anbringes den DNA-sekvens, som skal indsættes i viruset, i en E. coli-plasmidkonstruktion, hvori er indsat DNA, der er homologt til en sektion af ikke-essentielt DNA i avipoxviruset. DNA-gensekvensen, der skal indsættes, ligeså separat til en promotor. Promotor-gen-koblingen indsættes derpå i
15 plasmidkonstruktionen, således at promotor-gen-koblingen i begge ender er flankeret af DNA homologt til en ikke-essentiell region af avipox-DNA. Den resulterende plasmidkonstruktion amplificeres derpå ved vækst i E. coli-bakterier. (Plasmid-DNA bruges til at bære og amplificere exogent genetisk materiale, og denne metode er velkendt inden for faget. Disse plasmid-
20 teknikker er f.eks. beskrevet af Clewell, J. Bacteriol. 110:667-676 (1972). Teknikkerne til isolering af det amplificerede plasmid fra E. coli-værten er ligeledes velkendte og er f.eks. beskrevet af Clewell et al. i Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:1159-1166 (1969).)

25 Det amplificerede plasmidmateriale isoleret efter vækst i E. coli anvendes derpå til det andet trin. Nemlig transfektion af plasmidet indeholdende DNA-gensekvensen, der skal indsættes, over i en cellekultur, f.eks. fibroblaster fra kyllingefostre, sammen med avipoxviruset (såsom fjerkræpox stamme FP-1 eller FP-5). Rekombination mellem henholdsvis homologt fjerkræpox-DNA i
30 plasmidet og det virale genom giver et avipoxvirus, der er modificeret ved

tilstedeværelsen af ikke-fjerkræpox-DNA-sekvenser i et ikke-essentielt område af sit genom.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

5

EKSEMPEL 1 - Prøvninger for transient udtrykkelse til demonstrering af fjerkræpox-RNA-transkriptionsfaktorerers genkendelse af vaccinia-promotorer

- 10 Der blev fremstillet et antal plasmidkonstruktioner indeholdende kodesekvensen for Hepatitis B-virus-overflade-antigen (HBSAg) koblet til vacciniavirus-promotorsekvenser. 50 µg af hvert plasmid blev transfekteret påCEF-celler inficeret med 10 pfu fjerkrævirus eller vacciniavirus pr. celle. Infektionen fik lov at fortsætte i 24 timer, og cellerne blev derpå lyseret ved
- 15 tre på hinanden følgende cykler bestående af frysning og optøning.

- Mængden af HBSAg i lysatet blev beregnet ved brug af det fra Abbott Laboratories, Diagnostic Division, kommercielt tilgængelige AUSTRIA II - ¹²⁵I-kit. Tilstedeværelsen eller fraværet af HBSAg udtrykkes som et forhold
- 20 mellem nettotællingerne (prøve minus baggrund) af den ukendte værdi og en negativ afskæringsværdi forudbestemt af fabrikanten. Dette resulterer i et P/N (positiv/negativ) forhold. Resultaterne er vist i tabel I.

- Der blev anvendt tre forskellige vaccinia-promotorsekvenser: Pi-promotoren, der erkendes tidligt ved vacciniainfektion, før DNA-replikation; 11K-promotoren, der erkendes sent ved vacciniainfektion, efter starten af DNA-replikation; og HindIII H (HH) promotoren, der erkendes både tidligt og sent ved vacciniainfektion. Disse promotorer er tidligere beskrevet heri.
- 25

Dataene indikerer, at HBSAg dannet i lysatet af inficerede celler er resultatet af genkendelse af vacciniapromotorer af transkriptionsfaktorer fra enten fjerkræpox eller vaccinia.

5

TABEL I

	<u>Plasmid</u>	<u>Virus</u>	<u>Beskrivelse</u>	<u>P/N forhold</u>
	pMP131piR ₂	Fjerkræpox	SAg koblet til	1,8
		Vaccinia	Pi-promotor	9,1
10	pMPK22.13S	Fjerkræpox	SAg koblet til	14
		Vaccinia	11K-promotor	2
	pPDK22.5	Fjerkræpox	SAg koblet til	92,6
15		Vaccinia	11K-promotor	5,6
	pRW668	Fjerkræpox	SAg koblet til	77
		Vaccinia	HH-promotor	51,4
20	(ingen plasmid)	Fjerkræpox		1,1
	(ingen plasmid)	Vaccinia		1,3
	pMPK22.13S	(ingen virus)		1,3

25 EKSEMPEL 2 - Konstruktion af rekombinant fjerkræpox-virus vFP-1
indeholdende Lac Z-genet

Et fragment i et ikke-essentielt område af fjerkræpox-viruset blev lokaliseret og isoleret på følgende måde.

30

Der blev anvendt nuklease Bal31 til fjernelse af de enkeltstrengede terminale hårnåleløkker i FP-5 DNA. Det store Klenowfragment af DNA-polymerase I blev anvendt til dannelse af stumpe ender. Efter fjernelse af løkkerne blev fragmenterne frembragt ved nedbrydning med restriktionsendonuklease

5 BgIII. Ved denne nedbrydning dannedes en række FP-5-fragmenter, der blev adskilt ved agarosegelelektroforese.

Et 8,8 kbp BgIII-fragment med stumpe ender blev isoleret og ligeret ind i et kommercielt tilgængeligt plasmid, pUC9, der var blevet kløvet med BamHI og

10 Smal. Det resulterende plasmid blev designeret pRW698.

For at nedsætte størrelsen af fjerkræpox-fragmentet blev dette plasmid kløvet med HindIII til dannelse af yderligere to fragmenter. Et 6,7 kbp fragment blev kasseret, og det tilbageblevne 4,7 kbp fragment blev ligeret til

15 sig selv til dannelse af et nyt plasmid designeret pRW699.

For at inkorporere et 11K-promoteret Lac Z-gen i dette plasmid blev pRW699 skåret med EcoRV, der kun kløver plasmidet på ét sted. Det 11K-promoterede Lac Z-segment blev derpå indsat som et PstI-BamHI-fragment

20 med stumpe ender, hvorved der skabtes et nyt plasmid designeret pRW702. Lac Z-klonen er fra pMC1871, som beskrevet i Casadaban et al., loc. cit. 11K-promotoren blev ligeret til den ottende codon af Lac Z-genet via en BamHI-linker.

25 Ved rekombinationsteknikker, som beskrevet for vaccinia i US patent 4 603 112, blev pRW702-plasmidet derpå rekombineret med fjerkræpox FP-5, der vokser på kyllingefosterfibroblaster (CEF), idet der anvendtes følgende procedurer til frembringelse af vFP-1. 50 µg pRW702-DNA blev blandet i et slutvolumen på 100 µl med 0,5 µg af fjerkræpox-DNA dækkende hele

30 genomet. Til dette blev sat 10 µl 2,5 M CaCl₂ og 110 µl 2 x HEBS puffer (pH 7) fremstillet af:

- 5 40 mM Hepes
 300 mM NaCl
 1,4 mM Na_2HPO_4
 10 mM KCl
 12 mM dextrose.

Efter 30 minutter ved stuetemperatur tilsattes 200 μl af en fjerkræpox-viruspulje fortyndet til 5 pfu/cell, og blandingen inokuleredes på 60 mm
10 petriskåle indeholdende et monolag af primære CEF. 0,7 ml Eagles medie indeholdende føtal bovint serum (FBS) tilsattes ligeledes på dette tidspunkt. Petriskålene blev inkuberet ved 37 °C i 2 timer, hvorefter yderligere 3 ml Eagles medie indeholdende 2% FBS blev tilsat og petriskålene inkuberet i 3
15 døgn. Celler blev lyseret ved tre på hinanden følgende cykler bestående af frysning og optøning, og afkom af virus blev derpå prøvet for tilstedeværelsen af rekombinanter.

Der opnåedes bevis for vellykket gennemførelse af indsættelse ved rekombination af det 11K-promoterede Lac Z-gen i genomet for fjerkræpox
20 FP-5 ved at afprøve for udtrykkelse af Lac Z-genet. Lac Z-genet koder for enzymet β -galactosidase, der kløver det kromogene substrat 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-gal) under frigivelse af et blåt indolylderivat. Blå plakker blev udvalgt som positive rekombinanter.

25 Den med held gennemførte indsættelse af Lac Z i genomet af fjerkræpox FP-5 samt dets udtrykkelse blev også bekræftet ved immunpræcipitering af β -galactosidaseprotein med kommercielt tilgængelige antisera og standardteknikker under anvendelse af vFP-1-inficerede CEF, BSC (abenyrecellelinie - ATCC CCL26), VERO (abenyrecellelinie - ATCC CC81) og
30 MRC-5 (human diploid lungecellelinie -ATCC CCL171).

Udtrykkelsen af β -galactosidase af det rekombinante virus vFP-1 blev videre bekræftet in vivo ved inokulering af kaniner og mus med viruset og ved at kunne måle en post-inokuleringsstigning i titerne af antistof rettet mod β -galactosidaseproteinet i serum af de inokulerede dyr.

5

Specielt blev det rekombinante vFP-1 oprenset fra værtcellekontaminanter og inokuleret intradermalt to steder på hver side af to kaniner. Hver kanin modtog en total mængde på 10^8 pfu.

- 10 Dyrene fik tappet blod med ugentlige mellemrum, og seraene brugt ved en ELISA prøvning under anvendelse af en kommercielt tilgængelig præparation af oprenset β -galactosidase som antigenkilde.

- 15 Både kaniner og mus inokuleret med det rekombinante vFP-1 frembragte et immunrespons over for β -galactosidaseprotein som vist ved en ELISA-prøvning. I begge arter var responset detekterbart én uge efter inokulering.

EKSEMPEL 3 - Konstruktion ud fra fjerkræpox-virus FP-5 af rekombinant virus vFP-2 indeholdende rabies-G-genet og Lac Z

20

- Fra FP-5 opnåedes et 0,9 kbp Pvull-fragment, der ved hjælp af standardteknikker blev indsat mellem de to Pvull-steder i pUC9. Den resulterende konstruktion, designeret pRW688.2, har to HincII-steder med en afstand på ca. 30 bp, der er beliggende asymmetrisk inde i Pvull-fragmentet, og de danner således en lang arm og en kort arm af fragmentet.
- 25

Under anvendelse af kendte teknikker blev oligonukleotidadaptere blev mellem disse HincII-steder til indførelse af PstI- og BamHI-steder, hvorved plasmid pRW694 dannedes.

30

Dette plasmid blev nu kløvet med PstI og BamHI, og Lac Z-genet med en koblet 11K vacciniapromotor, der tidligere er beskrevet, blev indsat til dannelse af det nye plasmid pRW700.

- 5 Til dannelse af et Pi-promoteret rabies-G-gen, blev BglII-stedet, der er 5'-proximalt i forhold til rabiesgenet (jfr. Kieny et al., loc. cit.), gjort stump-endet og ligeret til det udfyldte EcoRI-sted i Pi-promotoren beskrevet tidligere.

- 10 Denne konstruktion blev indsat i PstI-stedet af pRW700 til dannelse af plasmid pRW735.1, som indeholder den fremmede gensekvens Pi-rabies G-11K-Lac Z. Denne indsættelse er således orienteret inden for plasmidet, at den lange PvuII-HincII-arm af FP-5-donorsekvensen er 3' i forhold til Lac Z-genet.

- 15 Den resulterende endelige konstruktion blev rekombineret med fjerkræpox-virus FP-5 ved infektion/transfektion af kyllingefosterfibroblaster ved fremgangsmåderne beskrevet ovenfor til dannelse af rekombinant fjerkræpox-virus vFP-2. Dette rekombinante virus blev selekteret ved X-gal farvning.

- 20 Korrekt indsættelse og udtrykkelse af både Lac Z-markørgenet og rabies-G-genet blev verificeret ved et antal yderligere metoder beskrevet nedenfor.

- 25 Lokalisering af rabies-antigenet ved immunfluorescens med specifikke antistoffer viste vellykket udtrykkelse af rabies-antigen på overfladen af fugle- og ikke-fugleceller inficeret med vFP-2-virus.

Udtrykkelsen af rabies-antigen og β -galactosidase af fugle- og ikke-fugleceller inficeret med vFP-2-viruset blev ligesom tidligere bekræftet ved immunpræcipiteringsmetoden.

- Ved inokulering af to kaniner med vFP-2-virus blev der opnået yderligere bevis for, at vFP-2-udførelsesformen ifølge opfindelsen er en vellykket rekombinant virus, der bærer generne for rabies G og β -galactosidase. Begge kaniner blev inokuleret intradermalt med 1×10^8 pfu vFP-2 pr. kanin.
- 5 Begge disse kaniner dannede typiske pox-læsioner. Kaninerne fik udtaget blodprøver med ugentlige mellemrum, og sera blev afprøvet ved ELISA til påvisning af tilstedeværelsen af specifikke antistoffer mod rabiesglycoproteinet og β -galactosidaseproteinet.
- 10 Som angivet i tabel II nedenfor, viste kanin 205 påviselige mængder af anti- β -galactosidase-antistof ved ELISA-prøven én uge efter inokulering. Dette steg ved to uger til en titer på 1 i 4000, der opretholdes indtil 5 uger efter inokuleringen. Ved brug af antigen-indfangning-ELISA-prøvningen, viste sera fra kanin 205 påviselige mængder af anti-rabies-antistoffer fra 3 til 10 uger
- 15 efter inokulering.

TABEL II

Antistof-dannelse af kanin 205 mod
rabies-antigen og β -galactosidaseprotein

5

<u>Tidspunkt</u>		<u>Antistof-titer</u> (reciprokke af serumfortynding)
10		
	Før udtagning af blodprøve	anti- β -galactosidase 0
	Uge 1	500
	Ugerne 2-5 (hver)	4000
15	Uge 6	500
	Uge 9	250
	Før udtagning af blodprøve	anti-rabies 0
20	Uge 3	200
	Uge 6	200
	Uge 10	100

EKSEMPEL 4A - Konstruktion ud fra fjerkræpox-virus FP-1 af rekombinant
virus vFP-3 indeholdende promoteret rabies-G-gen

25

Denne udførelsesform anskueliggør, at rabies-G-genet udtrykkes fuldtud af andre fjerkræpox-stammer end FP-5, specifikt af en anden stamme af fjerkræpox-virus designeret FP-1.

30

Som i eksempel 3 opnåedes et 0,9 kbp Pvull-fragment fra FP-1, idet man antog, at fragmentet ville indeholde et ikke-essentielt område, som det var tilfældet for FP-5.

- 5 Dette fragment blev indsat mellem de to Pvull-steder i pUC9, hvorved dannedes et plasmid designeret pRW731.15R.

Dette plasmid har to HincII-steder, med en afstand på ca. 30 bp, der er beliggende asymmetrisk inde i Pvull-fragmentet, og de danner således en
10 lang arm og en kort arm af fragmentet.

En kommercielt tilgængelig Pst-koblingssekvens

(5') - CCTGCAGG - (3')

blev indsat mellem de to HincII-steder, hvorved dannedes plasmid pRW741.
15

Et HH-promoteret rabies-G-gen indsattes i dette plasmid i PstI-stedet til dannelse af det nye plasmid pRW742B. Ved rekombination af dette plasmid med FP-1 ved infektion/transfektion af CEF-celler opnåedes virus vFP-3.

- 20 ATG-translationsinitieringscodonen i den åbne læseramme promoteret af HH-promotoren blev overlejret på initieringscodonen af rabies-G-genet under anvendelse af et syntetisk oligonukleotid, der spænder over EcoRV-stedet i HH-promotoren og HindIII-stedet i rabies-G-genet. 5'-enden af dette HH-promoterede rabiesgen blev ved kendte teknikker modificeret til at indeholde
25 et PstI-sted, og konstruktionen ligeredes derpå ind i PstI-stedet af pRW741 til dannelse af pRW742B. Orienteringen af konstruktionen i plasmidet er den samme som i pRW735.1, der tidligere er omtalt i eksempel 3.

Rekombination blev udført som beskrevet i eksempel 2. Den resulterende
30 rekombinant benævnes vFP-3.

Udtrykkelsen af rabies antigen af både fugle- og ikke-fugle-celler inficeret med vFP-3-viruset blev bekræftet ved de tidligere beskrevne immunpræcipiterings- og immunfluorescensteknikker.

- 5 Yderligere bevis for, at vFP-3-udførelsesformen ifølge opfindelsen er en vellykket rekombinant virus, der udtrykker gener for rabies G, opnåedes ved at inokulere kaninpar intradermalt med den rekombinante virus. To kaniner blev inokuleret intradermalt med 1×10^8 pfu vFP-3 pr. kanin. Begge disse kaniner dannede typiske poxlæsioner, der nåede maksimal størrelse 5-6
10 dage efter inokulering. Kaninerne fik udtaget blodprøver med ugentlige intervaller, og sera blev afprøvet ved ELISA med henblik på påvisning af tilstedeværelsen af specifikt antistof for rabiesglycoproteinet.

- Fem rotter blev hver ligeledes inokuleret intradermalt med 5×10^7 pfu vFP-3.
15 Der sås resulterende læsioner i alle dyrene.

- Både kaniner og rotter dannede påviselige mængder antistof specifikt mod rabies to uger efter inokulering. To kontrolkaniner inokuleret intradermalt med det parental FP-1-virus havde ikke påviselige mængder af anti-rabies
20 antistof.

- For at udelukke den mulighed, at antistofresponset skyldtes indførelsen af rabiesantigen, der tilfældigt fulgte med inokulumviruset eller var integreret i membranen af det rekombinante fjerkræpox-virus, snarere end at være
25 fremkommet ved de novo syntese af rabiesantigenet af det rekombinante virus i dyret som forudsat, blev vFP-3-viruset kemisk inaktiveret og inokuleret i kaniner.

- Det oprensede virus blev inaktiveret fra den ene dag til den anden ved 4°C i
30 nærvær af 0,001% β -propiolacton og derefter pelleteret ved centrifugering. Det pelleterede virus blev opsamlet i 10 mM Tris-pufret saltvandsopløsning,

ultralydsbehandlet og titreret til sikring af, at der ikke var infektiøs virus tilbage. To kaniner blev inokuleret intradermalt med inaktiveret vFP-3 og to kaniner med en ækvivalent mængde ubehandlet rekombinant. Størrelsen af læsioner blev kontrolleret.

5

Begge kaniner, der fik ubehandlet vFP-3, udviklede 5 dage efter inokulering typiske pox-læsioner klassificeret som 4-5⁺. Kaniner inokuleret med inaktiveret virus udviklede også læsioner, men disse blev 5 dage efter inokulering klassificeret som 2⁺.

10

Kaninerne fik med ugentlige intervaller udtaget blodprøver, og sera blev ved ELISA afprøvet for tilstedeværelsen af rabiesspecifikke antistoffer og fjerkræpox-specifikke antistoffer. Resultaterne er vist i tabel III nedenfor.

15

TABEL III

Kanin:	Levende vFP-3				Inaktiveret vFP-3			
	Nr. 295		Nr. 318		Nr. 303		Nr. 320	
	Rabies	FP	Rabies	FP	Rabies	FP	Rabies	FP
Afprøvet antistof:								
Uge efter inokulering								
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	250	4000	500	4000	0	50	0	1000
3	1000	4000	500	4000	0	4000	0	2000
4	1000	4000	2000	4000	0	4000	0	2000
5	4000	4000	2000	4000	0	2000	0	4000
6	4000	4000	4000	4000	0	2000	0	2000

I denne afprøvning er titreringsendepunktet (udtrykt som den reciprokke af serumfortyndingen) arbitrært sat til 0,2 efter subtraktion af absorptionsværdierne af alle præudfordringssera. Begge kaninerne 295 og 318, der fik den levende virus, udviklede et immunrespons på rabies-glycoproteinet og på fjerkræpox-virusantigener. Kaninerne 303 og 320

20

udviklede også et immunrespons på fjerkræpox-virusantigener, omend titeren var lav. Ingen af disse kaniner udviklede et påviseligt respons på rabiesglycoproteinet.

- 5 Dette resultat er udtryk for, at det immunologiske respons dannet i kaninen er på grund af de novo udtrykkelsen af rabiesglycoprotein-genet, der bæres i det rekombinante virus, og ikke et respons på et tilfældigt medfølgende glycoprotein indeholdt i inokulumviruset.

10 EKSEMPEL 4B - Konstruktion ud fra fjerkræpox-virus FP-1 af rekombinant virus vFP-5 indeholdende upromoteret rabies-G-gen

- Udtrykkelse af et fremmed gen, indsat ved rekombination i fjerkræpox-genomet, kræver tilstedeværelse af en promotor. Denne blev vist ved at
15 skabe yderligere en rekombinant, vFP-5, der er identisk med vFP-3 bortset fra, at HH-promotoren er udeladt. Tilstedeværelsen af rabiesgenet i denne rekombinant blev bekræftet ved nukleinsyrehybridisering. Der detekteredes dog ikke noget rabiesantigen i CEF-cellekulturer inficeret med viruset.

20 EKSEMPEL 5 - Overføringsforsøg in vitro til bestemmelse af om fjerkræpox-virus replikerer i ikke-fugleceller

- Der blev udført et forsøg, hvori tre cellesystemer, et fra fugle og to fra ikke-fugle, blev inokuleret med den parentale FP-1-stamme eller den
25 rekombinante vFP-3. To petriskåle hver af hhv. CEF, MRC-5 og VERO inokuleredes med FP-1 eller vFP-3 i en input multiplicitet på 10 pfu pr. celle.

- Efter tre dage høstes én petriskål fra hver. Viruset blev frigivet ved tre på hinanden følgende cykler bestående af frysning og optøning og reinokuleret
30 på et frisk monolag af den samme cellelinje. Dette blev gentaget ved seks på

hinanden følgende overføringer, og ved afslutningen af forsøget blev prøver fra hver overføring titreret for virusinfektionsevne på CEF-monolag.

Resultaterne er vist i tabel IVA og indikerer, at serieoverføring af både FP-1 og vFP-3 er mulig i CEF-celler, men ikke i nogen af de to cellelinjer fra ikke-
5 fugle. Infektiøst virus kan ikke påvises efter 3 eller 4 overføringer i VERO- eller MRC-5-celler.

Den anden petriskål blev brugt til bestemmelse af, om virus, der ikke er påviseligt ved direkte titrering, kunne detekteres efter amplifikation i de
10 permissive CEF-celler. På trediedagen høstedes celler på den anden petriskål ved skrabning, og en trediedel af cellerne lyseredes og inokuleredes på et frisk CEF-monolag. Ved opnåelse af fuld cytopatisk virkning (CPE), eller 7 dage efter inficering, blev cellerne lyseret, og virusudbyttet titreret. Resultaterne er vist i tabel IVB. Når overføring i CEF-celler blev brugt til
15 amplifikation af et hvilket som helst tilstedeværende virus, kunne viruset ikke påvises efter fire eller fem overføringer.

Forsøg på at etablere vedvarende inficerede celler slog fejl.

20 I et yderligere forsøg på at påvise tegn på fortsat viral udtrykkelse i ikke-fugle celler, blev prøverne, der anvendtes til viral titrering ovenfor, brugt i en standard immunoprik-prøvning (immunodot assay), hvori anti-fjerkræpox antistof og anti-rabies antistof blev brugt til påvisning af tilstedeværelsen af de respektive antigener. Resultaterne af disse prøvninger bekræfter
25 resultaterne opnået ved titrering.

TABEL IVA
Overføringsforsøg

Inokulum-		FP-1			vFP-3	
virus:						
Cellotype	CEF	VERO	MRC-5	CEF	VERO	MRC-5
Overføring:						
1	6,6 ^a	4,8	4,9	6,6	5,4	66,2
2	6,7	2,9	3,7	6,5	4,2	5,1
3	6,4	1,4	1,0	6,4	1,7	4,4
4	6,1	i.d. ^b	i.d.	6,2	i.e.	1,0
5	6,4	i.d.	i.d.	6,3	i.d.	i.d.
6	5,7	i.d.	i.d.	5,9	i.d.	i.d.

^a - virustiter udtrykt som log₁₀ pfu/ml

5 ^b - ikke detekterbar

TABEL IVB
Amplifikationsforsøg

Inokulum-		FP-1			vFP-3	
virus:						
Cellotype	CEF	VERO	MRC-5	CEF	VERO	MRC-5
Overføring:						
1	6,4 ^a	6,2	6,4	6,5	6,3	6,4
2	7,5	6,3	6,0	6,5	6,3	5,5
3	6,2	6,7	5,3	5,9	6,1	6,3
4	5,6	4,6	3,9	5,7	4,8	5,8
5	6,3	4,1	i.d.	6,1	4,7	4,7
6	6,2	i.d. ^b	i.d.	6,2	i.d.	i.d.

10 ^a - virustiter udtrykt som log₁₀ pfu/ml

^b - ikke detekterbar

EKSEMPEL 6 - Yderligere rekombinanter af fjerkræpox FP-1: vFP-6, vFP-7, vFP-8 og vFP-9

Rekombinant vira vFP-6 og vFP-7 blev konstrueret på følgende måde.

5

Et 5,5 kbp Pvull-fragment af FP-1 blev indsat mellem de to Pvull-steder i PUC9 til dannelse af plasmidet pRW731.13. Dette plasmid blev derpå skåret i et unikt HincII-sted og HH-promoteret rabies G-gen med stumpe ender indsat til dannelse af plasmiderne pRW748A og pRW748B, der repræsenterer modsatte orienteringer af indsættelsen. Plasmiderne pRW748A og B blev derpå anvendt separat til at transfektere CEF-celler sammen med FP-1-virus til dannelse af hhv. vFP-6 og vFP-7 ved rekombination. Dette locus er nu designeret locus f7.

10

15 Et 10 kbp Pvull-fragment af FP-1 blev indsat mellem de to Pvull-steder i pUC9 til dannelse af pRW731.15. Dette plasmid blev derpå skåret i et unikt BamHI-sted og et 11K-promoteret Lac Z genfragment blev indsat til dannelse af pRW749A og pRW749B, der repræsenterer modsatte orienteringer af indsættelsen. Rekombination af disse donorplasmider med FP-1 resulterede i
20 hhv. vFP-8 og vFP-9. Dette locus er nu designeret locus f8.

vFP-8 og vFP-9 udtrykte LacZ-genet, som påvist ved X-gal. vFP-6 og vFP-7 udtrykte rabies G-genet som påvist ved rabiesspecifikt antiserum.

25 EKSEMPEL 7 - Immunisering med vFP-3 til beskyttelse af dyr mod udfordring med levende rabiesvirus

Grupper på 20 SPF hunmus, 4-6 uger gamle, blev inokuleret under fødderne med 50 µl vFP-3 i doser fra 0,7 til 6,7 TCID₅₀ pr. mus. [TCID₅₀ eller
30 vævskultur-infektios dosis (tissue culture infectious dose) er den dosis, hvorved der ses cytopatisk virkning i 50% af celler i vævskultur). 14 dage

efter vaccinationen blev 10 mus i hver gruppe slået ihjel, og der blev taget serumprøver med henblik på prøvning ved RFFI-afprøvningen. De tilbageværende 10 mus blev udfordret ved intracerebral inokulering af 10 LD₅₀ rabies af CVS-stammen og overlevende mus optalt 14 dage efter udfordringen.

5

Resultaterne er vist i tabel VA nedenfor.

TABEL VA

	vFP-3 dosis <u>Log₁₀ TCID₅₀</u>	Rabies antistof titer <u>Log₁₀ Fortynding</u>	<u>Overlevelse</u>
10	6,7	1,9	8/10
	4,7	1,8	0/10
	2,7	0,4	0/10
15	0,7	0,4	0/10

* Som målt ved RFFI (Rapid Fluorescent Focus Inhibition) afprøvningen, Laboratory Techniques in Rabies, 3. udg., 354-357, WHO, Geneve.

- 20 Forsøget blev gentaget med 12,5 LD₅₀ udfordrende rabiesvirus. Resultaterne er vist i tabel VB nedenfor.

TABEL VB

	vFP-3 dosis <u>Log₁₀ TCID₅₀</u>	Rabies antistof titer <u>Log₁₀ Fortynding</u>	<u>Overlevelse</u>
25	6,7	2,8	5/10
	4,7	2,1	2/10
	2,7	0,6	0/8
30	0,7	0,6	0/8

* Som målt ved RFFI (Rapid Fluorescent Focus Inhibition) afprøvningen, Laboratory Techniques in Rabies, 3. udg., 354-357, WHO, Geneve.

- 35 To hunde og to katte blev immuniseret med en enkelt subcutan inokulering af 8 log₁₀ TCID₅₀ af det rekombinante vFP-3. Yderligere blev to hunde og fire katte af tilsvarende alder og vægt holdt som ikke-vaccinerede kontroller. Der

- blev udtaget blodprøver på alle dyr med ugentlige mellemrum. På dag 94 blev hver hund udfordret ved inokulering i tindingemuskelen af to doser på 0,5 ml af et spytkirtelhomogenat af rabies virus af NY-stammen, tilgængelig fra Institut Merieux, Inc. Den totale dosis svarede til 10000 muse LD₅₀
- 5 indgivet ad intracerebral vej. De seks katte blev på lignende måde udfordret ved inokulering i nakkemuskelen med to doser på 0,5 ml af den samme virussuspension. Den totale dosis pr. dyr svarede til 40000 muse LD₅₀ indgivet ad intracerebral vej. Dyrene blev observeret dagligt. Alle ikke-vaccinerede dyr døde med rabiessymptomer på den i tabel VI angivne dag.
- 10 De vaccinerede dyr overlevede udfordringen og blev observeret i tre uger, efter at det sidste kontroldyr døde. Resultaterne er vist i tabel VI nedenfor.

TABEL VI

Overle-

15	<u>velse/ dyr</u>	<u>Vaccine- ring</u>	<u>Titer på postinokuleringsdag</u>					<u>Døds- tidspunkt</u>
			<u>0</u>	<u>14</u>	<u>21</u>	<u>28</u>	<u>94</u>	
	Kat							
20	7015	vFP-3 ^a	0	2,2 ^b	2,4	2,4	1,5	+
	7016	vFP-3	0	1,7	1,9	2,0	1,3	+
	8271	c ^c	0	0	0	0	0	d/13 ^d
	T10	c	0	0	0	0	0	d/12
	T41	c	0	0	0	0	0	d/13
25	T42	c	0	0	0	0	0	d/12
	Hund							
	426	vFP-3	0	0,8	1,0	1,1	1,2	+
	427	vFP-3	0	1,5	2,3	2,2	1,9	+
30	55	c	0	0	0	0	0	d/15
	8240	c	0	0	0	0	0	d/16

^a Både katte og hunde vaccineret med vFP-3 modtog 8 log₁₀TCID₅₀ ad subcutan vej.

35 ^b Titer udtrykt som log₁₀ højeste serumfortynding der giver mere end 50% reduktion i antallet af fluorescerende brønde i en RFFI-test.

^c Ikke-vaccinerede kontroldyr.

^d Dyret døde/dødsdag efter udfordring.

I yderligere forsøg blev de rekombinante vira vFP-2 og vFP-3 inokuleret i kvæg ad flere forskellige indgivelsesveje.

Inokulerede dyr blev afprøvet for anti-rabies antistof pådagene 6, 14, 21, 28 og 35. Som vist i den følgende tabel VIIA udviste alle dyr et serologisk respons på rabiesantigenet.

TABEL VIIA

10		<u>Antistof-titers i pattedyr inokuleret med vFP-3.</u>						
		<u>anti-rabies neutraliserende antistoffer</u>						
		<u>RFFI-test log₁₀ fortynding</u>						
		<u>Dag</u>	0	6	14	21	28	35
15	Kvæg nr.							
	7,3 log ₁₀ TCID ₅₀ 1420 (intraderm.)		NEG	0,6	2	1,7	1,8	1,7
20	8 log ₁₀ TCID ₅₀ 1419 (subcutan)		NEG	1,6	2,2	2,1	2,1	1,9
	8 log ₁₀ TCID ₅₀ 1421 (intramusk.)		NEG	0,9	2,2	2,2	1,8	1,7
25	7,3 log ₁₀ TCID ₅₀ 1423 (intramusk.)		NEG	0,9	1,1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺	1,1 ⁺

* Ikke signifikant.

30 Hvert stykke kvæg blev revaccineret med 8 log₁₀ TCIF₅₀ 55 dage efter inokulering og udviste et anamnestic respons på rabiesantigenet. Ved booster-revaccination blev alt kvæget inokuleret subcutant undtagen nr. 1421, der igen inokuleredes intramuskulært. RFFI-titers blev bestemt på
35 dagene 55, 57, 63, 70, 77 og 86. Resultaterne er vist i tabel VIIB.

TABEL VIIB

	<u>Dag</u>	55	57	63	70	77	86
	Kvæg nr.						
5	1419	1,7	1,5	2,9	2,9	2,6	2,9
	1420	1,0	0,5	1,9	2,3	2,2	2,0
	1421	1,3	1,2	2,9	2,7	2,5	2,5
10	1423	1,0	0,7	2,4	2,5	2,5	2,2

Alle tal er for vFP-3 med undtagelse af dyr nr. 1423, der er for vFP-2.

- 15 Kvæg, katte og kaniner blev også inokuleret intradermalt med kendte mængder af fjerkræpox-virus, og efter en uge blev sår opsamlet fra dyrene. Disse blev formalet, suspenderet i saltvandsopløsning og titreret til bestemmelse af virusmængderne.
- 20 Kun residuale mængder af infektiøs virus kunne genvindes. Dette viser, at der in vivo ikke forekom nogen produktiv infektion.

EKSEMPEL 8 - Inokulering af kyllinger med vFP-3

- 25 Det rekombinante fjerkræpox-virus vFP-3 blev inokuleret i kyllinger for at vise udtrykkelsen af fremmed DNA af et rekombinant fjerkræpox-virus i et system, der tillader produktiv replikation af vektoren.

- Kyllinger af hvide italienerhøns blev inokuleret intramuskulært med $9 \log_{10}$ TCID₅₀ vFP-3 eller $3 \log_{10}$ TCID₅₀ vFP-3 ved vinge-gennemstikning. Der udtoges blodprøver til en RFFI-afprøvning for rabies antistoftiter 21 dage efter vaccinerings. Titere fra dag 21 i inokulerede kyllinger var signifikant højere end titere fra dag 21 i kontroller. Gennemsnitstiteren for de uinficerede
- 30

kontroller var 0,6, gennemsnittet for de intramuskulært inokulerede fugle var 1,9 og gennemsnittet for de vinge-gennemstukne fugle var 1,2.

EKSEMPEL 9 - Rekombinant fjerkræpox vFP-11, der udtrykker kalkun-
influenza-H5-HA-antigen

5

Fuglearter kan immuniseres mod fuglepatogener ved brug af de rekombinante avipoxvira ifølge opfindelsen.

- 10 Således blev det hidtil ukendte plasmid pRW759 (beskrevet nedenfor), der er afledt fra fjerkræpox-virus FP-1 og som indeholder det HindIII H-promoterede hæmagglutinin-gen (H5) fra A/turkey/Ireland/1378/83 (TYHA), anvendt til transfektion af CEF-celler, der samtidig var inficeret med parentalt virus, FP-1. Rekombinant fjerkræpox-virus vFP-11 blev opnået ved de tidligere be-
- 15 skrevne teknikker.

- Syntesen af et hæmagglutininmolekyle af vFP-11-inficerede celler blev bekræftet ved immunpræcipitering fra metabolisk radiomærkede inficerede celleyssater ved brug af specifikt anti-H5-antistof og standard teknikker. Der
- 20 blev vist specifik immunpræcipitering af prækursor-hæmagglutinin med en molekylvægt på ca. 63 kd (kilodalton) og to kløvningsprodukter med molekylvægte på 44 og 23 kd. Der blev ikke præcipiteret sådanne proteiner fra et lysat af uinficerede CEF-celler eller celler inficeret med parentalt virus, FP-1.

25

Der blev foretaget immunfluorescensundersøgelser til bestemmelse af, at HA-molekylet, dannet i celler inficeret med det rekombinante fjerkræpox vFP-11 blev udtrykt påcelleoverfladen. CEF-celler inficeret med det rekombinante fjerkræpox-virus vFP-11 viste kraftig fluorescerende mærkning på overfladen.

- 30 I celler inficeret med det parentale virus FP-1 sås ingen fluorescens.

Plasmid pRW759 blev dannet på følgende måde:

pRW742B (jfr. eksempel 4) gøres lineært ved delvis nedbrydning med PstI, og fragmentet skæres igen med EcoRV til fjernelse af rabies-G-genet, hvilket
5 efterlader HH-promotoren på det tilbageværende fragment på ca. 3,4 kbp. Dette behandles med alkalisk phosphatase, og et syntetisk oligonukleotid blev indsat til sammenføjning af HH-promotoren med TYHA ved ATG til dannelse af pRW744.

10 Dette plasmid blev gjort lineært ved delvis nedbrydning med DraI, det lineære fragment skåret med Sall og det største fragment blev reisolaret og behandlet med alkalisk phosphatase.

Til slut blev pRW759 dannet ved indsættelse i pRW744-vektoren af den
15 isolerede Sall-DraI kodesekvens fra TYHA, beskrevet af Kawaoka et al., Virology 158:218-227 (1987).

EKSEMPEL 10 - Immunisering med vFP-11 til beskyttelse af fugle imod
udfordring med levende influenzavirus

20

For at vurdere immunogeniciteten af det rekombinante fjerkræpox-virus vFP-11, udførtes vaccinations- og udfordringsforsøg med kyllinger og kalkuner.

Særlige patogenfrie kyllinger af hvide italienere blev i en alder af 2 dage og 5
25 uger vaccineret ved vingevævspunktur med en dobbelt kanyle, der anvendes til kommerciel vaccinering af fjerkræ med fjerkræpox-virus. Hver fugl blev indgivet ca. 2 µl indeholdende 6×10^5 pfu vPF-1. Der blev udtaget blodprøver fra de ældre fugle før vaccineringen, og der udtoges blodprøver fra alle fugle før udfordring og to uger senere.

30

Til sammenlignende formål blev en anden gruppe kyllinger vaccineret med en konventionel H5-vaccine betående af en inaktiveret H5N2-stamme i en vand-i-olie-emulsion.

- 5 Inaktiveret H5N2-vaccine blev fremstillet ud fra A/Mallard/NY/189/82 (H5N2) influenzavirus dyrket i 11 dage gamle embryonerede hønseæg. Den inficerede allantoisvæske med en HA-titer på 800/0,1 ml og infektivitetstiter på $10^{8.5}$ /0,1 ml blev inaktiveret med 0,1% propiolacton og suspenderet i vand-i-olie-emulsion som beskrevet i Stone et al., *Avian Dis.* 22:666-674 (1978) og Brugh et al., *Proc. Second Inter. Sym. on Avian Influenza*, 283-292 (1986). Vaccinen blev i et volumen på 0,2 ml indgivet subcutant på indersiden af lårmusklen i 2 dage og 5 uger gamle kyllinger af SPF hvide italienerne.

- 15 En tredje og fjerde gruppe kyllinger fik hhv. parentalt virus FP-1 eller ingen vaccine.

- 20 Kyllingerne blev udfordret med ca. 10^3 LD₅₀ af den yderst patogene A/Turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) eller A/Chick/Penn/1370/83 (H5N2) influenzavirus ved indgivelse af 0,1 ml i næseborene af hver fugl. To dage gamle fugle blev udfordret 6 uger efter vaccinering, og 5 uger gamle fugle blev udfordret 5 uger efter vaccinering. Fuglene blev dagligt observeret for tegn på sygdom, indikeret ved opsvulmen og cyanose af ansigtet og kammen, samt blødninger i benene (ofte kunne sådanne fugle ikke stå op), paralysse og død. De fleste dødsfald skete mellem 4 og 7 dage efter inficering. Der blev taget podninger fra trachea og kloak på hver af de levende kyllinger 3 dage efter inficering, som undersøgte for virus ved inokulering i embryonerede æg. Kyllingerne inokuleret med enten vildtype eller rekombinant fjerkræpox-virus udviklede typiske læsioner på vingevævet.
- 30 På trediedagen var dannet pustuler på stedet for hvert kanylestik, efterfulgt af cellulær infiltrering med sårdannelse og bedring på 7. dagen. Der dannedes

ikke nogen sekundære læsioner, og der var ikke tegn på spredning til ikke-vaccinerede kontaktkyllinger. Resultaterne af udfordringsforsøget er vist i tabel VIII og de tilhørende serologiske resultater i tabel IX.

5

TABEL VIIIBeskyttelse af kyllinger formidlet af H5 udtrykt i fjerkræpox

	Påvist udfordring			Beskyttelse	Virus	
	Virus	Vaccine	Kyllingers alder	Syg/død/total	Trachea	Kloak
10	Ty/Ireland (H5N8)	Fowlpox-H5 (vFP-11)	2 dage	0/0/10	0/10	0/10
			5 uger	0/0/5	0/5	0/5
15		Inaktiveret H5N2	2 dage	0/0/9	0/9	0/9
			5 uger	0/0/5	0/5	0/5
20		Fowlpox control	2 dage	10/9/10	2/6	3/6
			5 uger	4/3/5	0/5	4/5
		Ingen	2 dage	10/9/10	2/7	5/7
			2 dage	2/1/2	2/2	2/2
			5 uger	2/2/5	0/5	1/5
25	Ck/Penn (H5N2)	Fowlpox-H5 (vFP-11)	2 dage	0/0/10	8/10	0/10
			5 uger	0/0/6	5/6	2/6
		Inaktiveret H5N2	2 dage	0/0/8	2/8	0/8
30			5 uge	0/0/5	3/5	0/5
		Fowlpox control	2 dage	10/1/10	10/10	10/10
			5 uger	5/0/5	5/5	5/5
35		Ingen	2 dage	9/3/9	9/9	9/9
			2 dage	2/2/2	2/2	2/2
			5 uger	5/2/5	5/5	5/5

* Fire ikke-vaccinerede fugle opholdt sig hos og voksede op med fjerkræpox-H5-gruppen på 10 fugle til afprøvning af spredningen af fjerkræpox-H5.

40

TABEL IX

Serologisk respons induceret ved inkulering med vFP-11 eller en inaktiveret influenzavirus-vaccine

5	Udfordrende virus	Vaccine	Kyllingers alder	HL-titere for: ^(a)				Neutralisering af infektivitet:			
				Ty/Ireland		Ck/Penn		Ty/Ireland		Ck/Penn	
				Efter 1	Efter 2	Efter 1	Efter 2	Efter 1	Efter 2	Efter 1	Efter 2
10	Ty/Ireland (H5N8)	Fjerkræpox-H5	2 dage 5 uger	15 ^(c) 100	156 480	< <	65 20	70 160	2500 10000		
		Inaktiveret H5N2	2 dage 5 uger	30 350	70 600	30 180	50 200	65 240	1000 2500		
15		Fjerkræpox-kontrol	2 dage 5 uger	< <	160 ^{(1)(b)} 1280 ⁽²⁾	< <	20 60	< <	300 ⁽¹⁾ 10000 ⁽²⁾		
		Ingen	2 dage 5 uger	< <	80 ⁽¹⁾ 2000 ⁽³⁾	< <	20 60	< <	300 ⁽¹⁾ 70 ⁽³⁾		
20	Ck/Penn	Fjerkræpox-H5	2 dage 5 uger	15 80	600 2500	< <	90 300			< <	70 2500
		Inaktiveret H5N2	2 dage 5 uger	60 300	300 500	20 100	70 200			10 150	400 1500
25		Fjerkræpox-kontrol	2 dage 5 uger	< <	60 ⁽⁶⁾ 90	< <	120 140			< <	40 40
30		Ingen	2 dage 5 uger	< <	60 ⁽⁶⁾ 160 ⁽³⁾	< <	160 150			< <	25 70

(fortsættes)

(Tabel IX fortsat)

- (a) De 5 uger gamle fugle fik før vaccination udtaget blodprøve og afprøvet ved HI- og neutraliseringsafprøvninger, ingen indeholdt påviselige antistofmængder, og resultaterne er ikke vist. De 2 dage gamle kyllinger fik udtaget blodprøve 6 uger efter vaccination (Efter 1), og de 5 uger gamle fugle fik udtaget blodprøve 5 uger efter vaccination (Efter 1); begge grupper fik udtaget blodprøve 2 uger efter udfordring (Efter 2). Tallene er middel-antistoftitrene fra de samme kyllingegrupper beskrevet i tabel 1.
- (b) Tallene i parentes repræsenterer de, der overlevede udfordring.
- (c) Afprøvninger for hæmagglutinationsinhibering (HI) blev foretaget på mikrotiterplader under anvendelse af receptormedbrydende enzymbehandlet sera, 4 HA-enheder af Ty/lre-virus, og 0,5% kyllinge-erythrocyter som beskrevet i Palmer et al., Immun. Series nr. 6, 51-52, US Dept. Health, Education and Welfare (1975). Prøvninger for neutralisering af infektivitet blev udført ved inkubering af 10^3 EID₅₀ Ty/lre-virus med serumfortyndinger i 30 min ved stuetemperatur, efterfulgt af inkubering af embryonerede æg med alikvots. Virusvækst blev bestemt ved hæmagglutinationsprøvninger efter inkubering af æg i 2 dage ved 33 °C.
- < = mindre end 10.

- 25 Kyllinger inokuleret med fjerkræpox-H5-rekombinanten (vFP-11) eller den inaktiverede H5N2-influenzavaccine i adjuvans var beskyttede mod udfordring med den homologe Ty/lre (H5N8) influenzavirus og med den beslægtede, men skadelige Ck/Penn (H5N2) influenzavirus. Derimod udviste størstedelen af fuglene inokuleret med parental FPV eller som ikke fik nogen vacciner, kliniske tegn på højt patogen influenza, inklusive opsvulmen og cyanose af ansigtet og kammen, blødning i benene og paralysse. Største-
- 30

delen af disse fugle døde. De vaccinerede fugle udskilte ikke påviselige niveauer af Ty/lre, men udskilte Ck/Penn.

- 5 Både de inaktiverede og rekombinante vacciner inducerede HI og neutraliserende antistoffer mod Ty/lre, men mængden af antistof induceret af fjerkræpox-H5-rekombinanten, vFP-11, før udfordring inhiberede ikke HA eller neutraliserede det heterologe Ck/Penn H5. Dog var kyllingerne beskyttet mod udfordring med både Ty/lre- og Ck/Penn-influenzavira.
- 10 Immunitet mod H5-influenza induceret af vFP-11-vaccinationen varede i mindst 4 til 6 uger og var krydsreaktiv. For yderligere at undersøge varigheden og specificiteten af responset blev en gruppe af 4 uger gamle kyllinger inokuleret i vingevævet med vFP-11 som tidligere beskrevet og udfordret med månedlige intervaller med den krydsreaktive Ck/Penn-virus.
- 15 Der blev igen ikke påvist HI-antistoffer før udfordringen. Ikke desto mindre var fuglene beskyttet i mere end 4 måneder.

- Den af vFP-11 udtrykte H5 inducerer ligeledes et beskyttende immunrespons i kalkuner. Udvlede hvide kalkuner blev i alderen 2 dage og 4 uger vaccineret ved vingevævsinokulering som tidligere beskrevet. Resultaterne er vist i tabel X.
- 20

TABEL XBeskyttelse af kalkuner formidlet af H5-HA udtrykt i vFP-11

Vaccine	Fuglenes alder	Beskyttelse Syg/død/total	Påvisning af Trachea	virus Kloak	Neutraliserende HI-antistof Ty/lre		antistof log ₁₀ mod Ty/lre	
					Efter 1	Efter 2	Efter 1	Efter 2
vPF-11 rekombinant	2 dage	1/1/5	5/5	3/5	<10	160	<1	4,32
	4 uger	2/1/6	2/6	0/6	<10	640	1,05	4,16
Kontakt- kontroller	2 dage	2/2/2	2/2	2/2	<10	døde	<1	døde
	4 uger	2/2/2	2/2	2/2	<10	døde	<1	døde

Der observeredes signifikant overlevelse imod udfordring med den homologe Ty/lre-virus i begge aldersgrupper. Ikke-vaccinerede kontakt-kontrolfugle opholdt sig sammen med de vaccinerede fugle til afprøvning af spredningen af den rekombinante virus. Disse fugle overlevede ikke udfordring.

5

EKSEMPEL 11 - Konstruktion af fjerkræpox-virus FP-1 rekombinant vFP-12, der udtrykker kyllingeinfluenza nukleoprotein (NP) gen

- 10 Plasmid pNP33 indeholder en cDNA-klon af influenzaviruset Chicken/Pennsylvania/1/83 nukleoproteingenet (NP). Kun 5'- og 3'-enderne af det ca. 1,6 kbp NP-gen er blevet sekventeret. NP blev i form af et 5'-ClaI-XhoI-3'-fragment med stumpe ender flyttet fra pNP333 over i SmaI-nedbrudt pUC9, med pUC9's EcoRI-sted i 3'-enden, hvilket frembragte pRW714.
- 15 Translationsinitieringscodonen (ATG) i NP indeholder følgende understregede Ahall-sted: ATGGCGTC. Den tidligere beskrevne vaccinia-H6-promotor blev forbundet med NP med et dobbeltstrengt syntetisk oligonukleotid. Det syntetiske oligonukleotid indeholdt H6-sekvensen fra EcoRV-stedet til sit ATG og ind i NP-kodesekvensen i Ahall-stedet. Oligo-
- 20 nukleotidet blev syntetiseret med BamHI- og EcoRI-kompatible ender til indsættelse i pUC9 til frembringelse af pRW755. Startende i den BamHI-kompatible ende, med ATG understreget, er sekvensen for det dobbeltstrengede syntetiske oligonukleotid:

25 GATCCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCGTCG
 GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACCGCAGCTTAA

- Det lineære delvist Ahall-nedbrudte produkt af pRW755 blev isoleret og genskåret med EcoRI. pRW755-fragmentet, indeholdende en enkelt Ahall-
- 30 skæring ved ATG og genskåret med EcoRI, blev isoleret, behandlet med

phosphatase og brugt som vektor for pRW714-nedbrydningsproduktet nedenfor.

Det isolerede lineære delvist Ahall-nedbrudte produkt af pRW714 blev
5 genskåret med EcoRI. Et isoleret Ahall-EcoRI-fragment på ca. 1,6 kbp
indeholdende NP-kodesequensen blev indsat i den ovennævnte pRW755
vektor til dannelse af pRW757. Den fuldstændige H6-promotor blev dannet
ved at tilføje sekvenserne opstrøms (5') for EcoRV-stedet. Plasmidet
pRW742B (beskrevet i eksempel 4) fik H6-sekvensen nedstrøms (3') for
10 EcoRV-stedet fjernet sammen med sekvenser hen til pUC9's NdeI-sted.
pRW742B EcoRV-NdeI-fragmentet, der var behandlet med phosphatase,
blev anvendt som en vektor for pRW757-fragmentet nedenfor. Det isolerede
lineære partielle EcoRV-nedbrydningsprodukt af pRW757 blev genisolert
efter NdeI-nedbrydning; dette fragment indeholder H6-promotoren fra
15 EcoRV-stedet gennem NP til pUC9's NdeI-sted. pRW757-fragmentet blev
indsat i pRW742B-vektoren til dannelse af pRW758. EcoRI-fragmentet fra
pRW758, indeholdende det fuldstændige H6-promoterede NP, blev gjort
stump-endet med Klenow-fragmentet fra DNA-polymerase I og indsat i
HincII-stedet af pRW731.13 til dannelse af pRW760. HincII-stedet i
20 pRW731.13 er FP-1-locuset anvendt i eksempel 6 til konstruktion af vFP-6 og
vFP-7.

Ved brug af fjerkræpox FP-1 som det reddende virus, blev plasmid pRW760
anvendt i en in vitro rekombinationsafprøvning. Afkom af plakker blev prøvet
25 og plakoprenset under anvendelse af in situ plakhybridisering. Udtrykkelse af
genet er blevet bekræftet ved immunpræcipiteringsstudier under anvendelse
af et polyklonalt anti-NP-antiserum fra ged. Størrelsen af proteinet, der speci-
fikt præcipiterede fra et lysat af vFP-12-inficerede CEF-celler, var ca. 55 kD,
hvilket ligger inden for den beskrevne størrelsesorden for influenzavirus-
30 nukleoproteiner.

EKSEMPEL 12 - Fremstilling af en fjerkræpox-virus dobbelt rekombinant, vFP-15, der udtrykker generne for fugleinfluenza nukleoproteinet (NP) og hæmagglutinin (HA)

- 5 Hæmagglutinin (HA) genet fra A/Tyr/Ire/1378/83 er tidligere beskrevet ved konstruktionen af vFP-11 (eksempel 9). For at fremstille en dobbelt rekombinant blev HA-genet først flyttet til locus f8, der tidligere er defineret ved konstruktionen af vFP-8, under anvendelse af plasmid pRW731.15.
- 10 Til konstruktion af vFP-11 anvendtes plasmidet pRW759. Hæmagglutinin-genet koblet til H6-promotoren blev fjernet fra dette plasmid ved en delvis PstI-nedbrydning. Dette fragment blev gjort stump-endet med Klenow-fragmentet fra DNA-polymerase I og indsat i det stump-endede BamHI-sted i pRW731.15 til dannelse af pRW771.
- 15 Plasmid pRW771 blev derpå anvendt i en in vitro rekombinationsafprøvning ved brug af vFP-12 som det reddende virus. Det rekombinante vFP-12-virus indeholder nukleoproteingenet koblet til H6-promotoren i locus f7 i plasmid pRW731.13. Rekombinante plakker, der nu indeholdt begge indsættelser,
- 20 blev selekteret og plakoprenset ved in situ hybridisering og overfladeudtrykkelse af hæmagglutininet, bekræftet ved en protein-A- β -galactosidase-koblet immunprøvning. Udtrykkelse af begge gener blev bekræftet ved immunpræcipitering fra lysater af celler inficeret med det dobbelt rekombinante virus, vFP-15.

25

EKSEMPEL 13 - Konstruktion af rekombinant kanariepox-vira

- Det følgende eksempel viser identificering af fire ikke-essentielle indsættelsesloci i kanariepox-genomet og konstruktionen af fire
- 30 rekombinante kanariepox-vira, vCP-16, vCP-17, vCP-19 og vCP-20.

Det rekombinante kanariepox vCP-16 blev konstrueret påfølgende måde.

Et PvuII-fragment af kanariepox-DNA på 3,4 kbp blev klonet ind i pUC9 til dannelse af pRW764.2. Der blev fundet et unikt EcoRI-sted beliggende asymmetrisk inde i fragmentet med en kort arm på 700 bp og en lang arm på 2,7 kbp. Plasmidet blev nedbrudt med EcoRI og gjort stump-endet under anvendelse af Klenow-fragmentet fra DNA polymerase I. Det stump-endede H6/rabies-G-gen blev derpå ligeret ind i dette sted og anvendt til transformation af *E. coli*. Det resulterende plasmid, pRW775, blev brugt ved en in vitro afprøvning for rekombination. Afkom af plakker, der var positive ved en immunscreening, blev selekteret og plakoprenset. Den resulterende rekombinant blev designeret vCP-16, og indsættelseslocuset designeredes C3.

Plasmidet pRW764.2, anvendt ved ovennævnte konstruktion, indeholdt også et unikt BglII-sted ca. 2,4 kbp fra EcoRI-stedet. Ved brug af den samme kloningsstrategi blev H6/rabies-G-genet ligeret ind i plasmid pRW764.2 på dette sted til dannelse af pRW774. Dette plasmid blev anvendt til konstruktion af rekombinant vCP-17 med indsættelseslocuset designeret C4.

Plasmid pRW764.5 indeholder et PvuII-fragment af kanariepox-DNA på 850 bp med et unikt BglII-sted beliggende assymmetrisk inde i fragmentet 400 bp fra den ene terminus. Ved brug af den samme kloningsstrategi som før beskrevet blev det til H-6-promotoren koblede rabies-G-gen indsat på dette sted til dannelse af pRW777. Det dannede stabile rekombinant virus blev designeret vCP-19 og indsættelseslocuset designeredes C5.

Plasmid pRW764.7 indeholder et PvuII-fragment på 1,2 kbp med et unikt BglII-sted 300 baser fra den ene terminus. Plasmidet blev nedbrudt med BglII og gjort stump-endet med Klenow-fragmentet fra DNA polymerase I. Det stump-endede 11K-promoterede Lac Z-gen blev indsat til dannelse af plasmid pRW7778. Det stabile rekombinant virus dannet ved anvendelse af

dette plasmid blev designeret vCP-20 og indsættelseslocuset designeredes C6.

EKSEMPEL 14 - Konstruktion af en fjerkræpox-virus rekombinant, vFP-29, der udtrykker fusionsproteinet for Newcastle disease virus

Plasmid pNDV108, cDNA-klonen fra fusionsgenet fra NDV Texas-stamme, bestod af et HpaI cDNA-fragment på ca. 3,3 kbp indeholdende kodesekvensen for fusionsproteinet såvel som yderligere NDV-kodesekvenser klonet ind i Scal-stedet i pBR322. Trinene til dannelse af indsættelsesplasmidet er beskrevet nedenfor.

(1) Dannelse af plasmid pCE11

Der blev konstrueret en FPV-indsættelsesvektor, pCE11, ved indsættelse af polylinkere i HincII-stedet af pRW731.13 (designeret som locus f7). pRW731.13 indeholder et 5,5 kbp PvuII-fragment af FP-1 DNA. Et ikke-essentielt locus var før blevet defineret i HincII-stedet ved konstruktion af den stabile rekombinant vFP-6, beskrevet i eksempel 6. Polylinkerne indsat i HincII-stedet indeholder steder for følgende restriktionsenzymmer: NruI, EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, HincII, Sall, AccI, PstI, SphI, HindIII og HpaI.

(2) Dannelse af plasmid pCE19

Dette plasmid er en videre modifikation af pCE11, hvori transkriptionsstop-signalet ATTTTNT fra vaccinia-virus (L. Yuen og B. Moss, J. Virology 60:320-323 [1986]) (hvor N i dette tilfælde er et A) er blevet indsat mellem SacI- og EcoRI-stedene af pCE11, med efterfølgende tab af EcoRI-stedet.

(3) Indsættelse af NDV-kodesekvenser

Et geloprenset BamHI-fragment på 1,8 kbp, indeholdende alle med undtagelse af 22 nukleotider fra 5'-enden af fusionsproteingenet, blev indsat i
5 BamHI-stedet af pUC18 til dannelse af pCE13. Dette plasmid blev nedbrudt med Sall, der skærer i vektoren 12 baser opstrøms fra 5'-enden af kodesekvensen. Enderne blev udfyldt med Klenow-fragmentet fra DNA polymerase I, og plasmidet blev yderligere nedbrudt med HindIII, der skærer 18 baser opstrøms fra Sall-stedet. Et geloprenset SmaI-HindIII-fragment på
10 146 bp, indeholdende vacciniavirus-H-promotoren, der tidligere er beskrevet i foretrukne udførelsesformer, såvel som polylinker-sekvenser ved hver terminus, blev ligeret til vektoren og transformeret ind i celler af E. coli. Det resulterende plasmid blev designeret pCE16.

15 For at bringe den initierende ATG-codon af NDV-fusionsproteingenet på linje med 3'-enden af H6-promotoren og for at erstatte de 22 nukleotider, der mangler i NDV-5'-enden i pCE16, blev der skabt komplementære syntetiske

oligonukleotider, der ender i EcoRV- og KpnI-steder.
20 Oligonukleotidsekvensen var
5' ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-GGC-TCC-AGA-TCT-TCT-
ACC-AGG-ATC-CCG-GTA-C 3'.

pCE16-konstruktionen blev derpå nedbrudt med EcoRV og KpnI. EcoRV-stedet findes i H6-promotoren 24 baser opstrøms for det initierende ATG.
25 KpnI-stedet findes i NDV-kodesekvensen 29 baser nedstrøms for ATG.

Oligonukleotider blev sammensmeltet, phosphoryleret og ligeret til det lineariserede plasmid, og det resulterende DNA anvendtes til transformation
30 af E. coli-celler. Dette plasmid blev designeret pCE18.

For at indsætte NDV-kodesekvensen i en FPV-indsættelsesvektor, blev et geloprenset Smal-HindIII-fragment på 1,9 kbp fra pCE18 (skærende i polylinker-området) ligeret til et Smal-HindIII-fragment på 7,8 kbp fra pCE19, de er beskrevet ovenfor. Transkriptionsstop-signalet findes 16 baser nedstrøms for Smal-stedet. Det resulterende plasmid blev designeret pCE20.

Plasmidet pCE20 blev brugt ved en in vitro afprøvning for rekombination under anvendelse af fjerkræpox-virus FP-1 som redningsvirus. Det resulterende afkom blev udpladet på CEF-monolag og plakkerne underkastet en β -galactosidase-koblet protein-A-immunundersøgelse under anvendelse af et polyklonalt anti-NDV-kyllingeserum. Positivt farvede plakker blev selekteret og underkastet fire omgange plakoprensning for at opnå en homogen population. Rekombinanten blev designeret vFP-29.

15 EKSEMPEL 15 - Konstruktion af avipox-virus-rekombinanter, der udtrykker kappe (env) glycoproteinet fra katteleukæmivirus (FeLV)

FeLV-env-genet indeholder sekvenserne, der koder for p70 + p15E polyproteinet. Dette gen blev indledningsvis indsat i plasmidet pSD467vC med vaccinia-promotoren H6 5' sidestillet med FeLV-env-genet. Plasmidet pSD467vC afledtes ved først at indsætte et Sall/HindIII-fragment på 1802 bp indeholdende vaccinia-hæmagglutinin (HA) genet i en pUC18-vektor. Beliggenheden af HA-genet er før defineret (Shida, Virology 150:451-462 [1988]). Størstedelen af den åbne læseramme, der koder for HA-genproduktet, blev deleteret (nukleotid 443 til og med nukleotid 1311) og der indsattes et multipelt kloningssted indeholdende BglII-, Smal-, PstI- og EagI-restriktionsendonuklease-steder. Det resulterende pSD467vC-plasmid indeholder flankerende vaccinia-arme på 442 bp opstrøms fra det multiple kloningssted og 491 bp nedstrøms fra disse restriktionssteder. Disse flankerende arme gør det muligt for genetisk materiale indsat i den multiple

kloningsregion at blive rekombineret ind i HA-regionen af Copenhagen-stammen af vacciniavirus. Det resulterende rekombinante afkom er HA-negativt.

- 5 H6-promotoren blev syntetiseret ved sammensmeltning af fire overlappende oligonukleotider, der tilsammen udgør den komplette sekvens beskrevet ovenfor under foretrukne udførelsesformer. Det resulterende 132 bp fragment indeholdt et BglII-restriktionssted i 5'-enden og et SmaI-sted i 3'-enden. Dette blev indsat i pSD467vC via BglII-og SmaI-restriktionsstedet.
- 10 Det resulterende plasmid designeredes pPT15. FeLV-env-genet blev indsat i det unikke PstI-sted i pPT15, der ligger umiddelbart nedstrøms for H6-promotoren. Det resulterende plasmid designeredes pFeLV1A.

- 15 Til konstruktion af FP-1-rekombinanten, blev H6/FeLV-env-sekvenserne på 2,4 kbp skåret ud af pFeLV1A ved nedbrydning med BglII og delvis nedbrydning med PstI. BglII-stedet ligger ved 5'-grænsen af H6-promotorsekvensen. PstI-stedet er beliggende 420 bp nedstrøms fra translationsterminerings-signalet for kappe-glycoproteinets åbne læseramme.

- 20 H6/FeLV-env-sekvensen på 2,4 kbp blev indsat i pCE11 nedbrudt med BamHI og PstI. FP-1-indsættelsesvektoren, pCE11, var afledt fra pRW731.13 ved indsættelse af et multipelt kloningssted i det ikke-essentielle HincII-sted. Denne indsættelsesvektor tillader udvikling af FP-1-rekombinanter indeholdende fremmede gener i FP-1-genomets locus f7. Det rekombinante
- 25 FP-1/FeLV-indsættelsesplasmid blev derpå designeret pFeLVFI. Denne konstruktion tilvejebringer ikke et perfekt ATG til ATG-substituering.

- For at opnå den perfekte ATG:ATG-konstruktion, blev et NruI/SstII-fragment på ca. 1,4 kbp afledt fra vacciniavirus-indsættelsesvektoren pFeLV1C. NruI-stedet forekommer inde i H6-promotoren på en position 24 bp opstrøms fra
- 30 ATG. SstII-stedet er beliggende 1,4 kbp nedstrøms fra ATG og 1 kbp

opstrøms fra translationsterminerings-signalet. Dette NruI/SstII-fragment blev ligeret til et 9,9 kbp fragment, der var frembragt ved nedbrydning med SstII og ved delvis nedbrydning med NruI. Dette 9,9 kbp fragment indeholder de 5,5 kbp af FP-1-flankerende arme, pUC-vektorsekvenser, 1,4 kbp af FeLV-sekvens svarende til den nedstrøms del af env-genet, og sekvensen nærmest 5'-enden (ca. 100 bp) af H6-promotoren. Det resulterende plasmid blev designeret pFeFLVF2. ATG'et til ATG-konstruktion blev bekræftet ved nukleotidsekvensanalyse.

- 10 En yderligere FP-1-indsættelsesvektor, pFeLVF3, blev afledt fra pFeLVF2 ved fjernelse af FeLV-env-sekvenserne svarende til det formodede immunsuppressive område (Cianciolo et al., Science 230:453-455 [1985]) (nukleotid 1548 til 1628 i kodesekvensen). Dette blev udført ved isolering af et SstII/PstI-fragment (steder beskrevet ovenfor) på ca. 1 kbp fra
- 15 vacciniavirus-indsættelsesvektoren pFeLV1D. Plasmidet pFeLV1D ligner pFeLV1C, bortset fra at env-sekvenserne svarende til det immunsuppressive område (nukleotid 1548 til 1628) var deleteret ved oligonukleotid-dirigeret mutagenese (Mandecki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7177-7181 [1987]). SstII/PstI-fragmentet på 1 kbp, der mangler nukleotiderne 1548 til 1628, blev
- 20 indsat i et 10,4 kbp SstII/PstI-fragment indeholdende det resterende H6/FeLV-env-gen afledt fra pFeLVF2.

Indsættelsesplasmiderne pFeLVF2 og pFeLVF3 blev anvendt ved in vitro rekombinations-afprøvninger med FP-1 som det reddende virus. Afkom fra

25 rekombinationen blev udpladet på CEF-monolag og rekombinant virus selekteret ved plakhybridisering på CEF-monolag. Rekombinant afkom, identificeret ved hybridiseringsanalyser, blev selekteret og underkastet 4 runder plakoprensning for at opnå en homogen population. En FP-1-rekombinant, husende det fuldstændige FeLV-env-gen, er blevet designeret

30 vFP-25, og en FP-1-rekombinant, indeholdende det fuldstændige gen manglende det immunsuppressive område, blev designeret vFP-32. Begge

rekombinanter er ved immunpræcipitering under anvendelse af et bovint anti-FeLV polyklonalt serum (Antibodies, Inc., Davis, CA) vist at udtrykke det passende genprodukt. Det er bemærkelsesværdigt, at disse FP-1-rekombinanter udtrykker det fremmede FeLV-env-gen i CRFK-cellelinjen (ATCC #CCL94), som stammer fra katte.

Til konstruktion af kanariepox (CP) rekombinanter blev et 2,2 kbp fragment indeholdende H6/FeLV-env-sekvenserne udkåret fra pFeLVF2 ved nedbrydning med SmaI og HpaI. SmaI-stedet ligger på 5'-grænsen af H6-promotorsekvensen. HpaI-stedet er beliggende 180 bp nedstrøms fra translationsterminerings-signalet for kappeproteinets åbne læseramme.

Den 2,2 kbp H6/FeLV-env-sekvens blev indsat i det ikke-essentielle EcoRI-sted i indsættelsesplasmidet pRW764.2, efter at EcoRI-stedet var gjort stump-endet. Denne indsættelsesvektor tillader dannelse af CP-rekombinanter indeholder fremmede gener i CP-genomets C4-locus. Det rekombinante CP-indsættelsesplasmid designeredes derpå pFeLVCP2. Denne konstruktion tilvejebringer et perfekt ATG til ATG substituering.

Indsættelsesplasmidet pFeLVCP2 blev anvendt ved en in vitro afprøvning for rekombination med CP som det reddende virus. Afkom af rekombinanterne blev udpladet på monolag af CEF og rekombinant virus selekteret ved hjælp af en β -galactosidase-koblet protein-A-immunundersøgelse under anvendelse af et bovint anti-FeLV kommercielt polyklonalt serum (Antibodies, Inc., Davis, CA). Positivt farvede plakker blev selekteret og underkastet fire omgange plakoprensning til opnåelse af en homogen population. En rekombinant, der udtrykker hele FeLV-env-genet, er blevet designeret vCP-36.

EKSEMPEL 16 - Konstruktion af fjerkræpox-virus-rekombinant vFP-22, der udtrykker det Rous-associerede virus type 1 (RAV-1) kappe (env) gen

- 5 Klonen penvRV1PT af RAV-1-kappegenet indeholder 1,1 kbp af RAV-1-env-DNA-kodesekvens, klonet ind i M13mp18 som et KpnI-SacI-fragment. Dette fragment er intakt i 5'-enden, men mangler en del af 3'-sekvensen, og blev anvendt ved de følgende operationer. Et geloprenset EcoRI-PstI-fragment på 1,1 kbp fra penvRV1PT blev indsat i EcoRI- og PstI-stederne i pUC9 til
- 10 dannelse af pRW756. Dette plasmid blev derpå nedbrudt med KpnI og HindIII, der skar i vektoren 59 baser opstrøms fra ATG. Der indsattes et KpnI-HindIII-fragment på 146 bp indeholdende den oven for beskrevne vaccinia-H6-promotor til dannelse af plasmid pCE6.
- 15 For at sikre, at det initierende ATG fra RAV env genet var beliggende ved siden af 3'-enden af H6-promotoren med fremmede sekvenser deleteret, blev to komplementære syntetiske oligonukleotider konstrueret med EcoRV- og BanII-steder i termini. Oligonukleotidsekvensen var
- 20 5'-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-AGG-CGA-GCC-3'.
- Plasmidet pCE6 blev nedbrudt med EcoRV, der skærer i H6-promotoren 24 baser opstrøms for ATG, og med BanII, der skærer i RAV-env-kodesekvensen 7 baser nedstrøms for ATG. DNA-segmenterne blev ligeret og anvendt til transformation af celler af E. coli. Det resulterende plasmid,
- 25 pCE7, tilførte slutkonstruktionen H6-promotoren og korrekt 5'-sekvens.
- Klonen mp19env (190) fandtes ved restriktionskortlægning at indeholde hele RAV-1 env genet. Et KpnI-SacI-fragment af mp19env (190) på 1,9 kbp indeholdende hele genet blev indsat i KpnI- og SacI-stederne af pUC18 til
- 30 dannelse af pCE3. Dette plasmid blev nedbrudt med HpaI, der skærer 132 baser nedstrøms fra det initierende ATG i kodesekvensen for RAV-1, og

SacI, der skærer ved genets 3'-terminus. FPV-indsættelsesvektoren pCE11, der før er beskrevet, blev nedbrudt med SmaI og SacI, hvilket skar plasmidet i polylinkerregionen. HpaI-SacI-fragmentet af pCE3 blev ligeret med pCE11 til dannelse af pCE14.

5

Plasmidet pCE7 blev derpå nedbrudt med XhoI og HindIII til dannelse af et fragment på 332 bp indeholdende H6-promotoren og korrekt 5'-sekvens. Plasmid pCE14 blev nedbrudt med HindIII, der skar i vektorens polylinker-region, og XhoI, der skar i kodesekvensen. Dette DNA ligeredes med HindIII-XhoI-fragmentet opnået fra pCE7, hvorved dannedes pCE15, der var den endelige RAV-1-kappeggen-konstruktion.

10

Dette plasmid blev brugt ved en in vitro afprøvning for rekombination med fjerkræpox FP-1 som redningsvirus. Afkom af rekombinationen blev udpladet på CEF-monolag og plakkerne underkastet en β -galactosidase-koblet protein-A-immunundersøgelse under anvendelse af et anti-RAV-1 polyklonalt serum. Positivt farvede plakker blev selekteret og underkastet fire omgange plakoprensning for at opnå en homogen population. Rekombinanten blev designeret vFP-22. Immunpræcipiteringsforsøg under anvendelse af cellelysater inficeret med vFP-22 har påvist specifik præcipitering af to proteiner med tilsyneladende molekylvægte på 76,5 kD og 30 kD, der svarer til kappeggenets to genprodukter. Der sås ikke noget prækursor-genprodukt.

15

20

Ved indledende forsøg er induceret et immunrespons på RAV-I-kappeggenprodukt i kyllinger inokuleret med vFP-22.

25

EKSEMPEL 17 - Konstruktion af avipox-virus rekombinanter, der udtrykker GP51.30 kappe (env) genet fra okseleukæmi-virus (BLV)

5 (1) Konstruktion af pBLVF1 og pBLVF2

Plasmiderne pBLVF1 og pBLVF2 indeholder gp51.30-env-genet fra BLV. I begge plasmider er BLV-env-genet under transkriptionel kontrol af H6-promotoren fra vacciniavirus og er klonet mellem flankerende arme af
10 fjerkræpox (locus f7). Nukleotidsekvensen af de to plasmider er identisk, undtagen i codonpositioner 268 og 269. (pBLVF1 koder for et protein indeholdende aminosyrerne Arg-Ser i disse to positioner, hvorimod pBLVF2 koder for et protein indeholdende aminosyrerne Gln-Thr).

15 pBLVF1 og pBLVF2 blev konstrueret ved følgende procedure. Plasmid pNS97-1, et plasmid indeholdende hele BLV-env-genet, blev skåret med BamHI og delvis skåret med MstII. Fragmentet på 2,3 kbp, indeholdende hele gp51.30 genet, blev isoleret på en agarosegel og de udragende ender udfyldt med E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment). Der blev derpå
20 ligeret PstI-linkere til enderne af fragmentet, som, efter nedbrydning med PstI, blev ligeret ind i PstI-stedet af pTP 15 (eksempel 15). Herved placeres BLV-genet ved siden af Vaccinia-H6-promotoren. (pTP15 indeholder Vaccinia-H6-promotoren klonet i et ikke-essentielt locus i vacciniagenomet).

25 Dette plasmid blev derpå skåret med EcoRV og delvis skåret med Avall. Fragmentet på 5,2 kbp blev isoleret og oligonukleotiderne 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCCCAAAGAACGACG-3' og 5'-GACCGTCGTTCTTTGGGCATTACGATACAACTTAACGGAT-3' anvendt til recirkularisering af plasmidet. Herved fjernes unødvendige baser mellem
30 BLV-genet og H6-promotoren.

Det resulterende plasmid blev skåret med PstI og delvis skåret med BglII, og 1,7 kbp fragmentet indeholdende det H6-promoterede BLV-gen klonedes ind i BamHI-PstI-stedet af pCE11, den tidligere beskrevne fjerkræpox-virus-ind-sættelsesvektor, under anvendelse af locus f7. Dette placerer det H6-
 5 promoterede BLV-gen mellem flankerende arme af fjerkræpox. Dette plasmid blev designeret pBLVF1.

Der blev anvendt en identisk procedure til konstruktion af pBLVF2 med undtagelse af, at et yderligere in vitro mutagenesettrin blev udført, før det H6-
 10 promoterede BLV-gen klonedes ind i pCE11. Denne mutagenese blev udført ved følgende procedure. Plasmid pNS97-1 blev skåret med XmaI og delvis skåret med StuI. Fragmentet på 5,2 kbp blev isoleret, og oligonukleotiderne 5'-CCGGGTCAGACAAACTCCCGTCGCAGCCCTGACCTTAGG-3' og 5'-CCTAAGGTCAGGGCTGCGACGGGAGTTTGTCTGAC-3'
 15 brugt til recirkularisering af plasmidet. Dette ændrer nukleotidsekvensen af codonerne 268 og 269 fra CGC-AGT til CAA-ACT.

(2) Konstruktion af rekombinant vira

20 Plasmiderne pBLVF1 og pBLVF2 blev anvendt ved en in vitro afprøvning for rekombination under anvendelse af FP-1 som redningsvirus. Rekombinant afkom blev selekteret ved in situ plakhybridisering, og når populationen ved dette kriterium blev bedømt som værende ren, blev plakkerne undersøgt ved en β -galactosidase protein-A-immunundersøgelse under anvendelse af en
 25 præparation af BLV-gp-specifikt monoklonalt antistof. Begge rekombinanter vFP23 og vFP24, dannet fra hhv. plasmid pBLVF1 og pBLVF2, udviste positiv farvning ved immunundersøgelsen, hvilket indikerede, at et immunologisk genkendeligt glycoprotein blev udtrykt på overfladen af de inficerede celler.

Plasmiderne pBLVK4 og pBLVK6 indeholder hhv. BLV-env-gp51.30-genet og BLV-gp51.30-cleavage-minus-genet. Begge gener er indklonet i det unikke EcoRI-sted af pRW764.2 (locus C3) (pRW764.2 er beskrevet i eksempel 13) og er under transkriptionskontrol af Vaccinia-H6-promotoren.

5

Plasmiderne opnåedes ved følgende procedure: pBLVF1 og pBLVF2 blev skåret med restriktionsenzymet HindIII. Oligonukleotidet BKL1 (AGCTTGAATTCA) blev klonet ind i dette sted, hvorved dannedes et EcoRI-sted 3' i forhold til BLV-genet. Da der også er et EcoRI-sted 5' i forhold til
10 BLV-genet, blev disse plasmider (pBLVK1 og pBLVK2) skåret med EcoRI, og fragmentet indeholdende det H6-promoterede BLV-gen blev klonet ind i EcoRI-stedet af pRW764.2. De resulterende plasmider blev designeret hhv. pBLVK4 og pBLVK6. Disse plasmider blev anvendt ved en in vitro afprøvning for rekombination med kanariepox som redningsvirus. Rekombinanter blev
15 udvalgt og oprenset på basis af overfladeudtrykkelse af glycoproteinet, vist ved en immunprøvning. Rekombinanterne blev designeret vCP-27 og vCP-28 fra hhv. plasmiderne pBLVK4 og pBLVK6.

Fjerkræpox-rekombinanter vFP-23 og vFP-24 er blevet inokuleret i får og
20 kvæg ved forskellige indgivelsesveje. Dyrene fik to inokuleringer, den anden 45 dage efter den første. Serumprøver blev taget 5 uger efter den første inokulering og to uger efter den anden inokulering. Antistof mod gp51 blev målt ved en kompetitiv ELISA-afprøvning og titeren udtrykt som den reciprokke af serumfortyndingen, hvilket giver en 50% reduktion af kompeti-
25 tion. Resultaterne er vist i tabel XI.

Ingen af de afprøvede arter udviste et påviseligt immunrespons efter den første inokulering. Både får og kvæg udviste en signifikant antistof-stigning efter den anden inokulering.

TABEL XI

Inokulering af får og kvæg med vFP-23 og vFP-24

5	<u>Dyr</u>		<u>Virus</u>	<u>Dosis og indgivelsesvej</u>		<u>ELISA</u>	<u>Titer</u>
				<u>Første</u>	<u>Anden</u>	<u>Første</u>	<u>Anden</u>
10	Kvæg	B56	FP-1	10^8+10^{8a}	10^8+10^8	0	0
		B59	FP-1	ID	subcut	0	0
	Får	M89	FP-1		0	0	
		M91	FP-1		0	0	
15	Kvæg	B62	vFP-23	10^8+10^8	10^8+10^8	0	200 ^b
		B63	vFP-23	ID	subcut	0	80
	Får	M83	vFP-23		0	80	
		M84	vFP-23		0	500	
		M85	vFP-23		0	100	
20	Kvæg	B52	vFP-24	10^8+10^8	10^8+10^8	0	200
		B53	vFP-24	ID	subcut	0	60
	Får	M87	vFP-24		0	200	
		M92	vFP-24		0	20	
		M93	vFP-24		0	20	

25 ^a Intradermale injektioner blev givet to steder

^b Titer udtrykt som den reciprokke af fortyndingen,
hvilket giver 50% kompetition.

30 EKSEMPEL 18 - Konstruktion af fjerkræpox-virus FP-1 rekombinant vFP-26, der udtrykker infektiøs-bronchitis-virus-Mass-41-matrixgenet

35 Plasmid pIBVM63 indeholder en infektiøs-bronchitis-virus (IBV) cDNA-klon af stamme Mass-41-matrixgenet. Et EcoRI-fragment på 8 kbp af pIBVM63 indeholder matrixgenet med peplomergen et opstrøms (5'), og videre opstrøms er der et EcoRV-sted. Plasmid pRW715 har en EcoRI-koblingssekvens, der forbinder de to PvuII-steder i pUC9. EcoRI-fragmentet på 8 kbp

fra pIBVM63 blev indsat i EcoRI-stedet i pRW715, hvorved dannedes pRW763. Plasmid pRW776 blev dannet til deletering af det 5'-beliggende EcoRI-sted i pRW763, hvilket efterlod et unikt EcoRI-sted nedstrøms (3') fra matrixgenet. Det isolerede lineære delvise EcoRI-nedbrydningsprodukt af pRW763 blev skåret igen med RcoRV. Det største fragment blev isoleret, gjort stump-endet med Klenow-fragmentet fra DNA polymerase I og selvligeret til dannelse af pRW776. Konstruktionen pRW776 har de fuldstændige IBV-peplomergener og IBV-matrixgener efterfulgt af et enkelt EcoRI-sted.

10

Kun 5'- og 3'-enderne af matrixgenet på ca. 0,9 kbp er blevet sekventeret. Begyndende ved den translationsinitierende codon (ATG) indeholder 5'-sekvensen af matrixgenet det følgende understregede RsaI-sted: ATGTCCAACGAGACAAATTGTAC. Den tidligere beskrevne H6-promotor blev forbundet til matrixgenet med et syntetisk oligonukleotid. Det syntetiske oligonukleotid indeholdt H6-sekvensen fra dens RcoRV-sted til ATG og ind i den matrix-kodende sekvens gennem det første RsaI-sted. Oligonukleotidet blev syntetiseret med BamHI- og EcoRI-kompatible ender til indsættelse i pUC9, hvorved dannedes pRW772. EcoRI-enden ligger 3' i forhold RsaI-stedet. Begyndende ved den BamHI-kompatible ende, med ATG understreget, er sekvensen af det dobbeltstrengede syntetiske oligonukleotid:

20

GATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCCAACGAGACAAATTGTACG
CGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAGGTTGCTCTGTTTAACATGCTTAA

25

Det lineære delvise RsaI-nedbrydningsprodukt af pRW772 blev isoleret og skåret igen med RcoRI. pRW772-fragmentet, indeholdende en enkelt skæring i det ovennævnte RsaI-sted og skåret igen med EcoRI, blev isoleret, behandlet med phosphatase og anvendt som en vektor for pRW776-nedbrydningsproduktet nedenfor.

30

Det isolerede lineære delvise RsaI-nedbrydningsprodukt af pRW776 blev skåret igen med RcoRI. EcoRI ligger lige efter 3'-enden af matrixgenet. Et isoleret RsaI-EcoRI-fragment på ca. 0,8 kbp, indeholdende matrix-kodesequensen fra det ovennævnte RsaI-sted, blev indsat i ovennævnte pRW772-vektor til dannelse af pRW783. Den fuldstændige H6-promotor blev dannet ved tilføjelse af sekvenser 5' i forhold til EcoRV-stedet. H6-promotorens 5'-ende var et Hinfl-sted, der var stump-endet ind i pUC9's Sall-sted, hvorved dannedes et EcoRI-sted; 5' i forhold til H6-promotoren ligger pUC9's HindIII-sted. HindIII-EcoRV-fragmentet indeholdende 5' H6-promotoren blev indsat mellem HindIII- og EcoRV-stederne i pRW783 til dannelse af pRW786. pRW786's EcoRI-fragment, indeholdende det fuldstændige H6-promoterede matrixgen, blev gjort stump-endet med Klenow-fragment fra DNA-polymerase I og indsat i det stump-endede BamHI-sted i pRW731.15 (locus f8) til dannelse af pRW789. pRW731.15-BamHI-stedet er det FP-1-locus, der i eksempel 6 bruges til konstruktion af vFP-8.

Plasmid pRW789 blev anvendt ved konstruktionen af vFP-26. Rekombinante plakker blev selekteret og behandlet ved in situ plakhybridisering.

20

Ved indledende afprøvninger er induceret et immunrespons mod IBV-matrixproteinet i kyllinger inokuleret med vFP-26.

EKSEMPEL 19 - Konstruktion af fjerkræpox-virus FP-1 rekombinant vFP-31, der udtrykker infektiøs-bronchitis-virus (IBV) peplomer

25

Infektiøs-bronchitis-virus (IBV) Mass-41 cDNA-klon pIBVM 63 og dens subklon pRW776 er blevet beskrevet ved konstruktionen af vFP-26 i eksempel 18. Subklon pRW776 indeholder IBV-peplomergenets på 4 kbp efterfulgt af matrixgenet med et unikt EcoRI-sted i 3'-enden. Kun 5'- og 3'-

30

enderne af IBV-peplomergenets på ca. 4 kbp er blevet sekventeret. Et unikt XbaI-sted adskiller de to gener. 5'-enden af peplomergenets, der starter ved translationsinitieringscodonen (ATG), indeholder det følgende understregede RsaI-sted:

- 5 ATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTGTAC. Den tidligere beskrevne H6-promotor blev forbundet med peplomergenets ved et syntetisk oligonukleotid. Det syntetiske oligonukleotid indeholder H6-promotorsekvensen fra Nrul-stedet til ATG og ind i den peplomer-kodende sekvens gennem det første RsaI-sted. Oligonukleotidet blev syntetiseret med
- 10 BamHI- og EcoRI-kompatible ender til indsættelse i pUC9, hvorved dannedes pRW768. EcoRI-enden ligger 3' i forhold RsaI-stedet. Begyndende ved den BamHI-kompatible ende, med ATG understreget, er sekvensen af det dobbeltstrengede syntetiske oligonukleotid:

GATCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTTGGTAACACCTCTT

- 15 **AGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAACCATTGTGGAGAA**

TTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTACG

AATGATCACTGAGGAAACACACATGCTTAA

- 20 Det isolerede lineære delvise RsaI-nedbrydningsprodukt af pRW768 blev skåret igen med EcoRI. pRW768-fragmentet, indeholdende en enkelt skæring i det ovennævnte RsaI-sted og skåret igen med EcoRI blev isoleret, behandlet med phosphatase og anvendt som en vektor for pRW776-nedbrydningsproduktet nedenfor.

25

Det isolerede lineære delvise RsaI-nedbrydningsprodukt af pRW776 blev skåret igen med RcoRI. pRW776 fragmentet på 5 kbp, indeholdende en enkelt skæring i det ovennævnte RsaI-sted, til EcoRI-stedet blev isoleret; fragmentet indeholder IBV-sekvenser fra ovennævnte peplomer-RsaI-sted til

30 EcoRI-stedet i 3'-enden af matrixgenet. Indsættelse af pRW776-fragmentet i ovennævnte pRW768-vektor frembragte pRW788. Matrixgenet blev fjernet

ved det oven for fremhævede XbaI-sted. 5' H6-promotoren blev indføjet i Nrul-stedet ved indsættelse af det stump-endede pRW788-Nrul-BbaI-fragment på 5 kbp i den stump-endede pRW760 Nrul-BamHI-vektor til frembringelse af pRW790. Vektoren pRW760 er beskrevet i eksempel 11; kort beskrevet er det et Vaccinia-H6-promoteret influenza-nukleoprotein flankeret af det ikke-essentielle FP-1 locus f7. pRW760-vektoren blev fremstillet ved at fjerne 3' H6-sekvenserne fra Nrul-stedet til enden af nukleoproteinet ved BamHI. pRW790 er H6-promoteret IBV-peplomer i HincII-stedet af pRW731.13. Rekombination af donorplasmidet pRW790 med FP-1 resulterede i vFP-31. Immunpræcipiteringsforsøg med anvendelse af CEF-lysater fremstillet fra celler inficeret med vFP-31 har vist specifik præcipitering af en lille mængde prækursorprotein med en molekylvægt på ca. 180 kD og af kløvningsprodukterne på 90 kD.

EKSEMPEL 20 - Konstruktion af fjerkræpox-virus FP-1-rekombinant vFP-30, der udtrykker herpes simplex-virus-gD

Herpes simplex-virus (HSV) type-1-stamme-KOS-glycoprotein-D-gen (gD) blev klonet ind i pUC9 BamHI-stedet som et 5' BamHI koblet HpaII til 3' BamHI koblet Nrul fragment; med 5'-enden ved siden af pUC9's PstI-sted. 5'-sekvensen af HSV-gD, begyndende ved translationsinitieringscodonen (ATG), indeholder følgende understregede NcoI-sted:

ATGGGGGGGGCTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTCGTCATAGTGGG CCTCCATGG. Den tidligere beskrevne Vaccinia-H6-promotor blev forbundet med HSV-gD-genet ved et syntetisk oligonukleotid. Det syntetiske oligonukleotid indeholder 3'-delen af H6-promotoren fra Nrul til ATG ind i gD-kodesekvensen til NcoI-stedet. Oligonukleotidet blev syntetiseret med en 5'-PstI-kompatibel ende. gD-klonen i pUC9 blev skåret med PstI og NcoI, og 5'-HSV-sekvensen fjernet til udskiftning med det syntetiske oligonukleotid, hvorved dannedes pRW787. Sekvensen af det dobbeltstrengede syntetiske oligonukleotid er:

GTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGAGGTGCCG-
ACGTCAGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACCCTCCACGGC-

5

CAGCTAGATTAGGTGCTGTTATTTTATTTGTAGTTATAGTAGGACTC
GTCGATCTAATCCACGACAATAAAATAAACATCAATATCATCCTGAGGTAC

Nedbrydning af pRW787 med NruI og BamHI frembringer et fragment på ca.
10 1,3 kbp indeholdende 3'-H6-promotoren fra NruI-stedet, gennem HSV-gD-
kodesequensen til BamHI-stedet. pRW760-vektoren, skåret med NruI og
BamHI, er beskrevet i eksempel 11. Indsættelse af 1,3 kbp-fragmentet i
pRW760-vektoren førte til pRW791. pRW791-vektoren indeholder det
fuldstændige vaccinia-H6-promoterede HSV-gD-gen i det ikke-essentielle
15 FP-1-HincII-sted i pRW731.13 (locus f7).

Rekombination af donorplasmidet pRW791 med FP-1 resulterede i vFP-30.
Overfladeudtrykkelse af glycoproteinet blev påvist i rekombinante plakker
under anvendelse af en β -galactosidase-koblet protein-A-immunprøvning og
20 HSV-1-specifikke sera.

EKSEMPEL 21 - Anvendelse af entomopox-promotorer til regulering af
udtrykkelse af fremmede gener i pox-virus-vektorer

25 (a) Baggrund. Poxvira fra insekter (entomopox) klassificeres for øjeblikket i
underfamilien Entomopoxvirinae, der yderligere underopdeles i tre slægter
(A, B og C) svarende til entomopoxvira isoleret fra insektordnerne, hhv.
Coleoptera, Lepidoptera og Orthoptera. Entomopox-vira har et snævert
værtområde i naturen og er ikke kendt for at replikere i nogen vertebratarter.

30

Entomopox-viruset anvendt ved disse forsøg var oprindeligt isoleret fra inficerede larver af *Amsacta moorei* (Lepidoptera: arctidae) fra Indien. (Roberts og Granados, J. Invertebr. Pathol. 12:141-143 [1968]). Viruset, designeret AmEPV, er typearten for slægt B.

5

Vildtype AmEPV blev opnået fra Dr. R. Granados (Boyce Thompson Institute, Cornell University) som infektiøs hæmolymfe fra inficerede larver af *Estigmene acrea*. Viruset fandtes at replikere i en invertebrat-cellelinje, IPLB-LD652Y, afledt fra ovarievæv hos *Lymantria dispar* (gypsy moth) (beskrevet af Goodwin et al., In Vitro 14:485-494 [1978]). Cellerne blev dyrket i IPL-528-medier suppleret med 4% føtal kalve- og 4% kyllingesera ved 28 °C.

10

Vildtype-viruset blev plakprøvet på LD652Y-celler, og én plak, designeret V1, blev udvalgt til videre forsøg. Dette isolat danner sent i infektionscyklussen talrige okklusionslegemer (occlusion bodies - OB) i cytoplasmaet af de inficerede celler.

15

(b) Promotor-identifikation. Identifikationen og kortlægningen af en AmEPV-promotor blev opnået på følgende måde. Totalt RNA fra sent inficerede LD652Y-celler (48 timer efter infektion) blev isoleret og brugt til fremstilling af ³²P-mærket førstestrengs-cDNA. cDNAet blev derpå anvendt til probeundersøgelse af aftryk indeholdende restriktionsnedbrydningsprodukter af AmEPV-genomet. Denne Southern blot afslørede et stærkt signal på et ClaI-fragment på 2,6 kbp, hvilket indikerede, at fragmentet kodede for et stærkt udtrykt gen. Fragmentet blev klonet ind i en plasmidvektor og dets DNA-sekvens bestemt.

20

25

Analyse af sekvensdataene afslørede en åben læseramme i stand til at kode for et 42 kD polypeptid. In vitro translation af det totale RNA 48 timer efter infektion og adskillelse af produkterne ved SDS-PAGE afslørede et polypeptid på ca. 42 kD.

30

(c) Konstruktion af et rekombinant vacciniavirus med udtrykkelse af et fremmed gen under entomopox-promotorens kontrol. Til bestemmelse af, om en entomopox-promotor ville fungere i et vertebrat-poxvirus-system, blev det følgende plasmid konstrueret. Der blev kemisk syntetiseret et oligonukleotid indeholdende de 107 baser beliggende i 5'-retningen fra 42K-gen-translationsstartsignalet (herefter betegnet AmEPV-42K-promotoren), flankeret af et BglII-sted i 5'-enden og de første 14 baser af området kodende for hepatitis-B-virus-præ-S2, der ender i et EcoRI-sted, i 3'-enden. AmEPV-42K-promotorsekvensen er beskrevet nedenfor.

TCAAAAAAATATAAATGATTCACCATC
 TGATAGAAAAAAATTTATTGGGAAGA
 ATATGATAATATTTTGGGATTTCAA
 ATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATG

AmpEPV-42K-promotoren blev ligeret til hepatitis B-virus-overfladeantigenet (HBVsAg) som følger. Der konstrueredes et pUC-plasmid indeholdende hepatitis B-overfladeantigenet og det præ-S2-kodende område (type ayw beskrevet af Galibert et al., Nature 281:646-650 [1979]) flankeret af vaccinia-virus-arme i det ikke-essentielle område af vaccinia-virus-genomet, der koder for hæmagglutinin (HA) molekylet (HA-arme beskrevet i eksempel 15; HA-område beskrevet af Shida, Virology 150:451-462 [1962]). Oligonukleotidet beskrevet ovenfor blev indsat i dette plasmid ved at anvende det unikke EcoRI-sted i det HBVsAg-kodende område og et unikt BglII-sted i HA-vaccinia-armen. Det resulterende rekombinante vaccinia-virus blev designeret vP547.

Udtrykkelse af den indsatte HBVsAg-kodesekvens under kontrol af entomopox-42K-promotoren blev bekræftet under anvendelse af en immunprøvning. Ækvivalente kulturer af den mammale cellelinje BSC-40 blev

- inficeret med parentalt vaccinia-virus eller rekombinant vP547. 24 timer efter infektion blev cellerne lyseret og lysatet i seriefortyndinger påført en nitrocellulosemembran. Membranen blev først inkuberet med et gede-anti-HBV-serum og derpå med ^{125}I -Protein A. Efter vaskning blev membranen eksponeret på en røntgenfilm. Der blev påvist positive signaler i kulturer inficeret med vP547, men ikke i kulturer inficeret med parentalt virus, hvilket indikerer genkendelse af AmEPV-42K-promotoren af vaccinia-virus i mammale celler.
- Disse resultater blev verificeret under anvendelse af en Ausria-prøvning (se eksempel 1 for detaljer) til påvisning af HBVsAg i inficerede mammale celler. Vaccinia-virus-rekombinanter indeholdende HBsAg-genet koblet til AmEPV-42K-promotoren eller vaccinia-virus-H6-promotoren blev anvendt til inficering af BSC-40-celler, og udtrykkelsesniveauet af sAg prøvet ved Ausria-afprøvningsmetoden. Som det ses i tabel XII, viser dataene, at udtrykkelsesniveauet af HBsAg ved anvendelse af 42K-promotoren var signifikant.

TABEL XII

Udtrykkelse af HBVsAg i rekombinant vaccinia-virus

	<u>Rekombinant virus</u>	<u>Promotor</u>	<u>Ausria P/N-forhold</u>
	vP410	Kontrol	1,0
25	vP481	H6	24,3
	vP547	42K	44,9

- Yderligere forsøg blev udført for at fastlægge den tidsmæssige faktor ved reguleringen af AmEPV-42K-promotoren i en vertebrat-poxvirus-baggrund. Ækvivalente kulturer af BSC-40 celler blev inficeret med vP547 i nærvær eller fravær af 40 µg/ml cytosinarabinosid, der er en DNA-repli-

kationsinhibitor, som derfor blokerer den virale transkription. Udtrykkelsesniveauer 24 timer efter infektion blev prøvet ved en Ausria-afprøvning. Resultaterne indikerede, at 42K-promotoren blev genkendt som en tidlig promotor i et vaccinia-virus-replikationssystem.

5

Bemærk at brugen af AmEPV-42K-promotoren til udtrykkelse af fremmede gener i et pattedyrsystem er klart forskellig fra brugen af *Autographa californica*-NPV-polyhedrin-promotoren til genudtrykkelse i invertebratsystemer (Luckow og Summers, *Biotechnology* 6:47-55 [1988]). Polyhedrin-promotoren genkendes ikke af transkriptionsapparatet i pattedyrceller (Tjla et al., *Virology* 125:107-117 [1983]). Anvendelsen af AmEPV-42K-promotoren i pattedyrceller repræsenterer den første gang, en insektvirus-promotor er blevet brugt til udtrykkelsen af fremmede gener i en ikke-insekt viral vektor i ikke-invertebratceller.

15

Til bestemmelse af, om avipoxvira også ville genkende 42K-entomopox-promotoren, blev følgende forsøg udført. Identiske kulturer af CEF-celler blev inokuleret med 10 pfu pr. celle af enten fjerkræpoxvirus, kanariepoxvirus eller vacciniavirus og samtidigt transfekteret med 25 µg af ét af følgende plasmider: 1) plasmid 42K.17 indeholdende HBV-præ-S₂ + sAg-kodesequensen koblet til 42K-promotoren eller 2) plasmid pMP15.spsP indeholdende den identiske HBVsAg-kodesequens koblet til den tidligere beskrevne vaccinia-virus-H6-promotor. Efter 24 timer blev kulturerne frosset, cellerne lyseret, og lysatet analyseret for tilstedeværelsen af HBVsAg under anvendelse af en Ausria-afprøvning. (se eksempel 1).

25

Resultaterne vist i tabel XIII skal anskues kvalitativt. De indikerer, at transkriptionsapparatet af både fjerkræpox og kanariepox er i stand til at genkende 42K-promotoren og tillade transkription af den koblede HBVsAg-kodesequens. Skønt udtrykkelsesniveauerne er lavere end de, der opnåedes

30

med vaccinia-virus-H6-promotoren, ligger niveauerne pænt over baggrunds-niveauer opnået med de negative kontroller.

TABEL XIII

5

Genkendelse af 42K-entomopox-promotor af avipoxvira

	<u>Virus</u>	<u>Promotor</u>	<u>P/N-forhold</u>
10	Fjerkræpox	42K H6	39,1 356,8
	Kanariepox	42K H6	90,2 222,2
15	Vaccinia	42K H6	369,4 366,9
20	Ingen	42K	7,8
	Ingen	H6	7,2
	Vaccinia	-	7,2

EKSEMPEL 22 - Immunisering med VCP-16 til beskyttelse af mus mod
udfordring med levende rabiesvirus

25

Grupper på tyve mus, 4 til 6 uger gamle, blev inokuleret under foden med 50 til 100 µl af en række fortyndinger af enten den ene eller den anden af to rekombinanter: (a) vFP-6, fjerkræpox-rabies-rekombinanten beskrevet i eksempel 6, og (b) vCP-16, kanariepox-rabies-rekombinanten beskrevet i eksempel 13.

30

Efter 14 dage blev 10 mus fra hver gruppe slået ihjel og serum opsamlet. Anti-rabies-titeren i serumet blev beregnet ved brug af en RFFI-afprøvning (beskrevet i eksempel 7). De tilbageværende 10 mus i hver gruppe blev udfordret ved intracerebral inokulering med CVS-stammen af rabies-virus

35

anvendt i eksempel 7. Hver mus modtog 30 μ l, svarende til 16 muse-LD₅₀. Efter 28 dage blev overlevende mus vurderet og den beskyttende dosis 50 (PD₅₀) beregnet. resultaterne er vist i tabel XIV.

- 5 Beskyttelsesniveauet for mus, fundet ved inokulering af vFP-6, bekræfter resultatet fundet efter inokulering af fjerkræpox-rekombinanten vFP-3 diskuteret i eksempel 7. Det beskyttelsesniveau, som fås ved inokulering af vCP-16, er betydeligt højere. På basis af den beregnede PD₅₀er kanariepox-rabies-rekombinanten 100 gange mere effektiv til beskyttelse mod rabies-udfordring end fjerkræpox-rabies-rekombinanten.

TABEL XIV

Beskyttende immunitet mod udfordring med rabies-virus
udløst af to avipox-rabies-rekombinanter

Fjerkræpox vFP-6			Kanariepox vCP-16			
	Inokulum-dosis	RFFI-titer	Overle-velses-forhold	Inokulum-dosis	RFFI-titer	Overle-velses-forhold
20	7,5 ^a	2,3 ^b	7/10	6,5	2,5	10/10
	5,5	1,8	5/10	4,5	1,9	8/10
	3,5	0,7	0/10	2,5	1,1	1/10
25	1,5	0,6	0/10	0,5	0,4	0/10
1 PD ₅₀ = 6,17			1 PD ₅₀ = 4,18			

a Virustitere udtrykt som log₁₀ TCID₅₀.

b RFFI-titer udtrykt som log₁₀ af højeste serumfortynding der giver over 50% reduktion i antallet af fluorescerende brønde i en RFFI-afprøvning.

EKSEMPEL 23 - Anvendelse af fjerkræpox-promotorelementer til udtrykkelse af fremmede gener

5 I. Identificering af fjerkræpox-genet, der koder for et genprodukt på 25,8 kiloDalton (kD)

Visualisering af proteiner til stede i fjerkræpox (FP-1) inficerede CEF-lysater, ved farvning af SDS-polyacrylamidgeler med Coomassie-blåt, afslørede en i stor mængde forekommende art med en tilsyneladende molekylvægt på 25,8 kD. Dette protein var ikke til stede i uinficerede cellelysater. Impulsforsøg med anvendelse af ³⁵S-methionin til radiomærkning af syntetiserede proteiner på specifikke tidspunkter efter infektion anskueliggjorde igen rigeligheden af det FP-1-inducerede protein og viste, at det syntetiseres fra 6 til 54 timer efter infektion. På sit højdepunkt udgør dette
15 FP-1-protein på 25,8 kD ca. 5% til 10% af totalt protein til stede i cellelysatet.

Den rigelige forekomst af det FP-1-inducerede 25,8 kD protein tydede på, at genet, der koder for dette genprodukt, reguleres af et stærkt FP-1-promotorelement. For at lokalisere dette promotorelement med henblik
20 på senere anvendelse ved udtrykkelsen af fremmede gener i pox-virus-rekombinanter, opnåedes en polysom præparation fra FP-1-inficerede CEF-celler 54 timer efter infektion. RNA blev isoleret fra denne polysome præparation og frembragte, når anvendt til at programmere et in vitro kanin-reticulocyt-translationssystem, fortrinsvis FP-1-proteinet på 25,8 kD.

25

Det polysome RNA blev også brugt som en skabelon for syntese af førstestrengs-cDNA under anvendelse af oligo (dT) 12-18 som en initiator. Førstestrengs-cDNAet blev anvendt som en hybridiseringssonde ved Southern blot-analyser med nedbrydningsprodukter af FP-1-genomet. Resultater fra disse hybridiseringsanalyser tydede på, at genet, der koder for 25,8
30 kD-proteinet, var indeholdt i et HindIII-fragment på 10,5 kbp. Dette

genomiske HindIII-fragment blev derefter isoleret og ligeret ind i en kommerciel vektor, pBS (Stratagene, La Jolls, CA), og klonen designeredes pFP23K-1. Yderligere hybridiseringsanalyser under anvendelse af førstestrengs-cDNAet til sondering af nedbrydningsprodukter af pFP23k-1
5 lokaliserede 25,8 kD-genet til et EcoRV-subfragment på 3,2 kbp. Fragmentet blev subklonet ind i pBS og designeret pFP23k-2.

Ca. 2,4 kbp af dette FP-1-EcoRV-fragment er blevet sekventeret ved Sanger dideoxy-kæddetermineringsmetoden (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
10 USA 74:5463-5467 [1977]). Analyse af sekvensen afslører en åben læseramme (open reading frame - ORF), der koder for et genprodukt med en molekyelvægt på 25,8 kD. In vitro transkription af denne ORF med bakteriofag T7 polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) i en pBS-vektor frembringer en RNA-art, som, når den anvendes til at programmere et in vitro kanin-reticulocyt-translationssystem (Promega Biotec, Madison, WI), giver en
15 polypeptid-art med en tilsyneladende molekyelvægt på 25,8 kD. I en SDS-polyacrylamidgel bevæger dette polypeptid sig sammen med det i stor mængde forekommende 25,8 kD-protein observeret i lysater fra FP-1-inficerede CEF-celler. Resultaterne tyder på, at dette er genet, der koder for
20 det rigeligt forekommende FP-1-inducerede genprodukt på 25,8 kD.

II. Anvendelse af opstrøms-promotorelementerne af FP-1-genet på 25,8 kD til udtrykkelse af katteleukæmivirus (FeLV) env-genet i rekombinanter af FP-1 og vaccinia.

25

Et EcoRV/EcoRI-fragment på 270 bp indeholdende det regulerende område (FP25.8K-promotor) for FP-1-genet på 28,5 kD og 21 bp af kodesekvensen for 25,8 kD-genet blev isoleret fra pFP23k-2. Nedenfor er vist nukleotidsekvensen af FP25.8K-promotorområdet anvendt til opnåelse af
30 pFeLV25.8F1 og pFeLV25.81A. Denne sekvens på 270 nukleotider udgør

249 nukleotider af området opstrøms for initieringscodonen (ATG) for 25,8 kD genproduktet og de første 21 bp af kodesequensen.

5' -GATATCCCCATCTCTCCAGAACAGCAGCATAGTGTTAGGACAATCATCTAA-
 5 TGCAATATCATATATGAATCTCACTCCGATAGGATACTTACCACAGCTATTATA-
 CCTTAATGTATGTTCTATATATTTAAAAACAGAAACAAACGGCTATAAGTTTAT-
 ATGATGTCTATATTATAGTGAGTATATTATAAGTATGCGGGAATATCTTTGATT-
 TAACAGCGTACGATTCGTGATAAGTAAATATAGGCAATGGATAGCATAAATGAA-
 TTC-3'

10

Dette fragment blev gjort stump-endet og derpå indsat i en SmaI-nedbrudt FP-1-indsættelsesvektor (pFeLVF1, se eksempel 15) indeholdende FeLV-env-sekvenserne. Denne indsættelsesvektor muliggjorde rekombination med f7-locuset af FP-1-genomet. Indsættelse af FP25.8K-promotorens opstrømssekvenser 5' i forhold til FeLV-env-genet, og med den rigtige orientering, blev bekræftet ved sekvensanalyse. Denne indsættelse giver ikke en nøjagtig substitution af ATG med ATG, men ATGet fra 25,8 kD-genet er ude af ramme med FeLV-env-ATGet, så der dannes ikke noget fusionsprotein. FP-1-indsættelsesplasmidet indeholdende FP25.8KD-promotoren opstrøms fra FeLV-env-genet blev designeret pFeLV25.8F1.

En lignende konstruktion blev fremstillet ved anvendelse af vacciniavirus-indsættelsesvektoren, pFeLV1A, husende FeLV-genet (se eksempel 15). H6-promotoren blev fjernet fra pFeLV1A ved nedbrydning med BglII og SmaI. Efter at BglII-restriktionsstedet var gjort stump-endet, blev det stump-endede 270 bp EcoRV/EcoRI-fragment indeholdende FP25.8K-promotoren indsat sidestillet 5' i forhold til FeLV-env-genet. Denne konstruktion blev bekræftet ved sekvensanalyse. Der er heller ikke en nøjagtig substitution af ATG med ATG i denne rekombinant, men ATGet fra 25,8 kD-genet er ikke i ramme med ATGet fra FeLV-genet. Vaccinia (Copenhagen-stamme)

30

indsættelsesvektoren, husende 25,8 kD-genets opstrømsområde sidestillet 5' i forhold til FeLV-genet, blev designeret pFeLV25.81A.

Indsættelsesplasmiderne pFeLV25.8F1 og pFeLV25.81A blev anvendt ved in vitro rekombination med FP-1 (pFeLV25.8F1) og Copenhagen-stammen af vacciniavirus (pFeLV25.81A) som de reddende vira. Afkom af rekombinationen blev udpladet på passende cellemonolag, og rekombinant virus valgt ved en β -galactosidase-koblet protein-A-immunprøvning og et bovin anti-FeLV-serum (Antibodies, Inc., Davis, CA). Foreløbige resultater tyder på, at FP25.8K-promotoren kan regulere udtrykkelsen af fremmede gener i poxvirus-rekombinanter.

EKSEMPEL 24 - Sikkerhed og virkningsfuldhed af vFP-6 og vCP-16 i fjerkræ

15

De to avipox-rekombinanter, vFP-6 og vCP-16 (beskrevet i eksemplerne 6 og 13), blev inokuleret i 18 dage gamle kyllingefostre, 1 dag gamle kyllinger og 28 dage gamle kyllinger, og fuglenes respons evalueret ved tre kriterier: 1) virkninger af vaccination på klækningsevne, vaccinationsreaktioner og dødelighed 2) induceret immunrespons mod rabies-glycoproteinet, og 3) induceret immunrespons mod fjerkræpox-antigener. De udførte forsøg er beskrevet nedenfor.

A. Sikkerhedsafprøvninger. Grupper på tyve 18 dage gamle fostre blev inokuleret i allantoishulen med 3,0 eller 4,0 log₁₀ TCID₅₀ af enten vFP-6 eller vCP-16. Efter udrugning blev kyllingerne observeret i 14 dage, på hvilket tidspunkt de hver fik udtaget blod, og sera opsamledes. De to rekombinanter inokuleret i kyllingefostrene havde ingen virkning på udrugningsevnen af æggene, og kyllingerne forblev sunde under den 14 dage lange observationsperiode.

Grupper på 10 SPF 1 dag gamle kyllinger blev ved intramuskulær indgivelse inokuleret med $3,0 \log_{10}$ TCID₅₀ af hver af rekombinanterne. Kyllingerne blev observeret i 28 dage og serumprøver opsamlet 14 og 28 dage efter inokulering. Der sås ingen vaccinationsreaktion på inokuleringsstedet med
5 nogen af rekombinanterne, og kyllingerne forblev sunde under den 28 dage lange observationsperiode.

Grupper på ti 28 dage gamle kyllinger blev inokuleret med hver af de rekombinante vira, idet de modtog enten $3,0 \log_{10}$ TCID₅₀ ved intramuskulær
10 indgivelse eller $3,0 \log_{10}$ TCID₅₀ ved cutan indgivelse (vingemembran). Kyllinger blev observeret i 28 dage og serumprøver opsamlet 14 og 28 dage efter inokulering. Der sås ingen reaktion efter intramuskulær inokulering med nogen af rekombinanterne. Cutan inokulering resulterede i en meget lille vaccinationsreaktion over for fjerkræpox med læsioner af heterogen
15 størrelse. Kanariepox-inokulering førte til dannelsen af en normal cutan læsion på inokuleringsstedet. Alle læsioner var i tilbagegang ved afslutningen af forsøget.

B. Immunrespons. RFFI-afprøvningen beskrevet i eksempel 7 blev anvendt til
20 vurdering af niveauerne af antistof mod rabiesglycoproteinet. For hver gruppe blev resultaterne udtrykt med den geometriske middeltiter af det individuelle serum omregnet til internationale enheder (IU) ifølge et standardserum, der indeholdt 23,4 IU. Minimums-positivitetsniveauet blev fastsat til én IU og blev brugt til bestemmelse af % positive fugle. Antistoffer mod avipox-viraene blev
25 afprøvet ved en ELISA-metode med brug af fjerkræpoxvirus-stammen som et antigen. Hver serumprøve blev fortyndet 1/20 og 1/80. Der konstrueredes en standardkurve under anvendelse af positive og negative sera. Minimums-positivitetsniveauet blev beregnet med middelværdien af de forskellige værdier af de negative sera lagt til med to standardafvigelser.

Resultaterne af serologiske undersøgelser er vist i tabel XV for vFP-6 og tabel XVI for vCP-16.

- 5 Der observeredes et begrænset serologisk respons for både rabies- og fjerkræpox-antigener med fostre inokuleret med enten vFP-6 eller vCP-16. Fjerkræpox-vektoren inducerede et serologisk respons over for begge antigener i et større antal fugle, end tilfældet var for kanariepox, men responset var stadig heterogent.
- 10 1 dag gamle kyllinger inokuleret med vFP-6 havde et godt serologisk respons, med alle fuglene seropositive over for rabies- og fjerkræpox-antigener 28 dage efter inokulering. Responset på inokulering med vCP-16 var meget lavere, med 40% af fuglene seropositive over for rabies-glycoprotein på dag 28 og 10% seropositive for avipox-antigener.
- 15 28 dage gamle kyllinger inokuleret intramuskulært med vFP-6 viste 100% serokonversion for begge antigener 14 dage efter inokulering. Selv om størstedelen af fuglene også serokonverterede efter cutan inokulering, var de opnåede titere lavere for både rabies- og avipox-antigener. Som tidligere, ud-
- 20 viste kyllinger, inokuleret ad både intramuskulær og subcutan vej med vCP-16, et varierende respons med et maksimum på 70% serokonversion mod rabies ved intramuskulær inokulering. Det lave serokonversionsniveau for avipox-antigener efter kanariepox-inokulering er eventuelt udtryk for graden af serologisk slægtskab mellem viraene.
- 25 Resultaterne indikerer, at både vFP-6 og vCP-16 er sikre at inokulere i kyllinger i forskellige aldre. Fjerkræpox-vektoren vFP-6 synes mere effektiv til inducering af et immunrespons i kyllinger. Det er imidlertid signifikant, at begge rekombinante avipoxvira, fjerkræpox og kanariepox, er vist at være
- 30 nyttige til immunisering in ovum.

TABEL XV

Immunologisk respons på fjerkræpox/rabies-glycoprotein (vFP-6) i kyllinger i forskellige aldre

5	Grupper	Dosis (TCID ₅₀)	Tid efter inokulering (dage)	Antistoffer		
				Rabies-glycoprotein		Fjerkræpox
				Middel IU-tite	% fugle/1IU	Middel Elisa OD % positive
10	Fastre	10 ³	3 + 14	0,28	15%	0,125 54%
	18 dage gamle	10 ⁴	3 + 14	,87	30%	0,129 46%
15	Kyllinger	10 ³	14	1,8	90%	0,109 70%
	1 dag gamle intramuskulært		28	4,2	100%	0,234 100%
20	Kyllinger	10 ³	14	3,7	100%	0,317 100%
	28 dage gamle intramuskulært		28	2,7	100%	0,378 100%
25	Kyllinger	10 ³	14	1,6	100%	0,191 100%
	28 dage gamle cutant		28	0,54	90%	0,161 80%

TABEL XVIImmunologisk respons på kanariepox/rabies-glycoprotein (vCP-16) i kyllinger i forskellige aldre

5	Antistoffer						
		Dosis (TCID ₅₀)	Tid efter inokulering (dage)	Rabies-glycoprotein		Kanariepox	
10	Grupper			Middel IU-titer	% fugle/1IU	Middel Elisa OD	% positive
	Fostre	10 ³	3 + 14	0,14	0%	0,068	25%
	18 dage gamle	10 ⁴	3 + 14	0,19	8%	0,059	25%
15	Kyllinger	10 ³	14	0,18	10%	0,027	0%
	1 dag gamle		28	0,21	40%	0,059	10%
	intramuskulært						
20	Kyllinge	10 ³	14	0,61	70%	0,093	60%
	28 dage gamle		28	0,24	30%	0,087	30%
	intramuskulært						
25	Kyllinger	10 ³	14	0,34	40%	0,071	30%
	28 dage gamle		28	0,11	10%	0,061	10%
	cutant						

EKSEMPEL 25 - Sikkerhed og immunogenicitet af vFP-6-inokulering i smågrise

To grupper på tre smågrise blev inokuleret med det rekombinante vFP-6 ved
5 én af to indgivelsesveje:

- a) tre dyr modtog 8,1 log₁₀ TCID₅₀ ved intramuskulær inokulering, og
- b) tre dyr modtog den samme dosis ved oral inokulering.

Alle dyr fik udtaget blod med ugentlige mellemrum og modtog booster-
10 inokulering af den samme dosis ad samme indgivelsesvej på dag 35. Smågrisene blev dagligt observeret for kliniske tegn. Sera blev afprøvet for anti-fjerkræpox-antistoffer ved en ELISA-afprøvning og en serum-neutralisations-afprøvning. Rabies-antistoffer blev prøvet ved en RFFI-afprøvning.

15

Alle smågrise forblev sunde, og der observeredes ingen læsioner efter inokulering. Temperaturkurver var normale uden nogen tilsyneladende forskel mellem inokulerede og uinokulerede dyr.

20 Smågrise inokuleret ved såvel intramuskulær som oral indgivelsesvej udviklede et serologisk respons på fjerkræpox-antigener som målt ved ELISA og serum-neutralisation. Et sekundært respons var tydeligt efter booster-inokulering (resultaterne ikke vist). Alle smågrise udviklede ligeledes et immunologisk respons på rabies-glycoprotein som målt ved en RFFI-
25 afprøvning, og en booster-virkning er tydelig ved begge indgivelsesveje. Disse resultater er vist i tabel XVII.

Resultaterne indikerer, at inokulering af en fjerkræpox/rabies-rekombinant er uskadelig i smågrise, og at rekombinanten er i stand til at frembringe et
30 signifikant immunrespons på rabies-glycoproteinet ved oral eller intramuskulær inokulering.

TABEL XVII

Antistof mod rabies-glycoprotein dannet i smågrise
inokuleret med vFP-6

5	Vaccinations- indgivelsesvej	Dyr	Rabies-antistof på dag (RFFI-titer)					
			14	21	28	35 ^b	42	49
10	Intramuskulært	984	2,4 ^a	2,2	2,1	2,2	3	3
		985	2,5	2,7	2,6	2,4	3	3
		986	2,2	2,0	2,1	2,3	3	3
	Oralt	987	3	2	2,1	2	3	3
		988	2,9	2,4	2,2	2,4	2,7	2,5
		989	2,8	2	1,7	1,8	2,4	2,5
15								

^a Titer udtrykt som $\log_{10}$ af højeste serumfortynding der giver over 50% reduktion i antallet af fluorescerende brønde i en RFFI-afprøvning.

^b Dyrene modtog den anden inokulering på dag 35.

Patentkrav

1. Rekombinant fjerkræpoxvirus, kendetegnet ved, at det indeholder DNA fra en ikke-avipox-kilde som koder for et antigen af et vertebratpatogen
5 og er ligeret til en promotor for ekspression af DNA'et, hvor det nævnte DNA og promotor er indsat i et ikke-essentielt område af fjerkræpoxgenomet.
2. Virus ifølge krav 1, hvori den nævnte promotor er en vaccinia-promotor, en entomopox-promotor eller en avipox-promotor.
3. Virus ifølge krav 1, hvori det nævnte DNA koder for et antigen af et
10 pattedyrpatogen, valgt blandt rabies G-antigen, gp51,30-kappeantigen fra okseleukæmivirus, FeLV-kappe-antigen fra katteleukæmivirus og glycoprotein D-antigen fra herpes simplex-virus.
4. Virus ifølge krav 1, hvori det nævnte DNA koder for et antigen af et
15 fuglepatogen valgt blandt fugleinfluenza-hæmagglutinin-antigen, et fusionsprotein-antigen af Newcastle disease virus, et RAV-1 kappeantigen af Rous-associeret virus, nucleoprotein-antigen af fugleinfluenzavirus, et matrix-antigen af det infektiøse bronchitis-virus og peplomer-antigen af det infektiøse bronchitis-virus.
5. Anvendelse af et virus ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4 ved
20 fremstilling af et lægemiddel for behandling af sygdomme i vertebrater.
6. Anvendelse af et virus ifølge krav 5, hvor vertebratet er et pattedyr og hvor sygdommen er en infektion ved et pattedyrpatogen.
7. Anvendelse ifølge krav 6 hvor pattedyrpatogenet er valgt blandt rabiesvirus, okseleukæmivirus, katteleukæmivirus og herpes simplex-virus.
- 25 8. Anvendelse af et virus ifølge krav 5, hvor vertebratet er en fugl og hvor sygdommen er en infektion fra et fuglepatogen.

9. Anvendelse ifølge krav 8 hvor fuglepatogenet er valgt blandt fugleinfluenzavirus, Newcastle disease-virus, Rous-associeret virus og infektiøs bronchitis-virus.