



PATENTSCHRIFT

(12)

(21) Anmeldenummer: 9007/88
US88/02816
(22) Anmeldetag: 24.08.1988
(42) Beginn der Patentdauer: 15.05.1995
(45) Ausgabetag: 27.12.2001

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/39**
A61K 39/275, C12N 7/01

(30) Priorität:
28.08.1987 US 90711 beansprucht.
20.10.1987 US 110335 beansprucht.
25.04.1988 US 186054 beansprucht.
23.08.1988 US 234390 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:
EP 20110385A2 US 4603112A EP 20261940A2
WO 86/05806A1 EP 110385A2 WO 86/00528A1
WO 88/02022A1
BIOESSAYS, VOL. 5, 1986; S. 249-251
BIOTECHNOLOGY: POTENTIALS AND
LIMITATIONS, DAHLENS KONFERENZEN 1986;
S. 155 U. 161-162

VIRUS RESEARCH, VOL. 10, 1988; S. 65
JOURNAL OF VIROLOGY, VOL. 62, 1988; S. 367
VIROLOGY, VOL. 156, 1987; S. 335
VIROLOGY, VOL. 160, 1987; S. 203
JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, VOL. 67,
1986; S. 6563
VIRUS RESEARCH, VOL. 10, 1988; S. 343
AVIAN DISEASES, VOL. 30, NO. 1, 1985; S. 24-27
NATURE, VOL. 317, 1985; S. 813-815
VIRUS GENES, VOL. 1, 1987; S. 7-21
J. GEN. VIROL, VOL. 67, 1986; S. 1591-1600
ZBL. BAKT. HYG., I. ABT. ORIG. B 167, 1978;
S. 375-390

(73) Patentinhaber:
HEALTH RESEARCH, INC.
12237 ALBANY (US).

(54) VIRUSHÄLTIGER IMPFSTOFF, REKOMBINANTES VIRUS UND VERFAHREN ZUM EXPRIMIEREN
EINES GENPRODUKTES

AT 408 549 B

(57) Beschrieben wird ein virushältiger Impfstoff, der beim Einbringen in einen Vertebraten zum Induzieren einer Immunantwort in dem Vertebraten auf ein gegebenes Pathogen befähigt ist, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff als das für die Immunantwort verantwortliche Virus ein rekombinantes Virus enthält, das ein exogenes DNA-Insert, das in einer nicht-essentiellen Region in das virale Genom nach einer geeigneten Promotorsequenz insertiert worden ist, enthält, welches exogene DNA-Insert ein Antigen des genannten Pathogens codiert und zur Expression dieses Antigens in vivo in dem Vertebraten unter der Kontrolle der Promotorsequenz und ohne produktive Replikation des Virus im Vertebraten befähigt ist. Beschrieben wird außerdem ein synthetisches rekombinantes Avipoxvirus, das durch die Einfügung von DNA aus einer beliebigen Quelle, insbesondere aus einer Nicht-Avipoxvirusquelle, in einen nicht-essentiellen Abschnitt des Avipoxvirusgenoms modifiziert ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen virushaltigen Impfstoff, der in Vertebraten eine Immunantwort auslöst, wobei ein synthetisches rekombinantes Virus verwendet wird. Insbesondere betrifft die Erfindung die Auslösung einer Immunantwort in einem Vertebraten, insbesondere einem Säugetier, auf ein Vertebraten-Pathogen durch Impfung des Vertebraten mit einem synthetischen rekombinanten, DNA enthaltenden Avipoxvirus, das die antigenen Determinanten des Pathogens codiert und exprimiert, und im speziellen Impfstoffe, die solch ein modifiziertes Avipoxvirus enthalten. Weiter betrifft die Erfindung modifiziertes Avipoxvirus, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung und bestimmte DNA-Sequenzen, die als Zwischenstufen in der Herstellung des modifizierten Avipoxvirus und Verfahren zur Herstellung solcher Sequenzen produziert werden oder beteiligt sind. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird durch den aus EP-A2-0 110 385, US-A-4 603 112 und EP-A2-0 261 940 bekannten Stand der Technik weder gelehrt noch nahegelegt.

Technischer Hintergrund

Avipox oder Avipoxvirus ist eine Vögel infizierende, nahe verwandte Gattung von Pockenviren. Die Gattung Avipox schließt die Arten Geflügelpocken, Kanarienspocken, Schneehuhnspocken, Taubenpocken, Wachtelpocken, Spatzenpocken, Starpocken und Truthahnspocken ein. Die Art Geflügelpocken infiziert Hühner. Sie darf nicht mit der menschlichen Erkrankung Windpocken verwechselt werden. Die Gattung Avipox hat viele gemeinsame Merkmale mit anderen Pockenviren und ist ein Mitglied derselben Unterfamilie, Pockenviren von Vertebraten, wie Vaccinia. Pockenviren, einschließlich Vaccinia und Avipox, replizieren innerhalb eukaryotischer Wirtszellen. Diese Viren sind gekennzeichnet durch ihre Größe, Komplexität und durch ihre Replikation im Cytoplasma. Allerdings gehören Vaccinia und Avipox zu verschiedenen Gattungen und sind in ihren jeweiligen Molekulargewichten, ihren antigenen Determinanten und in ihrer Wirtsspezifität verschieden; vgl. Intervirology, Bd. 17, Seiten 42-44, Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (1982).

Avipoxviren infizieren nicht unter Vermehrung nicht-vogelartige Vertebraten, wie Säugetiere einschließlich Menschen. Des weiteren vermehrt Avipoxvirus sich nicht, wenn man Säugetier-(einschließlich Menschen-) Zellkulturen beimpft. In solchen Säugetier-Zellkulturen, die mit Avipox infiziert sind, sterben die Zellen wegen eines cytotoxischen Effekts ab, zeigen aber keine Hinweise auf eine virale Infektion unter Vermehrung.

Die Impfung eines nicht-vogelartigen Vertebraten wie z.B. eines Säugetiers mit lebenden Avipoxen führt zur Bildung einer Läsion an der Impfstelle, die an eine Impfung mit Vaccinia erinnert. Es führt aber zu keiner produktiven viralen Infektion. Allerdings ist nun gefunden worden, daß ein auf diese Weise geimpftes Säugetier immunologisch auf das Avipoxvirus reagiert. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis.

Impfstoffe, die aus abgetötetem Pathogen oder gereinigten antigenen Komponenten solcher Pathogene zusammengestellt sind, müssen in größeren Mengen als Lebendvirus-Impfstoffe injiziert werden, um eine effektive Immunantwort hervorzurufen. Der Grund ist, daß Impfung mit Lebendvirus eine viel effizientere Methode der Impfung ist. Ein vergleichsweise kleines Inoculum kann eine effektive Immunantwort hervorrufen, weil das betreffende Antigen während der Replikation des Virus vermehrt wird. Aus medizinischer Sicht bieten Lebendvirusimpfstoffe eine effektivere und länger anhaltende Immunität, als eine Impfung mit einem abgetöteten Pathogen oder gereinigten Antigenimpfstoff. Daher erfordern Impfstoffe, die aus abgetöteten Pathogen oder gereinigten antigenen Bestandteilen solcher Pathogene zusammengesetzt sind, eine Produktion von größeren Mengen des Impfstoffmaterials als es mit Lebendvirus gebraucht wird.

Aus der vorangegangenen Diskussion ist klar, daß es medizinische und wirtschaftliche Vorteile für den Gebrauch von Lebendvirus-Impfstoffen gibt. Ein solcher Lebendvirus-Impfstoff enthält Vacciniavirus. Es ist bekannt, daß dieses Virus benutzt werden kann, um mittels rekombinanten DNA-Methoden DNA zu inserieren, die genetische Sequenzen der Antigene von Säugetierpathogenen darstellt.

Daher wurden im Stand der Technik Verfahren entwickelt, die die Herstellung von rekombinanten Vacciniaviren durch die Insertion von DNA aus einer beliebigen Quelle (z.B. virale, prokaryotische, eukaryotische, synthetische) in eine nicht-essentielle Region des Vacciniagenoms erlauben,

einschließlich von DNA-Sequenzen, die für antigene Determinanten eines pathogenen Organismus codieren. Bestimmte rekombinante Vacciniaviren, die mittels dieser Verfahren hergestellt wurden, wurden benutzt, um spezifische Immunität in Säugetieren auf eine Vielfalt von Säugetierpathogenen hervorzurufen, die in der US-A-4,603,112 beschrieben sind, auf deren Inhalt hier Bezug genommen wird.

Unverändertes Vacciniavirus hat eine lange Geschichte eines relativ sicheren und wirkungsvollen Gebrauchs zur Impfung gegen Pocken. Vor der Ausrottung der Pocken allerdings, als unmodifiziertes Vacciniavirus weithin verabreicht wurde, gab es ein geringes, aber reales Risiko von Komplikationen in Form einer generalisierten Vacciniainfektion, besonders bei Patienten, die an Ekzemen oder Immunsuppression litten. Eine weitere seltene, aber mögliche Komplikation, die aus der Impfung mit Vaccinia folgen kann, ist postvaccinale Encephalitis. Die meisten dieser Reaktionen ergaben sich bei der Impfung von Personen mit Hautkrankheiten, wie Ekzemen, oder mit einem geschwächten Immunsystem, oder von Individuen in Haushalten, in denen andere ein Ekzem oder eine geschwächte Immunantwort hatten. Vaccinia ist ein Lebendvirus und ist normalerweise harmlos für eine gesunde Person. Allerdings kann es zwischen Individuen mehrere Wochen lang nach der Impfung übertragen werden. Wenn eine Person mit einer Schwächung der normalen Immunantwort entweder durch Impfung oder durch Ansteckung durch eine frisch geimpfte Person infiziert wird, können die Folgen ernst sein.

Somit ist verständlich, daß ein Verfahren, welches in der Vorgehensweise die Vorteile von Lebendvirus-Impfung einschließt, jedoch die vorher angesprochenen Probleme vermindert oder ausschließt, ein höchst wünschenswerter Fortschritt über den gegenwärtigen Stand der Technik wäre. Dies ist heute umso mehr mit dem Vordringen der als "acquired immune deficiency syndrome" (AIDS) bekannten Krankheit von Bedeutung. Opfer dieser Erkrankung leiden an schwerer Immundysfunktion und können leicht durch eine normalerweise sichere Lebendviruspräparation getroffen werden, wenn sie entweder direkt oder über den Kontakt mit einer Person, die kurz zuvor mit einem derartigen Lebendvirus-Impfstoff immunisiert worden ist, in Kontakt mit einem solchen Virus kommen.

Gegenstand der Erfindung

Es ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen, der in der Lage ist, Vertebraten gegen pathogene Organismen zu immunisieren, und der die Vorteile eines Lebendvirus-Impfstoffs hat, und der wenige oder keine der Nachteile sowohl eines Lebendvirusimpfstoffs als auch eines abgetöteten Virus-Impfstoffs hat, besonders, wenn er zum Immunisieren von nicht-vogelartigen Vertebraten verwendet wird.

Weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist, synthetische rekombinante Avipoxviren zur Verwendung in solchen Impfstoffen zur Verfügung zu stellen.

Es ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung, ein Verfahren zur Auslösung einer Immunantwort in nicht-vogelartigen Vertebraten auf ein Antigen durch Impfung des Vertebraten mit einem synthetischen rekombinanten Avipoxvirus zur Verfügung zu stellen, das sich z.B. in Säugetieren nicht unter Vermehrung unter Produktion von infektiösem Virus repliziert. In diesem Fall begrenzt das Virus sich selbst und reduziert die Möglichkeit der Verbreitung auf nicht-geimpfte Wirte.

Es ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung, ein Verfahren zur Auslösung einer Immunantwort in einem Vertebraten auf ein Antigen zur Verfügung zu stellen, wobei das Verfahren die Impfung des Vertebraten mit einem Impfstoff umfaßt, der synthetisches rekombinantes, die antigenen Determinanten eines Pathogens für den Vertebraten einschließenden und exprimierenden Avipoxvirus enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Expression eines Genprodukts in einem Vertebraten durch Impfung des Vertebraten mit einem rekombinanten Virus zur Verfügung zu stellen, der das Genprodukt ohne replikative Vermehrung des Virus in dem Vertebraten codiert und exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist, ein Verfahren zur Auslösung einer Immunantwort in einem Vertebraten auf ein Antigen durch Impfung des Vertebraten mit einem rekombinanten, DNA enthaltenden Virus zur Verfügung zu stellen, das das Antigen ohne replikative Vermehrung des Virus in dem Vertebraten codiert und exprimiert.

Darstellung der Erfindung

In einer Hinsicht betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Auslösung einer Immunantwort in einem Vertebraten auf ein Pathogen durch Impfung des Vertebraten mit einem synthetischen, rekombinanten Avipoxvirus. Dieser Virus ist modifiziert durch die Gegenwart - in einer nicht-essentiellen Region des Avipoxgenoms - von DNA aus einer beliebigen Quelle, welche ein Antigen des Pathogens codiert und exprimiert.

In einer weiteren Hinsicht betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Expression eines Genprodukts oder zur Auslösung einer Immunantwort auf ein Antigen in einem Vertebraten mit einem rekombinanten, sich nicht replikativ in den Zellen des Vertebraten vermehrenden Virus, das aber das Genprodukt oder das Antigen in den Zellen des Vertebraten exprimiert.

In einer weiteren Hinsicht betrifft die Erfindung synthetisches, rekombinantes Avipoxvirus, das durch Insertion von DNA aus einer beliebigen Quelle, insbesondere aus einer Nicht-Avipoxquelle, in einer nicht-essentiellen Region des Avipoxvirus-Genoms modifiziert ist. Synthetisch modifizierte Avipoxvirus-Rekombinanten, die exogene (d.h. Nicht-Avipox) Gene tragen, die ein Antigen codieren und exprimieren und die bei einem Vertebratenwirt eine Immunantwort auf das Antigen und deshalb auf das exogene Pathogen hervorrufen, werden erfindungsgemäß besonders zur Impfung nicht-vogelartiger Vertebraten als neue Impfstoffe benutzt, die die Nachteile üblicher, abgetöteter oder attenuierter lebender Organismen benutzender Impfstoffe vermeiden.

Es muß noch einmal bemerkt werden, daß Avipoxviren sich nur replikativ vermehren können in bzw. passagiert werden können durch Vogelarten oder Vogelzelllinien. Die rekombinanten, aus Vogelwirtszellen gewonnenen Avipoxviren rufen eine Impfungsläsion ohne replikative Vermehrung des Avipoxvirus hervor, wenn man nicht-vogelartige Vertebraten, wie Säugetiere, in einer der Impfung von Säugetieren mit Vacciniavirus entsprechenden Weise impft. Trotz des Fehlens einer replikativen Vermehrung des Avipoxvirus in solch einem geimpften nicht-vogelartigen Vertebraten geschieht genügend Expression des Virus, so daß das geimpfte Tier immunologisch auf die antigenen Determinanten des rekombinanten Avipoxvirus und auch auf die antigenen Determinanten antwortet, für die die im Virus enthaltenen exogenen Gene codieren.

Bei Impfung einer Vogelart ruft ein solches synthetisches rekombinantes Avipoxvirus nicht nur eine Immunantwort auf die Antigene hervor, die auf der exogenen DNA aus einer beliebigen Quelle enthalten sein können, sondern führt auch zu replikativer Vermehrung des Virus in dem Wirt unter Auslösung einer erwarteten Immunantwort auf den Avipoxvektor per se.

Verschiedene Forscher haben vorgeschlagen, rekombinante Geflügelpocken speziell zum Gebrauch als Veterinär-Impfstoffe für den Schutz von Geflügelbeständen herzustellen; vgl. Boyle und Coupar, J. Gen. Virol. Bd. 67 (1986), Seiten 1591-1600, und Binns et al., Isr. J. Vet. Med., Bd. 42 (1986), Seiten 124-127. Es sind aber weder Vorschläge noch tatsächliche Berichte zum Gebrauch von rekombinanten Avipoxviren zum Erzeugen einer spezifischen Immunität in Säugetieren bekannt geworden.

Stickl und Mayr, Fortschr. Med. 97(40) (1979), Seiten 1781-1788 beschreiben die Injektion von Avipox-, insbesondere Geflügelpockenviren in Menschen. Allerdings beziehen sich diese Untersuchungen nur auf den Gebrauch von gewöhnlichen Geflügelpocken, um die nicht-spezifische Immunität in Patienten zu verstärken, die an den Nebenwirkungen von Krebschemotherapie leiden. Keine rekombinanten DNA-Techniken sind dabei angewendet. Es gibt keinen Hinweis über einen Avipoxvirus, in das für Antigene von Vertebratenpathogenen codierende DNA inseriert worden ist, oder über ein Verfahren zur Auslösung spezifischer Immunität in Vertebraten. Statt dessen hängt der Stand der Technik von einem allgemeinen und nicht-spezifischen stimulierenden Effekt auf den menschlichen Wirt ab.

Eine vollständigere Diskussion der Grundlagen der genetischen Rekombination hilft zum Verständnis, wie die modifizierten rekombinanten Viren der vorliegenden Erfindung hergestellt worden sind.

Genetische Rekombination ist allgemein der Austausch homologer Abschnitte von Desoxyribonucleinsäure (DNA) zwischen zwei Strängen von DNA. (In bestimmten Viren kann Ribonucleinsäure (RNA) die DNA ersetzen). Homologe Abschnitte einer Nucleinsäure sind Abschnitte der Nucleinsäure (RNA oder DNA), die dieselbe Sequenz der Nucleotidbasen haben.

Genetische Rekombination kann natürlicherweise stattfinden während der Replikation oder der

Erzeugung neuer viraler Genome innerhalb der infizierten Wirtszelle. Daher kann genetische Rekombination zwischen viralen Genen während des viralen Replikationszyklus in einer mit zwei oder mehr verschiedenen Viren oder anderen genetischen Konstruktionen coinfizierten Wirtszelle stattfinden. Ein DNA-Abschnitt aus einem ersten Genom wird beim Aufbau des Abschnitts des Genoms eines zweiten, coinfizierenden Virus, in welchem die DNA homolog zu der aus dem ersten viralen Genom ist, ausgetauscht.

Allerdings kann Rekombination auch zwischen Abschnitten von DNA in verschiedenen, nicht vollkommen homologen Genomen stattfinden. Wenn solch ein Abschnitt aus einem ersten Genom mit einem Abschnitt eines anderen Genoms homolog ist (mit Ausnahme beispielsweise der Anwesenheit eines genetischen Markers oder eines Gens, das für eine antigene, in einen Abschnitt der homologen DNA inserierte Determinante codiert) kann immer Rekombination stattfinden. Die Produkte dieser Rekombination lassen sich dann durch die Anwesenheit jenes genetischen Markers oder Gens nachweisen.

Erfolgreiche Expression der als DNA eingeführten genetischen Sequenz des modifizierten infektiösen Virus erfordert zwei Bedingungen:

Erstens muß die Insertion in eine nicht-essentielle Region des Virus stattfinden, damit das modifizierte Virus lebensfähig bleibt. Weder für Geflügelpocken noch für andere Avipoxviren wurden bis jetzt nicht-essentielle Regionen analog zu den für Vacciniavirus beschriebenen, gezeigt. Entsprechend wurden für die vorliegende Erfindung nicht-essentielle Regionen von Geflügelpocken durch Spaltung des Geflügelpocken-Genoms in Fragmente, anschließende Trennung der Fragmente nach Größe und Insertion dieser Fragmente in Plasmidkonstrukte zur Vermehrung aufgefunden. Plasmide sind kleine, zirkuläre DNA-Moleküle, die als extrachromosomale Elemente in vielen Bakterien einschließlich *E. coli* gefunden werden. Verfahren zur Insertion von DNA-Sequenzen, wie Genen für antigene Determinanten oder andere genetische Marker in Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und im einzelnen beschrieben in Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982). Analog wurde bei der Insertion von genetischen Markern und/oder Antigene codierenden Genen in die clonierten Geflügelpockenfragmente vorgegangen. Die erfolgreich rekombinierten Fragmente (wie durch erfolgreiche Wiedergewinnung des genetischen Markers oder Antigens gezeigt wurde), waren diejenigen, die in eine nicht-essentielle Region des Geflügelpockenvirus inserierte DNA enthielten.

Die zweite Bedingung zur Expression inserierter DNA ist die Gegenwart eines Promotors in der korrekten Beziehung zu der inserierten DNA. Der Promotor muß so angeordnet sein, daß er vor der zu exprimierenden DNA-Sequenz liegt. Weil Avipoxviren nicht gut charakterisiert sind und Avipox-Promotoren bislang nicht identifiziert waren, sind bekannte Promotoren von anderen Pockenviren erfolgreich als Teil der vorliegenden Erfindung vor der zu exprimierenden DNA inseriert worden. Geflügelpocken-Promotoren können ebenso erfolgreich benutzt werden, um die Verfahren erfindungsgemäß auszuführen und die Produkte herzustellen. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß mit Geflügelpocken-Promotoren, Vaccinia-Promotoren und Entomopox-Promotoren Transkription in rekombinanten Pockenviren gestartet wird.

Boyle and Coupar, *J. gen. Virol.*, Bd. 67 (1986), Seite 1591, vermuten, daß von Vaccinia-Promotoren "erwartet werden kann, daß sie in (Geflügelpocken)-Virus arbeiten". Die Autoren lokalisierten und clonierten ein Geflügelpocken-TK-Gen (Boyle et al., *Virology*, Bd. 156 (1987), Seiten 355-365) und inserierten es in Vacciniavirus. Dieses TK-Gen wurde vermutlich wegen der Erkennung der Geflügelpocken-TK-Promotorsequenz durch Vaccinia-Polymerase exprimiert. Trotz ihrer Vermutung inserierten die Autoren allerdings weder einen beliebigen Vaccinia-Promotor in das Geflügelpockenvirus noch beobachteten sie irgendeine Expression einer fremden, in dem Geflügelpocken-Genom vorhandenen DNA-Sequenz. Vor der vorliegenden Erfindung war nicht bekannt, daß Promotoren aus anderen Pockenviren, wie z.B. Vaccinia-Promotoren, tatsächlich die Expression eines Gens in einem Avipoxgenom ansteuern.

Beschreibung bestimmter bevorzugter Ausführungsformen

Erfindungsgemäß wurden besonders Geflügelpocken und Kanarienviren als bevorzugte, mittels Rekombination durch Einbau exogener DNA modifizierte Avipoxarten benutzt.

Geflügelpocken ist eine Art von Avipox, die insbesondere Geflügel, nicht aber Säugetiere

infiziert. Der als FP-5 bezeichnete Geflügelpockenstamm ist ein kommerzieller, aus Hühnerembryonen stammender Geflügelpockenvirus-Impfstamm, und von American Scientific Laboratories (Division of Schering Corp.), Madison, WI, United States Veterinary License No. 165, Serial No. 30321, erhältlich.

- 5 Der hier als FP-1 bezeichnete Geflügelpockenstamm ist ein Duvette-Stamm, der zum Gebrauch als Impfstoff in Eintagsküken modifiziert ist. Der Stamm ist ein kommerzieller Geflügelpocken-Impfstamm, der als O DCEP 25/CEP67/ 2309 October 1980 bezeichnet und von Institute Merieux, Inc. erhältlich ist.

- 10 Kanarienvogelpockenvirus ist eine andere Art von Avipoxvirus. Analog zu den Geflügelpocken infiziert Kanarienvogelpockenvirus besonders Kanarienvögel, nicht jedoch Säugetiere. Der hier als CP bezeichnete Kanarienvogelpockenstamm ist ein kommerzieller Kanarienvogel-Impfstamm, der als LF2 CEP 524 24 10 75 bezeichnet und von Institute Merieux, Inc. erhältlich ist.

- 15 Die in diesen Avipoxviren durch genetische Rekombination eingefügten DNA-Sequenzen schließen erfindungsgemäß folgendes ein: Das lac Z-Gen prokaryotischen Ursprungs; das Tollwutglykoprotein (G)-Gen, das ein Antigen eines nicht-vogelartigen (spezifisch säugetierartigen) Pathogens codiert; das Truthahn-Influenzähämagglutinin-Gen, das für das Antigen eines von einem Avipoxvirus verschiedenen pathogenen Vogelvirus codiert; das gp51,30-Hüllgen des Rinderleukämievirus, einem Säugetiervirus; das Fusionsprotein-Gen des Newcastle Disease Virus (Texasstamm), einem Vogelvirus; das FeLV-Hüllgen des Katzenleukämievirus, einem Säugetiervirus, das RAV-1 env-Gen des Rous-assoziierten Virus, das eine Vogelvirus/Geflügelkrankheit ist; das Nucleoprotein (NP)-Gen des Hühner/Pennsylvania/1/83 Influenzavirus, einem Vogelvirus; das Matrixgen und Peplomergen des infektiösen Bronchitisvirus (Stamm Mass 41), einem Vogelvirus; und das Glykoprotein D-Gen (gD) des Herpes simplex Virus, einem Säugetiervirus.

- 25 Die Isolierung des lac Z-Gens ist beschrieben von Casadaban et al., Methods in Enzymology, Bd. 100 (1983), Seiten 293-308. Die Struktur des Tollwut G-Gens ist z.B. von Anilionis et al., Nature, Bd. 294 (1981), Seiten 275-278 beschrieben. Sein Einbau in Vaccinia und Expression in diesen Vektor werden von Kieny et al., Nature, Bd. 312 (1984), Seiten 163-166 diskutiert. Das Truthahn-Influenzähämagglutinin-Gen ist beschrieben von Kawaoka et al., Virology, Bd. 158 (1987), Seiten 218-227. Das Rinderleukämievirus gp51,30 env-Gen wurde beschrieben von Rice et al., Virology, Bd. 138 (1984), Seiten 82-93. Das Fusionsgen von Newcastle Disease Virus (Texasstamm) ist erhältlich vom Institute Merieux, Inc., als Plasmid pNDV 108. Das Katzenleukämievirus env-Gen wurde von Guilhot et al., Virology, Bd. 161 (1987), Seiten 252-258 beschrieben. Das Rous-assoziierte Virus Typ 1 ist erhältlich vom Institute Merieux, Inc., als zwei Clone penVRVIPT und mp19env (190). Hühnerinfluenza NP-Gen ist erhältlich von Yoshihiro Kawaoka vom St. Jude Children's Research Hospital als Plasmid pNP 33. Ein infektiöser Bronchitisvirus cDNA Clon des IBV Mass 41-Matrix-Gens und Peplomergens ist erhältlich vom Institute Merieux, Inc. als Plasmid pIBVM63. Das Herpes simplex Virus gD-Gen ist beschrieben von Watson et al., Science, Bd. 218 (1982), Seiten 381-384.

- 40 Die rekombinanten Avipoxviren, die nachstehend näher beschrieben werden, schließen einen von drei Vacciniapromotoren ein. Der Pi-Promotor aus dem Ava I H-Abschnitt von Vaccinia ist beschrieben von Wachsmann et al., J. of Inf. Dis., Bd. 155 (1987), Seiten 1188-1197. Insbesondere ist dieser Promotor aus dem Ava I H(Xho I G)-Fragment aus dem L-varianten WR Vacciniastamm abgeleitet, in dem der Promotor die Transkription von rechts nach links steuert. Die Kartenposition des Promotors ist etwa 1,3 Kbp (Kilobasenpaare) vom linken Ende von Ava I H, etwa 12,5 Kbp vom linken Ende des Vacciniagenoms und etwa 8,5 Kbp links von der Hind III C/N Verbindungsstelle. Der Promotor hat folgende Sequenz:

(GGATCCC)-ACTGTAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGT-
AGTAGGGTACTCGTGATTAATTTTATTGTTAACTTG-(AATTC),
wobei die Symbole in Klammern Linkersequenzen sind.

- 50 Der Hind III H-Promotor (auch "HH" und "H6") wurde durch Standardtranskriptions-Kartierungstechniken festgelegt. Er hat die Sequenz:

ATTCTTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAA
TAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATA-
AATT

ATTTCATTATCGCGATATCCGT
TAAGTTTGTATCGTAATG.

Die Sequenz ist identisch mit der, die als 5'-seitig des offenen Leserahmens H6 von Rosel et al., J. Virol., Bd. 60 (1986), Seiten 436-449, beschrieben ist.

5 Der 11K-Promotor ist von Wittek, J. Virol., Bd. 49 (1984), Seiten 371-378 und C. Bertholet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), Seiten 2096-2100, beschrieben.

Die rekombinanten Avipoxviren der Erfindung werden in an sich bekannter Weise in zwei Schritten zusammengebaut und analog zu jenen, die in dem vorstehend erwähnten US-Patent 4,603,112 zur Herstellung synthetischer Rekombinanten von Vacciniavirus beschrieben sind.

10 Zuerst wird die in das Virus zu inserierende DNA in ein *E. coli* Plasmid eingebaut, in das zu einem Abschnitt von nicht-essentieller DNA des Avipoxvirus homologe DNA eingebaut wurde. Getrennt davon ist die zu inserierende DNA-Gensequenz mit einem Promotor ligiert worden. Die Promotor-Gen-Verbindung wird danach in die Plasmidkonstruktion eingefügt, so daß die Promotor-Gen-Verbindung auf beiden Seiten von DNA flankiert ist, die homolog zu einem nicht-essentiellen Abschnitt von Avipox-DNA ist. Die daraus hervorgehende Plasmidkonstruktion wird danach durch Wachstum in *E. coli* Bakterien vermehrt. (Plasmid-DNA wird benutzt, um exogenes genetisches Material zu tragen und zu vermehren; Diese Methodik ist bekannt. Beispielsweise sind diese Plasmidtechniken beschrieben von Clewell, J. Bacteriol., Bd. 110 (1972), Seiten 667-676. Die Techniken der Isolierung von amplifiziertem Plasmid aus dem *E. coli*-Wirt sind ebenfalls bekannt und beispielsweise von Clewell et al., in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 62 (1969), Seiten 1159-1166) beschrieben).

Das nach dem Wachstum in *E. coli* isolierte amplifizierte Plasmidmaterial wird nun für den zweiten Schritt benutzt. Dazu wird das die zu inserierende DNA-Gensequenz enthaltende Plasmid in eine Zellkultur (z.B. Hühnerembryofibroblasten) zusammen mit dem Avipoxvirus (wie z.B. Geflügelpockenstamm FP-1 oder FP-5) transfiziert. Rekombination zwischen homologer Geflügelpocken-DNA in dem Plasmid und dem viralen Genom führen zu einem Avipoxvirus, das durch die Gegenwart von Nicht-Geflügelpocken DNA-Sequenzen in einem nicht-essentiellen Abschnitt seines Genoms modifiziert ist.

30 Ein besseres Verständnis der Erfindung und ihrer zahlreichen Vorteile wird man aus den folgenden Beispielen haben, die zur Veranschaulichung gegeben werden.

Beispiel 1

35 Transiente Expressionsversuche zeigen die Erkennung von Vaccinia-Promotoren durch Geflügelpocken RNA-Transkriptionsfaktoren

Eine Anzahl von Plasmidkonstruktionen wurde hergestellt, die die codierende Sequenz für Hepatitis B Virus Oberflächenantigen (HBsAg) verbunden mit Vacciniavirus-Promotorensequenzen enthielten. Mit Fünzig µg jedes Plasmids wurden CEF-Zellen (Hühnerembryofibroblasten) transfiziert, die mit 10 Plaque-bildenden Einheiten (pfu) Geflügelpockenvirus oder Vacciniavirus pro Zelle infiziert waren. Man ließ die Infektion 24 Stunden weiter laufen und lysierte dann die Zellen durch drei nachfolgende Zyklen von Einfrieren und Auftauen.

40 Die Menge von HBsAg in dem Lysat wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen AUSRIA II - ¹²⁵I Kit von Abbott Laboratories, Diagnostic Division, abgeschätzt. Die Gegenwart oder Abwesenheit von HBsAg ist als Verhältnis der Nettowerte (Probe minus Hintergrund) der unbekannten Probe zu dem negativen, vom Hersteller vorbestimmten Ausschlußwert ausgedrückt. Das führt zu einem P/N (Positiv/Negativ)-Verhältnis. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

50 Es wurden drei verschiedene Vaccinia-Promotorsequenzen benutzt: Der früh in der Vacciniainfektion vor der DNA-Replikation erkannte Pi-Promotor; der 11K-Promotor, der spät in der Vacciniainfektion nach dem Einsetzen der DNA-Replikation erkannt wird; und der Hind III H (HH)-Promotor, der sowohl früh wie spät in der Vacciniainfektion erkannt wird. Diese Promotoren sind vorstehend beschrieben.

Die Daten zeigen, daß das in den Lysaten von infizierten Zellen produzierte HBsAg das Ergebnis der Erkennung von Vaccinia-Promotoren entweder durch Geflügelpocken- oder Vaccinia-Transkriptionsfaktoren ist.

Tabelle I

| | <u>Plasmid</u> | <u>Virus</u> | <u>Beschreibung</u> | <u>P/N-Verhältnis</u> |
|----|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 5 | pMP 131piR ₂ | Geflügelpocken Vaccinia | SAg mit Pi-Promotor verbunden | 1,8 9,1 |
| | pMPK 22.13S | Geflügelpocken Vaccinia | SAg mit 11K-Promotor verbunden | 14 2 |
| 10 | pPDK 22.5 | Geflügelpocken Vaccinia | SAg mit 11K-Promotor verbunden | 92,6 5,6 |
| | pRW 668 | Geflügelpocken Vaccinia | SAg mit HH-Promotor verbunden | 77 51,4 |
| 15 | kein Plasmid | Geflügelpocken | | 1,1 |
| | kein Plasmid | Vaccinia | | 1,3 |
| 20 | pMPK 22.13S | (kein Virus) | | 1,3 |

Beispiel 2Konstruktion eines das lac Z-Gen enthaltenden rekombinanten Geflügelpockenvirus vFP-1

Ein Fragment in einem nicht-essentiellen Abschnitt des Geflügelpockenvirus wurde wie folgt lokalisiert und isoliert.

Mit Nuclease Bal 31 wurde die einzelsträngige endständige Haarnadelstruktur von FP-5-DNA entfernt. Das Klenow (große) Fragment der DNA-Polymerase I wurde zur Bildung glatter Enden verwendet. Nach Entfernung der Haarnadelstruktur wurden Fragmente hergestellt durch Verdau mit der Restriktionsendonuclease Bgl II. Dieser Verdau führt zu einer Reihe von FP-5-Fragmenten, die durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden.

Ein stumpfendig 8.8 Kbp BglII-Fragment wurde isoliert und mit dem kommerziell erhältlichen Plasmid pUC 9 ligiert, das mit Bam HI und Sma I gespalten worden war. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde pRW 698 genannt.

Um die Größe des Geflügelpockenfragments zu verringern, wurde dieses Plasmid mit Hind III gespalten, wobei zwei weitere Fragmente erzeugt wurden. Ein 6.7 Kbp-Fragment wurde verworfen und das übrigbleibende 4.7 Kbp-Fragment wurde mit sich selbst ligiert, so daß sich ein neues, als pRW 699 bezeichnetes Plasmid, ergab.

Um ein am 11K-Promotor gestartetes lac Z-Gen in dieses Plasmid einzubauen, wurde pRW 699 mit Eco RV gespalten, das das Plasmid nur an einer Stelle spaltet. Das lac Z-Fragment unter der Kontrolle des 11K-Promotors wurde danach als stumpf endiges Pst I-Bam HI-Fragment inseriert und ergab ein neues Plasmid, das pRW 702 genannt wurde. Der lac Z-Clon stammt von pMC 1871, wie beschrieben von Casadaban et al., a.a.O.. Der 11K-Promotor wurde an das achte Codon des lac Z-Gens mittels eines Bam HI-Linkers ligiert.

Mit Rekombinationstechniken, wie denjenigen, die für Vaccinia in der US-A-4,603,112 beschrieben sind, wurde das Plasmid pRW 702 mit dem Geflügelpockenvirus FP-5 rekombiniert, das auf CEF wuchs, wobei die folgenden Verfahren benutzt wurden um vFP-1 herzustellen. 50 µg pRW 702 DNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl mit 0,5 µg von Gesamtgenom-Geflügelpocken-DNA gemischt. Dazu wurden gefügt: 10 µl 2,5 molar CaCl₂ und 110 µl 2 x HEBS-Puffer (pH 7), der hergestellt wurde aus

40 mMol Hepes
300 mMol NaCl
1,4 mMol Na₂HPO₄
10 mMol KCl

12 mMol Dextrose.

Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl einer Geflügelpockenvirussuspension (verdünnt auf 5 pfu/Zelle) hinzugefügt und die Mischung auf 60 mm-Schalen, die einen primären CEF Monolayer enthielten, geimpft. Außerdem wurden 0,7 ml Eagles-Medium, das 2 % fötales Kälberserum (FBS) enthielt, zur gleichen Zeit hinzugefügt. Die Platten wurden 2 Stunden bei 37°C bebrütet, danach wurden weitere 3 ml Eagles-Medium mit 2 % FBS zugesetzt und die Platten 3 Tage lang bebrütet. Die Zellen wurden lysiert durch drei folgende Zyklen von Einfrieren und Auftauen; die Virusnachkommenschaft wurde danach auf die Anwesenheit von Rekombinanten untersucht.

Ein Nachweis einer erfolgreichen Einfügung des 11K-Promotor-lac Z-Gens durch Rekombination in das Genom von Geflügelpocken FP-5 wurde dadurch geführt, daß auf Expression des lac Z-Gens getestet wurde. Das lac Z-Gen codiert das Enzym β -Galactosidase, das das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosidase (X-gal) spaltet und dabei ein blaues Indolyl-derivat freisetzt. Blaue Plaques wurden als positive Rekombinanten ausgewählt.

Außerdem wurde die erfolgreiche Einführung von lac Z in das Genom von Geflügelpocken FP-5 und seine Expression bestätigt durch Immunpräzipitation des β -Galactosidaseproteins mittels kommerziell verfügbarer Antisera und Standardverfahren, die vFP-1 infizierte CEF, BSC (Affennierenzelllinie - ATCC CCL26), VERO (Affennierenzelllinie - ATCC CCL81) und MRC-5 (diploide menschliche Lungenzelllinie - ATCC CCL171) benutzen.

Weiter wurde die Expression der β -Galactosidase durch das rekombinante Virus vFP-1 *in vivo* bestätigt. Dazu wurden Kaninchen und Mäuse mit dem Virus geimpft. Der Anstieg in den Titern der gegen das β -Galactosidaseprotein gerichteten Antikörper in dem Serum der geimpften Tiere wurde gemessen.

Insbesondere wurde das rekombinante vFP-1 von Wirtszellverunreinigungen gereinigt und intradermal an zwei Stellen auf jeder Seite von zwei Kaninchen eingeimpft. Jedes Kaninchen erhielt insgesamt 10^8 pfu.

Den Tieren wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen. Die Seren wurden für einen ELISA-Test benutzt, der eine kommerziell erhältliche Präparation von gereinigter β -Galactosidase als Antigenquelle benutzt.

Sowohl die mit dem rekombinanten vFP-1 geimpften Kaninchen als auch die Mäuse zeigten eine im ELISA-Test nachweisbare Immunantwort auf das β -Galactosidaseprotein. In beiden Arten war die Antwort eine Woche nach der Impfung feststellbar.

Beispiel 3

Konstruktion des Tollwut G-Gen und lac Z enthaltenden rekombinanten Virus vFP-2 aus Geflügelpockenvirus FP-5

Ein 0,9 Kbp Pvu II-Fragment wurde aus FP-5 erhalten und mittels Standardverfahren zwischen die beiden Pvu II-Stellen in pUC 9 eingefügt. Die daraus hervorgehende Konstruktion, als pRW 688.2 bezeichnet, besitzt asymmetrisch in dem Pvu II-Fragment zwei etwa 30 bp voneinander entfernte Hinc II-Stellen und bildet daher einen langen und einen kurzen Arm des Fragments.

Unter Benutzung bekannter Techniken wurden zwischen diese Hinc II-Stellen Oligonucleotid-adaptoren eingesetzt, um Pst I- und Bam HI-Stellen einzuführen und auf diese Weise das Plasmid pRW 694 herzustellen.

Dieses Plasmid wurde nun mit Pst I und Bam HI gespalten und das mit dem vorstehend beschriebenen 11K Vacciniapromotor verbundene lac Z-Gen eingefügt. Man erhielt das neue Plasmid pRW 700.

Zur Herstellung eines vom Pi-Promotor gesteuerten Tollwut G-Gens wurde die Bgl II-Stelle, die 5'-proximal zum Tollwutgen liegt (vgl. Kieny et al., a.a.O.), an den Enden glatt gemacht und an die aufgefüllte Eco RI-Stelle des vorstehend beschriebenen Pi-Promotors ligiert.

Diese Konstruktion wurde in die Pst I-Stelle von pRW 700 eingefügt und ergab das Plasmid pRW 735.1, das damit die fremde Gensequenz Pi-Tollwut G-11K-lac Z enthält. Dieses Insert ist so innerhalb des Plasmids angeordnet, daß der lange Pvu II-Hinc II-Arm der FP-5 Donorsequenz auf der 3'-Seite des lac Z-Gens liegt.

Die so erzeugte fertige Konstruktion wurde mit Geflügelpockenvirus FP-5 durch Infektion/Transfektion von Hühnerembryofibroblasten (durch Verfahren wie vorstehend beschrieben) rekombiniert. Man erhielt das rekombinante Geflügelpockenvirus vFP-2. Dieses rekombinante Virus wurde nach Anfärbung mit X-gal ausgewählt.

Die korrekte Insertion und Expression sowohl des lac Z-Marker-Gens wie des Tollwut G-Gens wurde mit einer Anzahl zusätzlicher, nachstehend beschriebener Verfahren, überprüft.

Ein Immunfluoreszenznachweis des Tollwutantigens durch spezifische Antikörper zeigte erfolgreich die Expression des Tollwutantigens auf der Oberfläche von vogelartigen und nicht-vogelartigen, mit vFP-2 Virus infizierten Zellen an.

Wie zuvor wurde die Expression des Tollwutantigens und der β -Galactosidase durch vogelartige und nicht-vogelartige, mit vFP-2 Virus infizierte Zellen durch das Immunpräzipitationsverfahren bestätigt.

Ein weiterer Nachweis, daß die Ausführungsform vFP-2 dieser Erfindung ein erfolgreiches rekombinantes Virus ist, das die Gene für Tollwut G und β -Galactosidase trägt, wurde durch Impfung von zwei Kaninchen mit vFP-2 Virus erreicht. Beide Kaninchen wurden intradermal mit 1×10^5 pfu vFP-2 pro Kaninchen beimpft. Beide Kaninchen entwickelten typische Pockenläsionen. Den Kaninchen wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen; die Seren wurden durch ELISA getestet, um die Anwesenheit der für das Tollwutglykoprotein und das β -Galactosidaseprotein spezifischen Antikörper nachzuweisen.

Wie nachstehend in Tabelle II dargestellt, zeigte Kaninchen 205 nachweisbare Mengen von anti- β -Galactosidase-Antikörper im ELISA-Test 1 Woche nach der Impfung. Diese Menge stieg nach 2 Wochen auf einen Titer von 1 in 4000, der 5 Wochen lang nach der Impfung aufrechterhalten wurde. Benutzte man einen Antigencapture ELISA-Test, zeigten Seren aus Kaninchen 205 nachweisbare Mengen von anti-Tollwut-Antikörpern zwischen 3 und 10 Wochen nach der Impfung.

Tabelle II

Antikörperproduktion durch Kaninchen 205 gegen Tollwutantigen und β -Galactosidase-Protein

| Zeit | Antikörpertiter (Kehrwert der Serumverdünnung) | |
|-------------------|---|------|
| | anti β -Galactosidase | |
| Vorbluten | | 0 |
| Woche 1 | | 500 |
| Wochen 2-5 (jede) | | 4000 |
| Woche 6 | | 500 |
| Woche 9 | | 250 |
| Vorbluten | anti-Tollwut | 0 |
| Woche 3 | | 200 |
| Woche 6 | | 200 |
| Woche 10 | | 100 |

Beispiel 4A

Konstruktion eines rekombinanten Virus vFP-3 mit einem Tollwut G-Gen unter Promotorkontrolle aus Geflügelpockenvirus FP-1

Diese Ausführungsform zeigt, daß das Tollwut G-Gen vollständig auch durch andere Stämme von Geflügelpocken als FP-5, insbesondere durch einen anderen, als FP-1 bezeichneten Stamm von Geflügelpockenvirus exprimiert wird.

Wie in Beispiel 3 wurde ein 0,9 Kbp Pvu II-Fragment aus FP-1 unter der Annahme erhalten, daß, wie in FP-5, das Fragment einen nicht-essentiellen Abschnitt enthalten würde.

Dieses Fragment wurde zwischen die beiden Pvu II-Stellen von pUC 9 eingefügt und das Plasmid mit der Bezeichnung pRW 731.15R erzeugt.

Dieses Plasmid besitzt asymmetrisch innerhalb des Pvu II-Fragments zwei etwa 30 bp vonein-

ander entfernte Hinc II-Stellen und bildet so einen langen und einen kurzen Arm dieses Fragments.
Ein kommerziell erhältlicher Pst I-Linker

(5') - CCTGCAGG - (3')

wurde zwischen die beiden Hinc II-Stellen eingefügt und ergab das Plasmid pRW 741.

5 Ein von dem Promotor HH abhängiges Tollwut G-Gen wurde in dieses Plasmid in die Pst I-Stelle eingefügt und erzeugte das neue Plasmid pRW 742B. Durch Rekombination dieses Plasmids mit FP-1 nach Infektion/Transfektion von CEF-Zellen wurde das Virus vFP-3 erhalten.

10 Das ATG Translationsstartcodon des von dem HH-Promotor gesteuerten offenen Leserahmens wurde dem Startcodon des Tollwut G-Gens überlagert, indem ein die Eco RV-Stelle in dem HH-Promotor und die Hind III-Stelle in dem Tollwut G-Gen überlagerndes synthetisches Oligonucleotid benutzt wurde. Das 5'-Ende dieses Tollwutgens unter dem HH-Promotor wurde in an sich bekannter Weise so modifiziert, daß es eine Pst I-Stelle enthielt. Die Konstruktion wurde danach mit der Pst I-Stelle von pRW 741 ligiert und ergab pRW 742B. Die Orientierung der Konstruktion in dem Plasmid ist die gleiche wie in dem vorher in Beispiel 3 diskutierten pRW 735.1.

15 Die Rekombination wurde gemäß Beispiel 2 ausgeführt. Die daraus hervorgehende Rekombinante wurde vFP-3 genannt.

Die Expression von Tollwutantigenen sowohl in vogelartigen wie in nicht-vogelartigen, mit vFP-3 Virus infizierten Zellen wurde durch Immunpräzipitation und Immunfluoreszenztechniken (wie weiter oben beschrieben) bestätigt.

20 Ein weiterer Beweis, daß die Ausführungsform vFP-3 dieser Erfindung ein erfolgreiches rekombinantes, die Gene für Tollwut G exprimierendes Virus ist, wurde durch intradermale Impfung von Paaren von Kaninchen mit dem rekombinanten Virus erhalten. Zwei Kaninchen wurden intradermal geimpft mit jeweils 1×10^8 pfu vFP-3. Beide Kaninchen entwickelten typische Pockenläsionen, die eine maximale Größe 5 bis 6 Tage nach der Impfung erreichten. Den Kaninchen wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen und die Seren durch ELISA getestet, um die Anwesenheit von für das Tollwutglykoprotein spezifischen Antikörpern nachzuweisen.

Außerdem wurden 5 Ratten intradermal jeweils mit 5×10^7 pfu vFP-3 geimpft. Alle Tiere entwickelten Läsionen.

30 Sowohl die Kaninchen als auch die Ratten entwickelten nachweisbare Mengen von für Tollwut spezifischen Antikörpern innerhalb von 2 Wochen nach der Impfung. Zwei Kontrollkaninchen, die intradermal mit dem Ausgangs-FP-1-Virus geimpft waren, zeigten keine nachweisbaren Mengen an anti-Tollwut-Antikörpern.

35 Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Antikörperantwort auf die Einführung von Tollwutantigen zurückzuführen ist, das zufällig von dem Impfvirus mitgetragen wurde oder in die Membran des rekombinanten Geflügelpockenvirus integriert war, statt auf, wie vorgeschlagen, de novo Synthese von Tollwutantigenen durch das rekombinante Virus in dem Tier, wurde das vFP-3-Virus chemisch inaktiviert, und damit wurden Kaninchen geimpft.

40 Das gereinigte Virus wurde über Nacht bei 4°C in Gegenwart von 0,001 % β -Propiolacton inaktiviert und danach durch Zentrifugieren pelletiert. Das pelletierte Virus wurde in mit 10 mM Tris gepufferter Kochsalzlösung aufgenommen, ultraschallbehandelt und titriert, um sicherzustellen, daß kein infektiöses Virus übriggeblieben war. Zwei Ratten wurden intradermal mit inaktiviertem vFP-3 und zwei mit einer entsprechenden Menge von unbehandeltem rekombinantem Virus beimpft. Die Größe der Läsionen wurde festgestellt.

45 Beide Kaninchen, die unbehandeltes vFP-3 erhalten hatten, entwickelten typische Pockenläsionen, die 5 Tage nach der Beimpfung als 4-5+ eingestuft wurden. Kaninchen, die mit inaktiviertem Virus beimpft waren, entwickelten ebenso Läsionen, doch diese wurden 5 Tage nach der Impfung als 2+ eingestuft.

50 Den Kaninchen wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen und die Seren durch ELISA auf die Gegenwart von für Tollwut spezifischen Antikörpern und für Geflügelpocken spezifischen Antikörpern getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III

| | Kaninchen | <u>Lebendes vFP-3</u> | | | | <u>Inaktiviertes vFP-3</u> | | | |
|----|-------------------------|-----------------------|------|----------------|------|----------------------------|------|----------------|------|
| | | <u>No. 295</u> | | <u>No. 318</u> | | <u>No. 303</u> | | <u>No. 320</u> | |
| 5 | Antikörper getestet: | Tollwut FP | | Tollwut FP | | Tollwut FP | | Tollwut | FP |
| | Woche P.I | | | | | | | | |
| 10 | 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 |
| 15 | 4 | 1000 | 4000 | 2000 | 4000 | 0 | 4000 | 0 | 2000 |
| | 5 | 4000 | 4000 | 2000 | 4000 | 0 | 2000 | 0 | 4000 |
| 20 | 6 | 4000 | 4000 | 4000 | 4000 | 0 | 2000 | 0 | 2000 |

In diesem Test wurde der Titer-Endwert (ausgedrückt als Kehrwert der Serumverdünnung) willkürlich als 0,2 gesetzt, nachdem die Absorptionwerte aller Seren vor der "Belastungsinfektion" abgezogen waren. Die Kaninchen 295 und 318, die das lebende Virus erhalten hatten, entwickelten eine Immunantwort auf das Tollwutglykoprotein und auf Geflügelpockenvirusantigene. Die Kaninchen 303 und 320 entwickelten ebenfalls eine Immunantwort auf Geflügelpockenvirusantigene; der Titer war jedoch niedriger. Keines dieser Kaninchen entwickelte eine nachweisbare Antwort auf das Tollwutglykoprotein.

Dieser Befund bestätigt, daß die in dem Kaninchen hervorgerufene Immunantwort auf die de novo Expression des in dem rekombinanten Virus enthaltenden Tollwutglykoproteingens zurückzuführen ist und nicht eine Antwort auf irgendein zufällig in dem Impfvirus mitgetragenes Glykoprotein ist.

Beispiel 4B

Konstruktion des rekombinanten Virus vFP-5, das nicht-angesteuerte Tollwut G-Gene enthält, aus Geflügelpocken-virus FP-1

Die Expression eines fremden, durch Rekombination in das Geflügelpockengenom inserierten Gens, erfordert die Anwesenheit eines Promotors. Dies wurde gezeigt durch die Herstellung einer weiteren Rekombinante vFP-5, die mit vFP-3 mit Ausnahme der Weglassung des HH-Promotors identisch ist. Die Gegenwart des Tollwutgens in dieser Rekombinante wurde durch Nucleinsäurehybridisierung bestätigt. Kein Tollwutantigen wurde jedoch in mit dem Virus infizierten CEF-Zellkulturen festgestellt.

Beispiel 5

Versuche mit in vitro Passagieren zum Nachweis, ob Geflügelpockenvirus in nicht-vogelartigen Zellen repliziert.

Ein Versuch wurde durchgeführt, bei dem drei Zellsysteme (eines vogelartig und zwei nicht-vogelartig) mit dem parentalen FP-1-Stamm oder mit rekombinanten vFP-3 beimpft wurden. Jeweils zwei Schalen mit CEF, MRC-5 oder VERO wurden mit FP-1 oder vFP-3 mit einer Eingangsmultiplizität von 10 pfu pro Zelle beimpft.

Nach 3 Tagen wurde jeweils eine Schale geerntet. Das Virus wurde durch drei aufeinanderfol-

gende Zyklen von Einfrieren und Auftauen freigesetzt und auf einen frischen Monolayer derselben Zelllinie wieder geimpft. Dieses wurde über sechs aufeinanderfolgende Passagen wiederholt; am Ende des Experiments wurden Proben jeder Passage auf Virusinfektiosität auf CEF-Monolayern titriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle IVa zusammengefaßt. Sie zeigen, daß eine Reihenpassage sowohl von FP-1 als auch vFP-3 in CEF-Zellen möglich ist, aber in keiner der beiden nicht-vogelartigen Zelllinien. Infektiöses Virus konnte nicht in VERO- oder MRC-5-Zellen nach 3 oder 4 Passagen nachgewiesen werden.

Die zweite Schale wurde benutzt, um festzustellen, ob Virus, das nicht durch direkte Titration nachweisbar war, nach Amplifikation in permissiven CEF-Zellen nachgewiesen werden konnte. Nach 3 Tagen wurden Zellen aus der zweiten Schale durch Abschaben geerntet, ein Drittel dieser Zellen lysiert und auf einen frischen CEF-Monolayer geimpft. Wenn der volle cytopathische Effekt (CPE) erreicht war oder 7 Tage nach der Infektion, wurden die Zellen lysiert. Die Virusausbeute wurde titriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle IVb zusammengefaßt. Wurde Passage in CEF-Zellen benutzt, um ein etwa vorhandenes Virus zu vermehren, konnte kein Virus nach vier oder fünf Passagen nachgewiesen werden.

Versuche, eine permanent infizierte Zelle zu etablieren, schlugen fehl.

In einem weiteren Versuch, Hinweise einer andauernden viralen Expression in nicht-vogelartigen Zellen zu entdecken, wurden die vorstehend zur Virustiterbestimmung benutzten Proben in einem Standardimmunodotest eingesetzt, bei dem anti-Geflügelpocken-Antikörper und anti-Tollwut-Antikörper benutzt wurden, um die Anwesenheit des jeweiligen Antigens nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Tests bestätigen die Titrationsergebnisse.

Tabelle IVA

25

Passagierversuch

| Virus zur Beimpfung Zelltyp | Passage | | FP-1 | | | vFP-3 | |
|--------------------------------|---------|------------------|------------------|------|-------|-------|---------------|
| | | | CEF | VERO | MRC-5 | CEF | VERO MRC-5 |
| 30 | 1 | 6.6 ^a | 4.8 | 4.9 | 6.6 | 5.4 | 6.2 |
| | 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 |
| 35 | 4 | 6.1 | N.D ^b | N.D | 6.2 | N.D | 1.0 |
| | 5 | 6.4 | N.D | N.D | 6.3 | N.D | N.D |
| 40 | 6 | 5.7 | N.D | N.D | 5.9 | N.D | N.D |

a – Virustiter in log₁₀ pfu pro ml.

b – nicht nachweisbar

45

Tabelle IVB

Vermehrungsversuch

| Virus zur Beimpfung Zelltyp | Passage | | FP-1 | | | vFP-3 | |
|--------------------------------|---------|------------------|------|------|-------|-------|---------------|
| | | | CEF | VERO | MRC-5 | CEF | VERO MRC-5 |
| 50 | 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 |

55

| | Virus zur Beimpfung Zelltyp | FP-1 | | | vFP-3 | | |
|----|--------------------------------|------|------------------|-------|-------|------|-------|
| | | CEF | VERO | MRC-5 | CEF | VERO | MRC-5 |
| | Passage | | | | | | |
| 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 | N.D | 6.1 | 4.7 | 4.7 |
| 10 | 6 | 6.2 | N.D ^b | N.D | 6.2 | N.D | N.D |

a – Virustiter in log₁₀ pfu pro ml.

15 b – nicht nachweisbar

Beispiel 6

Zusätzliche Rekombinanten von Geflügelpocken FP-1: vFP-6, vFP-7, vFP-8 und vFP-9

20

Die rekombinanten Viren vFP-6 und vFP-7 wurden nach folgenden Verfahren hergestellt.

Ein 5,5 Kbp Pvu II-Fragment von FP-1 wurde zwischen die beiden Pvu II-Stellen in pUC 9 eingefügt und ergab das Plasmid pRW 731.13. Dieses Plasmid wurde anschließend an einer singulären Hinc II-Stelle gespalten und an den Enden stumpf gemachtes, vom HH-Promotor abhängiges Tollwut G-Gen eingefügt, was die Plasmide pRW 748A und B ergab, die die beiden entgegengesetzten Orientierungen des Inserts darstellen. Die Plasmide pRW 748A und B wurden dann getrennt benutzt, um CEF-Zellen zusammen mit FP-1 Virus zu infizieren und ergaben durch Rekombination vFP-6 bzw. vFP-7. Dieser Genort wird nun als Genort f7 bezeichnet.

Ein 10 Kbp Pvu II-Fragment von FP-1 wurde zwischen die beiden Pvu II-Stellen von pUC 9 eingefügt und ergab pRW 731.15. Dieses Plasmid wurde anschließend an einer singulären Bam HI-Stelle gespalten und anschließend ein vom 11K-Promotor abhängiges lac Z-Genfragment eingefügt, was pRW 749A und B erzeugte, die die entgegengesetzten Orientierungen des Inserts darstellen. Rekombination dieser Donorplasmide mit FP-1 führte zu vFP-8 bzw. vFP-9. Dieser Genort wird nun als Genort f8 bezeichnet.

35 vFP-8 und vFP-9 exprimierten (wie mittels X-gal nachgewiesen) das lac Z-Gen. vFP-6 und vFP-7 exprimierten das Tollwut G-Gen, wie durch ein Tollwut-spezifisches Antiserum nachgewiesen wurde.

Beispiel 7

40

Immunisierung mit vFP-3 zum Schutz von Tieren gegen eine Belastungsinfektion mit lebenden Tollwutviren

45 Gruppen von 20 weiblichen 4 bis 6 Wochen alten SPF-Mäusen wurden mit 50 µl vFP-3 auf der Pfotenfläche mit Dosen im Bereich 0,7 bis 6,7 TCID₅₀ pro Maus beimpft. (Die TCID₅₀ oder tissue culture infectious dose ist diejenige Dosis, bei der 50 % der Gewebekulturzellen einen cytopathischen Effekt erleiden). 14 Tage nach der Impfung wurden 10 Mäuse aus jeder Gruppe geopfert und Serumproben für RFFI-Tests gesammelt. Die übrigen 10 Mäuse wurden einer Belastungsinfektion durch Beimpfung mit 10 LD₅₀ des Tollwutstamms CVS über den intracerebralen Weg ausgesetzt und die überlebenden 14 Tage nach der Belastungsinfektion berechnet.

50 Die Ergebnisse sind in Tabelle VA zusammengefaßt.

55

Tabelle VA

| | Dosis vFP-3 log ₁₀ TCID ₅₀ | Tollwutantikörper Titer log ₁₀ <u>Verdünnung*</u> | <u>Überlebensrate</u> |
|----|---|--|-----------------------|
| 5 | 6,7 | 1,9 | 8/10 |
| | 4,7 | 1,8 | 0/10 |
| | 2,7 | 0,4 | 0/10 |
| 10 | 0,7 | 0,4 | 0/10 |

* Gemessen als RFFI-(Rapid Fluorescent Focus Inhibition) Tests, Laboratory Techniques in Rabies, Third Ed., 354-357, WHO Genf.

Das Experiment wurde mit 12,5 LD₅₀ des Tollwutvirus als Belastungsinfektion wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VB zusammengefaßt.

Tabelle VB

| | Dosis vFP-3 log ₁₀ TCID ₅₀ | Tollwutantikörper Titer log ₁₀ <u>Verdünnung*</u> | <u>Überlebensrate</u> |
|----|---|--|-----------------------|
| 20 | 6,7 | 2,8 | 5/10 |
| | 4,7 | 2,1 | 2/10 |
| 25 | 2,7 | 0,6 | 0/8 |
| | 0,7 | 0,6 | 0/8 |

* Siehe Tabelle VA

Zwei Hunde und zwei Katzen wurden mit einer einzigen subkutanen Impfung mit 8 log₁₀ TCID₅₀ des rekombinanten vFP-3 immunisiert. Zusätzlich wurden 2 Hunde und 4 Katzen von entsprechendem Alter und Gewicht als nicht-geimpfte Kontrollen gehalten. Allen Tieren wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen. Am Tag 94 wurde jeder Hund einer Belastungsinfektion durch Beimpfung in den Schläfenmuskel mit zwei Dosen von 0,5 ml eines Speicheldrüsenhomogenats des NY-Stamms von Tollwutvirus (vom Institute Merieux, Inc. erhältlich), ausgesetzt. Die Gesamtdosis entsprach 10 000 Mäuse LD₅₀ über einen intrazerebralen Weg. Die sechs Katzen wurden auf ähnliche Weise einer Belastungsinfektion durch Beimpfung in den Nackenmuskel mit zwei Dosen von 0,5 ml der gleichen Virussuspension ausgesetzt. Die Gesamtdosis pro Tier entsprach 40 000 Mäuse LD₅₀ über einen intrazerebralen Weg. Die Tiere wurden täglich beobachtet. Alle nicht-geimpften Tiere starben am in der Tabelle VI angezeigten Tag an Tollwutsymptomen. Die geimpften Tiere überlebten die Belastungsinfektion und wurden 3 Wochen lang nach dem Tod des letzten Kontrolltieres beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

Tabelle VI

| | Überleben/ Tier | Impfung | Titer nach Impfung am Tag | | | | | Zeitpunkt des Todes |
|----|--------------------|--------------------|---------------------------|------------------|-----|-----|-----|------------------------|
| | | | 0 | 14 | 21 | 28 | 94 | |
| 50 | 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 |
| 55 | T41 | c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | d/13 |

| | Überleben/ Tier | Impfung | Titer nach Impfung am Tag | | | | | Zeitpunkt des Todes |
|----|--------------------|---------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------|
| | | | 0 | 14 | 21 | 28 | 94 | |
| 5 | Katzen | | | | | | | |
| | T42 | c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | d/12 |
| | 426 | vFP-3 | 0 | 0.8 | 1.0 | 1.1 | 1.2 | + |
| 10 | Hunde | vFP-3 | 0 | 1.5 | 2.3 | 2.2 | 1.9 | + |
| | 55 | c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | d/15 |
| | 8240 | c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | d/16 |

- a- Die mit vFP-3 geimpften Katzen und Hunde erhielten $8 \log_{10}$ TCID₅₀ über den subkutanen Weg.
- b- Titer ausgedrückt als \log_{10} der höchsten Serumverdünnung, die eine Reduktion von mehr als 50 % in der Anzahl der fluoreszierenden Vertiefungen in einem RFFI-Test ergibt.
- c- Nicht-geimpfte Kontrolltiere.
- d- Tier starb/Tag des Todes nach der Belastungsinfektion.
- 15 In weiteren Experimenten wurden die rekombinanten Viren vFP-2 und vFP-3 zur Beimpfung von Rindern über mehrere verschiedene Wege benutzt.
- 20 Geimpfte Tiere wurden auf anti-Tollwutantikörper an den Tagen 6, 14, 21, 28 und 35 getestet. Alle Tiere zeigen eine serologische Antwort auf das Tollwutantigen. Dies ist in Tabelle VII A gezeigt.

Tabelle VIIA

| <u>Antikörpertiter in mit vFP-3 geimpften Säugetieren (Rinder) anti-Tollwut neutralisierende Antikörper RFFI Test \log_{10} Verdünnung</u> | | | | | | | |
|---|------------|-----|------|-----|-----|------|----|
| | <u>Tag</u> | 0 | 6 | 14 | 21 | 28 | 35 |
| Rind Nr. | | | | | | | |
| 7.3 \log_{10} TCID ₅₀ | | | | | | | |
| 35 1420 (intradermal) | negativ | 0.6 | 2 | 1.7 | 1.8 | 1.7 | |
| 8 \log_{10} TCID ₅₀ | | | | | | | |
| 1419 (subkutan) | negativ | 1.6 | 2.2 | 2.1 | 2.1 | 1.9 | |
| 8 \log_{10} TCID ₅₀ | | | | | | | |
| 1421 (intramuskulär) | negativ | 0.9 | 2.2 | 2.1 | 2.1 | 1.9 | |
| 40 7.3 \log_{10} TCID ₅₀ | | | | | | | |
| 1423 (intramuskulär) | negativ | 0.9 | 1.1+ | 1+ | 1+ | 1.1+ | |

+ nicht signifikant

- 45 Alle Rinder wurden am Tag 55 nach der Impfung wieder geimpft mit $8 \log_{10}$ TCID₅₀. Sie zeigten eine anamnetische Antwort auf das Tollwutantigen. In der Verstärkernachimpfung wurden alle Rinder subkutan geimpft außer Nr. 1421, das wieder intramuskulär geimpft wurde. RFFI-Titer wurden bestimmt an den Tagen 55, 57, 63, 70, 77 und 86. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIIB zusammengefaßt.

Tabelle VIIB

| | Tag | 55 | 57 | 63 | 70 | 77 | 86 |
|---|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5 | Rind Nr. | | | | | | |
| | 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 |
| | 1423 | 1.0 | 0.7 | 2.4 | 2.5 | 2.5 | 2.2 |

10

Alle Daten beziehen sich auf vFP-3 außer bei Tier 1423, wo sie sich auf vFP-2 beziehen.
 Rinder, Katzen und Kaninchen wurden auch intradermal mit bekannten Mengen von Geflügel-pockenvirus geimpft. Wundschorf wurde von den Tieren nach etwa 1 Woche gesammelt. Dieser wurde zermahlen, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und zur Bestimmung der Virus-mengen titriert.

15

Nur Restmengen an infektiösem Virus konnten nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß keine Infektion unter Vermehrung in vivo erfolgte.

Beispiel 8

20

Impfung von Hühnern mit vFP-3

Hühner wurden mit rekombinantem Geflügelpockenvirus vFP-3 geimpft, um die Expression von Fremd-DNA durch ein rekombinantes Geflügelpockenvirus in einem System zu zeigen, das eine replikative Vermehrung des Vektors gestattet.

25

Weißer Leghornhühner wurden intramuskulär mit $9 \log_{10}$ TCID₅₀ vFP-3 oder durch Flügeldurchstechen mit $3 \log_{10}$ TCID₅₀ vFP-3 geimpft. Blutproben wurden für einen RFFI-Test auf Tollwutantikörpertiter 21 Tage nach der Impfung entnommen. Titer am Tag 21 in geimpften Hühnern waren signifikant höher als Titer in den Kontrollen am Tag 21. Der Durchschnittstiter der nicht-infizierten Kontrollen betrug 0,6, derjenige der intramuskulär geimpften Vögel 1,9, derjenige der Flügeldurchstochenen Vögel 1,2.

30

Beispiel 9

35

Truthahninfluenza H5 HA-Antigen exprimierende rekombinante Geflügelpocken vFP-11

Vogelarten können mit den rekombinanten Avipoxviren der Erfindung gegen Vogelpathogene immunisiert werden.

40

So wurde das nachstehend beschriebene neue Plasmid pRW 759, das sich vom Geflügelpockenvirus FP-1 ableitet und ein Hämagglutinin (H5) von A/Truthahn/Irland/1378/83 (TYHA) unter der Kontrolle des Hind III H-Promotors enthält, zur Transfektion von gleichzeitig mit dem Elternvirus FP-1 infizierten CEF-Zellen, benutzt. Rekombinantes Geflügelpockenvirus vFP-11 wurde durch die weiter vorstehend beschriebenen Verfahren erhalten.

45

Die Synthese eines Hämagglutininmoleküls in mit vFP-11 infizierten Zellen wurde durch Immunpräzipitation von über den Stoffwechsel radiomarkierten, infizierten Zellsaten unter Benutzung eines spezifischen anti-H5-Antikörpers und Standardverfahren bestätigt. Die spezifische Immunpräzipitation von Vorstufen-Hämagglutinin mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kd (Kilodalton) und zwei Spaltprodukten mit einem Molekulargewicht von 44 und 23 kd wurde gezeigt. Keine derartigen Proteine wurden aus einem Lysat von nicht-infizierten CEF-Zellen oder von mit Elternvirus FP-1 infizierten Zellen ausgefällt.

50

Zum Nachweis, daß das in den mit dem rekombinanten Geflügelpocken vFP-11 infizierten Zellen produzierte HA-Molekül an der Zelloberfläche exprimiert wurde, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Mit dem rekombinanten Geflügelpockenvirus vFP-11 infizierte CEF-Zellen zeigten eine starke Fluoreszenzfärbung an der Oberfläche. In mit dem Elternvirus FP-1 infizierten Zellen wurde keine Fluoreszenz gemessen.

55

Das Plasmid pRW 759 wurde wie folgt hergestellt:

pRW 742B (vgl. Beispiel 4) wird durch teilweisen Verdau mit Pst I linearisiert und das Fragment nachgespalten mit Eco RV, um das Tollwut G-Gen zu entfernen, wobei der HH-Promotor an dem verbleibendem Fragment von etwa 3,4 Kbp bleibt. Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase wird ein synthetisches Oligonucleotid eingefügt, damit der HH-Promotor mit TYHA am ATG verbunden werden kann, was zu pRW 744 führt.

Dieses Plasmid wurde durch teilweisen Verdau mit Dra I linearisiert; das linearisierte Fragment wurde mit Sal I gespalten und das größere Fragment wiedergewonnen und mit alkalischer Phosphatase behandelt.

Schließlich wurde pRW 759 erzeugt durch Einfügen des isolierten Sal I-Dra I-Fragments hergestellt, das die codierende Sequenz von TYHA enthält, in den pRW 744 Vektor, wie von Kawaoka et al., Virology, Bd. 158 (1987), Seiten 218-227 gezeigt wurde.

Beispiel 10

Immunisierung mit vFP-11 zum Schutz von Vögeln gegen eine Belastungsinfektion mit lebendem Influenzavirus

Zum Nachweis der immunogenen Wirkung von rekombinantem Geflügelpockenvirus vFP-11, wurden Impf- und Belastungsinfektion-Experimente in Hühnern und Truthühnern durchgeführt.

Spezifisch pathogenfreie (SPF) weiße Leghornhühner wurden im Alter von 2 Tagen und 5 Wochen durch Durchstechen der Flügelhaut mit einer Doppelnadel geimpft, wie sie für übliche Impfung von Hühnern mit Geflügelpockenvirus benutzt wird. Etwa 2 µl vFP-11 mit 6×10^5 pfu wurde jedem Vogel gegeben. Den älteren Vögeln wurde vor der Impfung Blut entnommen, und allen Vögeln wurde vor der Belastungsinfektion und 2 Wochen später Blut entnommen.

Zu Vergleichszwecken wurde eine zweite Gruppe von Hühnern mit einem üblichen H5-Impfstoff beimpft, der aus einem inaktiviertem H5N2-Stamm in einer Wasser-in-Öl-Emulsion besteht.

Inaktiverter H5N2-Impfstoff wurde aus A/Mallard/NY/189/82 (H5N2) Influenzavirus gewonnen, das in 11 Tage alten befruchteten Hühnereiern gezogen war; die infizierte Allantoisflüssigkeit mit einem HA-Titer von 800/0,1 ml und einem infektiösen Titer von $10^{6,5}$ /0,1 ml wurde mit 0,1 % Propiolacton inaktiviert und in einer Wasser-in-Öl-Emulsion, wie bei Stone et al., Avian Dis., Bd. 22 (1978) Seiten 666-674 und Brugh et al., Proc. Second Inter. Sym. on Avian Influenza (1986), Seiten 283-292 beschrieben, suspendiert. In 0,2 ml Volumen wurde der Impfstoff 2 Tage und 5 Wochen alten SPF weißen Leghornhühnern über den subkutanen Weg unter die Haut auf der Innenseite des Schenkelmuskels verabreicht.

Eine dritte und vierte Gruppe von Hühnern erhielt parenteral ursprüngliches Virus FP-1 bzw. keinen Impfstoff.

Hühner wurden einer Belastungsinfektion unterworfen mit ca. 10^3 LD₅₀ des hochpathogenen A/Turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) oder A/Chick/Penn/1370/83 (H5N2) Influenzavirus durch Verabreichung von 0,1 ml auf die Nasenlöcher jedes Vogels. Zwei Tage alte Vögel wurde einer Belastungsinfektion 6 Wochen nach der Impfung ausgesetzt und 5 Wochen alte Vögel wurden einer Belastungsinfektion 5 Wochen nach der Impfung ausgesetzt. Die Vögel wurden täglich auf Krankheitssymptome beobachtet, die sich durch Anschwellen und Cyanose des Gesichts und des Kammes und durch Blutungen an den Füßen (solche Vögel konnten häufig nicht stehen), Lähmung und Tod anzeigten. Die meisten Todesfälle geschahen zwischen 4 und 7 Tagen nach der Infektion. 3 Tage nach der Infektion wurden Abstriche aus der Trachea und der Cloaca aus jedem lebenden Huhn auf Virus getestet durch Beimpfung von befruchteten Eiern. Die Hühner, die entweder mit Wildtyp oder rekombinantem Geflügelpockenvirus geimpft waren, entwickelten typische Läsionen am Flügelnetzgewebe. Einer Pustelbildung bis zum 3. Tag um jeden Nadelstich herum folgte eine zelluläre Infiltration mit Schorfbildung und Erholung nach 7 Tagen. Es wurden keine sekundären Läsionen gebildet und es gab keinen Hinweis auf eine Verbreitung auf nicht-geimpfte Hühner, die in Kontakt kamen. Die Ergebnisse des Belastungsinfektions-Experiments sind in Tabelle VIII und die damit verbundenen serologischen Befunde in Tabelle IX zusammengefaßt.

Tabelle VIII

Durch in Geflügelpocken exprimiertes H5 vermittelter Schutz von Hühnern

| | Belastungs- infektion | Impfstoff | Alter der Hühner | Schutz Krank/Tot/Gesamt | Virus | |
|----|--------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------|--------|
| | | | | | Trachea | Gloaca |
| 5 | | | | | | |
| 10 | Ty/Ireland (H5N8) | Geflügel- pocken-H5 (vFP-11) | 2 Tage | 0/0/10 | 0/10 | 0/10 |
| | | | 5 Wochen | 0/0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 15 | | inaktivier- ter H5N2 | 2 Tage | 0/0/9 | 0/9 | 0/9 |
| | | | 5 Wochen | 0/0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 20 | | Geflügel- pocken- Kontrolle | 2 Tage | 10/9/10 | 2/6 | 3/6 |
| | | | 5 Wochen | 4/3/5 | 0/5 | 4/5 |
| | | Kein | 2 Tage | 10/9/10 | 2/7 | 5/7 |
| 25 | | | 2 Tage* | 2/1/2 | 2/2 | 2/2 |
| | | | 5 Wochen | 2/2/5 | 0/5 | 1/5 |
| 30 | Ck/Penn (H5N2) | Geflügel- pocken-H5 (vFP-11) | 2 Tage | 0/0/10 | 8/10 | 0/10 |
| | | | 5 Wochen | 0/0/6 | 5/6 | 2/6 |
| 35 | | inaktivier- ter H5N2 | 2 Tage | 0/0/8 | 2/8 | 0/8 |
| | | | 5 Wochen | 0/0/5 | 3/5 | 0/5 |
| 40 | | Geflügel- pocken- Kontrolle | 2 Tage | 10/1/10 | 10/10 | 10/10 |
| | | | 5 Wochen | 5/0/5 | 5/5 | 5/5 |
| | | Kein | 2 Tage | 9/3/9 | 9/9 | 9/9 |
| 45 | | | 2 Tage* | 2/2/2 | 2/2 | 2/2 |
| | | | 5 Wochen | 5/2/5 | 5/5 | 5/5 |

* Vier nicht geimpfte Vögel wurden zusammen mit der Geflügelpocken-H5-Gruppe von 10 Vögeln gehalten und aufgezogen, um die Ausbreitung von Geflügelpocken-H5 nachzuweisen.

Tabelle IX

Durch Impfung mit vFP-11 oder einem inaktiviertem Influenzavirusimpfstoff hervorgerufene Antikörperbildung.

| Belastungs- infektion | Impfstoff | Alter der Hühner | HI Titer auf (a) | | Festsetzung der Infektiosität | | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|------------|-----------------------|
| | | | Ty/Ireland | | Ck/Penn | | Ty/Ireland | |
| | | | Post-1 | Post-2 | Post-1 | Post-2 | Post-1 | Post-2 |
| Ty/Ireland (H5N8) | Geflügelpocken -H5 | 2 Tage | 15 ^(c) | 156 | < | 65 | 70 | 2,500 |
| | | 5 Wochen | 100 | 480 | < | 20 | 160 | 10,000 |
| | inaktiviertes | 2 Tage | 30 | 70 | 30 | 50 | 65 | 1,000 |
| | H5N2 | 5 Wochen | 350 | 600 | 180 | 200 | 240 | 2,500 |
| | Geflügelpocken | 2 Tage | < | 160 ^{(1)(b)} | < | 20 | < | 300 ⁽¹⁾ |
| | Kontrolle | 5 Wochen | < | 1280 ⁽²⁾ | < | 60 | < | 10,000 ⁽²⁾ |
| | kein | 2 Tage | < | 80 ⁽¹⁾ | < | 20 | < | 300 ⁽¹⁾ |
| | | 5 Wochen | < | 2000 ⁽³⁾ | < | 60 | < | 70 ⁽³⁾ |
| Ck/Penn/ | Geflügelpocken | 2 Tage | 15 | 600 | < | 90 | < | 70 |
| | -H5 | 5 Wochen | 80 | 2500 | < | 300 | < | 2,500 |
| | inaktiviertes | 2 Tage | 60 | 300 | 20 | 70 | 10 | 400 |
| | H5N2 | 5 Wochen | 300 | 500 | 100 | 200 | 150 | 1,500 |
| | Geflügelpocken | 2 Tage | < | 60 ⁽⁶⁾ | < | 120 | < | 40 |
| | Kontrolle | 5 Wochen | < | 90 | < | 140 | < | 40 |
| | kein | 2 Tage | < | 60 ⁽⁶⁾ | < | 160 | < | 25 |
| | | 5 Wochen | < | 160 ⁽³⁾ | < | 150 | < | 70 |

(a) Den 5 Wochen alten Vögeln wurde vor der Impfung Blut entnommen, das in HI- und Neutralisationstests geprüft wurde; keiner enthielt nachweisbare Mengen an Antikörper; die Ergebnisse sind nicht gezeigt. Den 2 Tage alten Hühnern wurde 6 Wochen nach Impfung (Post-1) und den 5 Wochen alten Vögeln wurde 5 Wochen nach Impfung (Post-1) Blut entnommen; beiden Gruppen wurde 2 Wochen nach der Belastungsinfektion (Post-2) Blut entnommen. Die Zahlen stellen gemittelte Antikörpertiter aus der gleichen wie in Tabelle I beschriebenen Gruppe von Hühnern dar.

(b) Die Zahlen in Klammern geben an, wieviel die Belastungsinfektion überlebten.
< = weniger als 10

(c) Hämagglutinationshemmungstests (HI) wurden in Mikrotiterplatten ausgeführt, wobei Rezeptor-zerstörende-Enzymbehandelte Seren verwendet wurden (4 HA-Einheiten von Ty/Ire Virus, und 0,5 % Hühnererythrocyten wie beschrieben bei Palmer et al., Immun. Series Nr. 6, 51-52, U.S. Dept. Health, Education and Welfare (1975)). Die Infektivitäts-Neutralisierungstests wurden ausgeführt, indem 10^3 EID₅₀ von Ty/Ire-Virus mit Verdünnungen der Seren für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, dem eine Impfung mit Aliquots in befruchtete Eier folgte. Viruswachstum wurde bestimmt durch Hämagglutinationstests nach Bebrütung der Eier für 2 Tage bei 33°C.

Hühner, die mit dem rekombinanten Geflügelpocken-H5 (vFP-11) oder dem inaktiviertem H5N2-Influenzaimpfstoff in Adjuvans beimpft wurden, waren vor der Belastungsinfektion mit dem homologen Ty/Ire (H5N8) Influenzavirus und dem verwandten, aber unterscheidbaren Ck/Penn (H5N2)-Influenzavirus geschützt. Im Gegensatz dazu zeigte die Mehrheit der Vögel, die mit dem Ausgangs-FPV beimpft waren oder keinen Impfstoff erhalten hatten, klinische Anzeichen von hochpathogener Influenza einschließlich einem Anschwellen und einer Cyanose im Gesicht und Kamm, Blutungen an den Füßen und Lähmungen. Die Mehrheit dieser Vögel starb. Die geimpften Vögel schieden keine nachweisbaren Mengen von Ty/Ire, aber Ck/Penn aus.

Sowohl die inaktivierten als auch die rekombinanten Impfstoffe induzierten HI und neutralisierende Antikörper auf Ty/Ire, doch die Mengen an Antikörper, die von der Geflügelpocken-H5-Rekombinante vFP-11 vor der Belastungsinfektion induziert waren, hemmten nicht HA oder neutralisierten das heterologe Ck/Penn H5. Ungeachtet dessen waren die Hühner vor einer Belastungsinfektion sowohl mit Ty/Ire als auch mit Ck/Penn-Influenzaviren geschützt.

Durch Impfung mit vFP-11 induzierte Immunität gegen H5-Influenza dauerte mindestens 4 bis 6 Wochen und war kreuzreagierend. Zum Nachweis der Dauer und Spezifität der Antwort wurde eine Gruppe von 4 Wochen alten Hühnern in das Flügelnetzgewebe mit vFP-11 wie zuvor beschrieben geimpft und in monatlichen Abständen mit dem kreuzreagierenden Ck/Penn-Virus einer Belastungsinfektion ausgesetzt. Wiederum waren keine HI-Antikörper vor der Belastungsinfektion nachweisbar. Ungeachtet dessen waren die Vögel auch nach 4 Monaten geschützt.

Außerdem induziert das durch vFP-11 exprimierte H5 eine schützende Immunantwort in Truthühnern. Weiße Outbreed-Truthühner wurden im Alter von 2 Tagen und 4 Wochen durch Beimpfung am Flügelnetzwerk wie vorbeschrieben beimpft. Die Ergebnisse sind in Tabelle X zusammengefaßt.

Tabelle X

Durch in vFP-11 exprimiertem H5-HA vermittelter Schutz von Truthühner.

| Impfstoff | Alter der Vögel | Schutz krank/tot/gesamt | Virusnachweis Trachea Cloaca | HI-Antikörper Ty/lre | | Neutralisierende Antikörper log ₁₀ zu Ty/lre | |
|------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------|---|-----------|
| | | | | Post 1 | Post-2 | Post-1 | Post-2 |
| vFP-11 Rekombinante | 2 Tage | 1/1/5 | 5/5 | 3/5 | < 10 | 160 | < 1 4.32 |
| | 4 Wochen | 2/1/6 | 2/6 | 0/6 | < 10 | 640 | 1.05 4.16 |
| Kontakt Kontrollen | 2 Tage | 2/2/2 | 2/2 | 2/2 | < 10 | tot | < 1 tot |
| | 4 Wochen | 2/2/2 | 2/2 | 2/2 | < 10 | tot | < 1 tot |

In beiden Altersgruppen wurde eine signifikante Überlebensrate gegen eine Belastungsinfektion mit dem homologen Ty/ire-Virus beobachtet. Nicht geimpfte Kontaktkontrollvögel wurden zusammen mit den geimpften Vögeln gehalten, um eine Verbreitung des rekombinanten Virus zu prüfen. Diese Vögel überlebten die Belastungsinfektion nicht.

5

Beispiel 11

Konstruktion der das Hühnerinfluenza-Nucleoprotein (NP)-Gen exprimierenden Geflügelpockenvirus FP-1-Rekombinante vFP-12

10

Das Plasmid pNP33 enthält einen cDNA-Clon des Influenzavirus Hühner/Pennsylvania/1/83 Nucleoproteingens (NP). Nur die 5'-und 3'-Enden des etwa 1,6 Kbp langen NP-Gens wurden sequenziert. NP wurde aus pNP 33 in mit Sma I verdautem pUC 9 überführt als ein stumpfendiges 5' Cla I-Xho I 3'-Fragment, wobei die pUC 9-Eco RI-Stelle am 3'-Ende war, wodurch pRW 714 erzeugt wurde. Das Translationsstartcodon (ATG) von NP enthält die folgende unterstrichene Aha II-Stelle: ATGGCGTC. Der vorher beschriebene Vaccinia H6-Promotor wurde mit NP mittels eines doppelsträngigen synthetischen Oligonucleotids verbunden. Das synthetische Oligonucleotid enthielt die H6-Sequenz von der Eco RV-Stelle bis zum ATG und bis zur NP codierenden Sequenz an der Aha II-Stelle. Das Oligonucleotid wurde mit Enden, die mit Bam HI und Eco RI kompatibel waren, zur Insertion in pUC 9 synthetisiert und führte zu pRW 755. Beginnend an dem mit Bam HI kompatiblen Ende, mit dem ATG unterstrichen, ist die Sequenz des doppelsträngigen synthetischen Oligonucleotids die folgende:

15

20

GATCCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCGTCG
GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACCGCAGCTTAA

25

Das lineare Produkt eines teilweisen Verdaus von pRW 755 mit Aha II wurde isoliert und nachgespalten mit Eco RI. Das pRW 755-Fragment, das einen einzigen Aha II-Schnitt am ATG enthielt und mit Eco RI nachgespalten war, wurde isoliert, mit Phosphatase behandelt, und als Vektor für das Verdauungsprodukt von pRW 714 (siehe nachstehend) benutzt.

30

Das isolierte, lineare Produkt eines Partialverdaus mit Aha II von pRW 714 wurde mit Eco RI nachgespalten. Ein die codierende Sequenz für NP enthaltendes isoliertes Aha II-Eco RI Fragment von etwa 1,6 Kbp wurde in den pRW 755 Vektor eingesetzt und führte zu pRW 757. Der vollständige H6-Promotor wurde gebildet, indem die Sequenzen oberhalb (5') der Eco RV-Stelle hinzugefügt wurden. Das Plasmid pRW 742B (beschrieben in Beispiel 4) hatte die H6-Sequenz unterhalb (3') der Eco RV-Stelle mit den Sequenzen bis zu der Nde I Stelle in pUC 9 entfernt. Das mit Phosphatase behandelte Eco RV-Nde I Fragment von pRW 742B wurde als Vektor für das pRW 757-Fragment (siehe nachstehend) benutzt. Das isolierte lineare Produkt eines Partialverdaus von pRW 757 mit Eco RV wurde nach einer Spaltung mit Nde I wiedergewonnen; dieses Fragment enthält den H6-Promotor von der Eco RV-Stelle über NP bis zu der Nde I Stelle in pUC 9. Das pRW 757-Fragment wurde in den pRW 742B-Vektor inseriert und bildete pRW 758. Das Eco RI Fragment von pRW 758, das das vom H6-Promotor abhängige vollständige NP enthält, wurde mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I an den Enden glatt gemacht und in die Hinc II-Stelle von pRW 731.13 inseriert und ergab pRW 760. Die Hinc II Stelle von pRW 731.13 ist der FP-1-Genort, der in Beispiel 6 zur Konstruktion von vFP-6 und vFP-7 verwendet wurde.

35

40

45

50

Unter Benutzung von Geflügelpocken FP-1 als auffangendem Virus wurde das Plasmid pRW 760 für einen *in vitro* Rekombinationstest verwendet. Die Plaques der Nachkommenschaft wurden getestet und gereinigt mittels *in situ* Plaquehybridisierung. Expression des Gens wurde durch Immunpräzipitationsstudien unter Benutzung eines polyclonalen Ziegen-anti-NP-Antiserums bestätigt. Die Größe des Proteins, das insbesondere aus einem Lysat von mit vFP-12 infizierten CEF-Zellen präzipitiert wurde, war etwa 55 kD, was innerhalb des veröffentlichten Bereichs von Influenzanucleoproteinen liegt.

Beispiel 12

Produktion einer Vogelinfluenza-Nucleoprotein (NP)- und Hämagglutinin (HA)-Gene exprimierenden Doppelrekombinante vFP-15 von Geflügelpockenvirus

55

Das Hämagglutinin (HA)-Gen aus A/Tyr/Ire/1378/83 wurde im Zusammenhang mit der Konstruktion von vFP-11 (Beispiel 9) beschrieben. Bei der Herstellung der Doppelrekombinante wurde das HA-Gen zuerst in den zuvor bei der Herstellung von vFP-8 unter Benutzung des Plasmids pRW 731.15 beschriebenen Locus f8 gebracht.

Das zur Konstruktion von vFP-11 benutzte Plasmid war pRW 759. Das mit den H6-Promotor verbundene Hämagglutinin wurde aus diesem Plasmid durch einen partialen Verdau mit Pst I entfernt. Dieses Fragment wurde dann an den Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I glatt gemacht, in die glattgemachte Bam HI-Stelle von pRW 731.15 inseriert und ergab so pRW 771.

Das Plasmid pRW 771 wurde dann in einen in vitro Rekombinationstest unter Benutzung von vFP-12 als auffangendem Virus eingesetzt. Das rekombinante Virus vFP-12 enthält das mit dem H6-Promotor verbundene Nucleoprotein am Genort f7, wie er im Plasmid pRW 731.13 definiert ist. Rekombinante Plaques, die nun beide Insertionen enthielten, wurden ausgewählt und mittels in situ Hybridisierung und Oberflächenexpression des Hämagglutinins plaque-gereinigt, was durch einen protein-A- β -galactosidase-verbundenen Immunttest bestätigt wurde. Die Expression beider Gene wurde durch Immunpräzipitation aus mit dem doppelrekombinanten Virus vFP-15 infizierten Zellsäten nachgewiesen.

Beispiel 13

Konstruktion von rekombinanten Kanarienviren

Das folgende Beispiel zeigt die Identifizierung von vier nicht-essentiellen Insertions-Loci in dem Kanarienvirengenom und die Konstruktion von vier rekombinanten Kanarienviren vCP-16, vCP-17, vCP-19 und vCP-20.

Die Kanarienviren-Rekombinante vCP-16 wurde wie folgt hergestellt.

Ein 3,4 Kbp Pvu II Fragment von Kanarienviren-DNA wurde in pUC 9 cloniert und führte zu pRW 764.2. Es wurde eine singuläre Eco RI-Stelle gefunden, die asymmetrisch in dem Fragment mit einem kurzen Arm von 700 bp und einem langen Arm von 7,2 Kbp liegt. Das Plasmid wurde mit Eco RI verdaut und unter Verwendung von Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I glattgemacht. Das glattgemachte H6/Tollwut G-Gen wurde danach mit dieser Stelle ligiert und zur Transformation von *E. coli* benutzt. Das daraus hervorgehende Plasmid pRW 775 wurde für einen in vitro Rekombinationstest benutzt. In einem Immunoscreen-Verfahren positive Nachkommenplaques wurden ausgewählt und plaque-gereinigt. Die daraus hervorgehende Rekombinante wurde als vCP-16 und der Insertions-Locus als C3 bezeichnet.

Das in der vorstehenden Konstruktion benutzte Plasmid pRW 764.2 enthielt außerdem eine singuläre Bgl II-Stelle etwa 2,4 Kbp von der Eco RI-Stelle entfernt. Unter Benutzung der gleichen Clonierungsstrategie wurde das H6/Tollwut G Gen mit dem Plasmid pRW 764.2 an dieser Stelle ligiert und führte zu pRW 774. Dieses Plasmid wurde zur Konstruktion der Rekombinante vCP-17 mit dem als C4 bezeichneten Insertionslocus benutzt.

Das Plasmid pRW 764.5 enthält ein 850 bp Pvu II-Fragment von Kanarienviren-DNA mit einer singulären Bgl II-Stelle, die asymmetrisch in dem Fragment 400 bp von einem Ende liegt. Unter Benutzung der wie vorher beschriebenen Clonierungsstrategie wurde das mit dem H6-Promotor verbundene Tollwut G-Gen an dieser Stelle inseriert und ergab das Plasmid pRW 777. Das damit hergestellte stabile rekombinante Virus wurde als vCP-19 und der Insertionslocus als C5 bezeichnet.

Plasmid pRW 764.7 enthält ein 1,2 Kbp Pvu II-Fragment mit einer singulären Bgl II-Stelle 300 Basen von einem Ende. Dieses Plasmid wurde mit Bgl II verdaut und mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I an den Enden glatt gemacht. Das an den Enden glatt gemachte lac Z-Gen mit dem 11K-Promotor wurde eingefügt und führte zu Plasmid pRW 778. Das unter Benutzung dieses Plasmids hergestellte stabile rekombinante Virus wurde als vCP-20 und der Insertionslocus als C6 bezeichnet.

Beispiel 14Konstruktion eines das Fusionsprotein von Newcastle Disease Virus exprimierenden rekombinanten Geflügelpockenvirus vFP-29

Plasmid pNDV 108, der cDNA-Clon des Fusionsgens von NDV-Stamm Texas, besteht aus einem Hpa I cDNA-Fragment von etwa 3,3 Kbp, das sowohl die codierende Sequenz für das Fusionsprotein als auch zusätzliche, in die Sca I-Stelle von pBR 322 clonierte, codierende NDV-Sequenzen enthält. Schritte zur Herstellung des Insertionsplasmids sind nachstehend beschrieben.

(1) Herstellung von Plasmid pCE 11

Ein FPV-Insertionsvektor, pCE 11, wurde durch Einfügen von Polylinkern an der Hinc II-Stelle von pRW 731.13 hergestellt (bezeichnet als Locus f7). pRW 731.13 enthält ein 5,5 Kbp Pvu II-Fragment von FP-1-DNA. Ein nicht-essentieller Locus wurde vorstehend definiert an der Hinc II-Stelle durch Konstruktion der in Beispiel 6 beschriebenen stabilen Rekombinante vFP-6. Die an der Hinc II-Stelle eingefügten Polylinker enthalten die folgenden Restriktionsenzym-Schnittstellen: Nru I, Eco RI, Sac I, Kpn I, Sma I, Bam HI, Xba I, Hinc II, Sal I, Acc I, Pst I, Sph I, Hind III und Hpa I.

(2) Herstellung von Plasmid pCE 19

Dieses Plasmid ist eine weitere Modifikation von pCE 11, in das das Vacciniavirus-Transkriptionstoppsignal ATTTTNT (L. Yuen und B. Moss, J. Virology, Bd. 60 (1986), Seiten 320-323) (in diesem Fall ist N ein A) zwischen die Sac I- und Eco RI-Stellen von pCE 11 mit Verlust der Eco RI-Stelle eingefügt worden ist.

(3) Einfügung von codierenden NDV-Sequenzen

Ein über ein Gel gereinigtes 1,8 Kbp Bam HI-Fragment, das mit Ausnahme von 22 Nucleotiden vom 5'-Ende des Fusionsproteingens alle Nucleotide enthielt, wurde in die Bam HI-Stelle von pUC 18 eingefügt und bildete pCE 13. Dieses Plasmid wurde mit Sal I verdaut, das in dem Vektor 12 Basen oberhalb des 5'-Endes der codierenden Sequenz spaltet. Die Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aufgefüllt und das Plasmid anschließend mit Hind III verdaut, das 18 Basen oberhalb der Sal I-Stelle spaltet. Ein über ein Gel gereinigtes 146 bp Sma I - Hind III-Fragment, das den in den bevorzugten Ausführungsformen beschriebenen Vacciniavirus-H6-Promotor sowie auch Polylinkersequenzen an jedem Ende enthielt, wurde mit dem Vektor ligiert und in E. coli Zellen transformiert. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde als pCE 16 bezeichnet.

Um das ATG Startcodon des NDV-Fusionproteingens mit dem 3'-Ende des H6-Promotors in Ablesephase zu bringen und die in pCE 16 vom NDV 5'-Ende fehlenden 22 Nucleotide zu ersetzen, wurde ein komplementäres synthetisches Oligonucleotid mit Eco RV- und Kpn I-Stellen an den Enden entwickelt. Die Oligonucleotidsequenz war:

5' - ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-GGC-TCC-
AGA-TCT-TCT-ACC-AGG-ATC-CCG-GTA-C 3'.

Die Konstruktion pCE 16 wurde anschließend mit Eco RV und Kpn I verdaut. Die Eco RV-Stelle liegt in dem H6 Promotor 24 Basen oberhalb des Initiations-ATG. Die Kpn I-Stelle liegt in der codierenden NDV Sequenz 29 Basen unterhalb des ATG.

Die Oligonucleotide wurden miteinander hybridisiert, phosphoryliert und mit dem linearisierten Plasmid verbunden. Die daraus hervorgehende DNA wurde zur Transformation von E. coli Zellen benutzt. Dieses Plasmid wurde als pCE 18 bezeichnet.

Zur Insertion codierender NDV-Sequenzen in einen FPV Insertionsvektor wurde ein über ein Gel gereinigtes 1,9 Kbp Sma I-Hind III-Fragment von pCE 18 (wobei in der Polylinkerregion gespalten wird) mit einem 7,8 Kbp Sma I-Hind III-Fragment von pCE 19 (wie vorstehend beschrieben) ligiert. Das Transkriptionsstartsignal liegt 16 Basen unterhalb der Sma I-Stelle. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde als pCE 20 bezeichnet.

Das Plasmid pCE 20 wurde in einem in vitro Rekombinationstest eingesetzt, wobei Geflügel-pockenvirus FP-1 als auffangendes Virus benutzt wurde. Die daraus hervorgehende Nachkommenschaft wurde auf CEF-Monolayers plattiert und die Plaques wurden einem β -Galactosidase-Protein-A Immunist unter Verwendung eines polyclonalen Hühner-anti-NDV-serums unterworfen. In der Färbung positive Plaques wurden ausgewählt und 4 Runden einer Plaquereinigung unterzogen, um eine homogene Population zu erhalten. Die Rekombinante wurde vFP-29 genannt.

Beispiel 15

Konstruktion von Katzenleukämievirus-(FeLV) Hüll-(ENV)-Glykoprotein exprimierende Avipox-virusrekombinanten

Das FeLV-env-Gen enthält die Sequenzen, welche das p70 + p15E Polyprotein codieren. Dieses Gen wurde zunächst in das Plasmid pSD467vC mit dem dem FeLV-env-Gen vorangestellten Vaccinia H6-Promotor eingefügt. Zuvor wurde das Plasmid pSD467vC durch die Einfügung eines 1802 bp Sal I/Hind III-Fragments, das das Vaccinia-Hämagglutinin (HA)-Gen enthält, in einen pUC 18 Vektor erhalten. Die Lage des HA-Gens wurde zuvor bestimmt (Shida, Virology, Bd. 150 (1988), Seiten 451-462). Die Mehrheit des das HA-Genprodukt codierenden offenen Leserahmens wurde deletiert (Nucleotid 443 bis Nucleotid 1311) und eine multiple Clonierungsstelle, die Bgl II-, Sma I-, Pst I- und Eag I-Restriktionsendonucleasestellen enthielt, eingefügt. Das resultierende Plasmid pSD467vC enthält flankierende Arme aus Vaccinia von 442 bp aufwärts 5'-seitig von der multiplen Clonierungsstelle und 491 bp 3'-seitig von diesen Restriktions-Schnittstellen. Diese flankierenden Arme ermöglichen es, daß in die multiple Clonierungsregion eingefügtes Material in die HA-Region des Kopenhagen-Stamms von Vaccinavirus rekombiniert werden kann. Die daraus hervorgehende rekombinante Nachkommenschaft ist HA-negativ.

Der H6-Promotor war synthetisiert worden durch das Aneinanderhängen von vier überlappenden Oligonucleotiden, die zusammen die vorstehend in den bevorzugten Ausführungsformen beschriebene vollständige Sequenz umfaßten. Das daraus hervorgehende 132 bp-Fragment enthielt eine Bgl II-Restriktions-Schnittstelle am 5'-Ende und eine Sma I-Stelle am 3'-Ende. Dieses wurde in pSD467vC über die Bgl II- und Sma I-Restriktions-Schnittstellen eingefügt. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde als pPT15 bezeichnet. Das FeLV-env-Gen wurde in die unmittelbar 3'-seitig von dem H6-Promotor liegende singuläre Pst I-Stelle von pPT15 inseriert. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde als pFeLV1A bezeichnet.

Zur Konstruktion der FP-1 Rekombinante wurde die 2,4 Kbp H6/FeLV-env-Sequenz aus pFeLV1A durch Spaltung mit Bgl II und partielle Spaltung mit Pst I ausgeschnitten. Die Bgl II-Stelle liegt an der 5'-Grenze der H6-Promotorsequenz. Die Pst I Stelle liegt 420 bp nach dem Terminationsignal der Translation für den offenen Leserahmen des Hüll-Glykoproteins.

Die 2,4 Kbp H6/FeLV-env-Sequenz wurde in mit Bam HI und Pst I gespaltenen pCE 11 eingefügt. Der FP-1-Insertionsvektor, pCE 11, leitet sich ab von pRW 731.13 durch Einfügung einer multiplen Clonierungsstelle in die nicht-essentielle Hinc II-Stelle. Dieser Insertionsvektor gestattet die Herstellung von FP-1-Rekombinanten, die fremde Gene im Locus f7 des FP-1 Genoms enthalten. Das rekombinante FP-1/FeLV-Insertionsplasmid wurde als pFeLVFI bezeichnet. Diese Konstruktion bietet kein vollständiges ATG zur ATG-Substitution.

Um eine vollständige ATG:ATG-Konstruktion zu erreichen, wurde ein Nru I/Sst II-Fragment von etwa 1,4 Kbp aus dem Vaccinavirusinsertionsvektor pFeLV1C abgeleitet. Die Nru I-Stelle liegt innerhalb des H6-Promotors in einer Position von 24 bp oberhalb von dem ATG. Die Sst II-Stelle liegt 1,4 Kbp 3'-seitig des ATG und 1 Kbp 5'-seitig von dem Terminationssignal der Translation. Dieses Nru I/Sst II-Fragment wurde mit einem 9,9 Kbp-Fragment ligiert, das durch Verdau mit Sst II und partiellen Verdau mit Nru I erzeugt war. Dieses 9,9 Kbp-Fragment enthält die 5,5 Kbp der FP-1 flankierenden Arme, die pUC Vektorsequenzen, 1,4 Kbp an den dem 3'-Ende des env-Gens entsprechenden Abschnitten der FeLV-Sequenz und die Sequenz ganz am 5'-Ende des H6-Promotors (ca. 100 bp). Das daraus hervorgehende Plasmid wurde als pFeLVF2 bezeichnet. Die ATG:ATG-Konstruktion wurde durch Nucleotidsequenzanalyse bestätigt.

Ein weiterer FP-1 Insertionsvektor, pFeLVF3, wurde aus pFeLVF2 durch Entfernen der dem wahrscheinlichen Immunsuppressionsbereich entsprechenden FeLV-env-Sequenzen abgeleitet

(Cianciolo et al., Science, Bd. 230 (1985), Seiten 453-455) (Nucleotid 1548 bis 1628 der codierenden Sequenz). Dieses wurde erreicht durch Isolierung eines Sst II/Pst I-Fragments (Stellen sind oben beschrieben) von etwa 1 Kbp aus dem Vacciniavirus-Insertionsvektor pFeLV1D. Das Plasmid pFeLV1D ist ähnlich dem Plasmid pFeLV1C mit der Ausnahme, daß die dem Immunsuppressionsbereich entsprechenden env-Sequenzen (Nucleotid 1548 bis 1628) durch Oligonucleotid-gesteuerte Mutagenese (Mandecki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 83 (1987), Seiten 7177-7181) entfernt worden waren. Das 1 Kbp Sst II/Pst I-Fragment ohne die Nucleotide 1548 bis 1628 wurde in ein 10,4 Kbp Sst II/Pst I-Fragment eingefügt, das das übrige aus pFeLVF2 abgeleitete H6:FeLV-env-Gen enthält.

Die Insertionsplasmide, pFeLVF2 und pFeLVF3, wurden für *in vitro* Rekombinationstests mit FP-1 als dem auffangenden Virus benutzt. Nachkommenschaft der Rekombination wurde auf CEF Monolayer plattiert und rekombinante Viren wurden durch Plaque-Hybridisierung auf CEF Monolayern ausgewählt. Mittels Hybridisierungsanalyse identifizierte rekombinante Nachkommenschaft wurde ausgewählt und 4 Runden einer Plaquareinigung unterworfen, um eine homogene Population zu erhalten. Eine FP-1-Rekombinante, die das vollständige FeLV-env-Gen enthielt, wurde als vFP-25 und eine FP-1-Rekombinante, die das vollständige Gen mit Ausnahme des Immunsuppressionsbereichs enthielt, als vFP-32 bezeichnet. Für beide Rekombinanten wurde durch Immunpräzipitation unter Benutzung eines polyclonalen Rinder-anti-FeLV polyclonalen Serums (Antibodies, Inc., Davis, Ca) gezeigt, daß sie das richtige Genprodukt exprimieren. Es ist von Bedeutung, daß diese FP-1-Rekombinanten das fremde FeLV-env-Gen in der von Katzen stammenden CRFK-Zelllinie (ATCC #CCL94) exprimieren.

Zur Konstruktion von Kanarienviren-(CP)-Rekombinanten, wurde ein H6:FeLV-env-Sequenzen enthaltendes 2,2 Kbp-Fragment aus pFeLVF2 durch Spaltung mit Sma I und Hpa I ausgeschnitten. Die Sma I-Stelle liegt an der 5'-Grenze der H6-Promotorsequenz. Die Hpa I-Stelle liegt 180 bp 3'-seitig von dem Terminationssignal der Translation für den offenen Leserahmen des Hüllglykoproteins.

Die 2,2 Kbp H6:FeLV-env-Sequenz wurde in die nicht-essentielle Eco RI-Stelle des Insertionsplasmids pRW 764.2 eingesetzt, nachdem die Enden der Eco RI-Stelle glatt gemacht waren. Dieser Insertionsvektor gestattet die Erzeugung von CP-Rekombinanten, die fremde Gene im Locus C4 des CP-Genoms enthalten. Das rekombinante CP-Insertionsplasmid wurde als pFeLVCP2 bezeichnet. Diese Konstruktion bietet eine perfekte ATG:ATG-Substitution.

Das Insertionsplasmid, pFeLVCP2, wurde in einem *in vitro* Rekombinationstest mit CP als dem auffangenden Virus eingesetzt. Nachkommenschaft der Rekombinante wurde auf CEF Monolayer plattiert und rekombinantes Virus mittels eines mit Protein-A-verbundenen β -Galactosidaseimmuntests unter Verwendung eines kommerziellen polyclonalen Rinder-anti-FeLV Serums (Antibodies, Inc., Davis, CA.) ausgewählt. In der Färbung positive Plaques wurden ausgewählt und 4 Runden einer Plaque-Reinigung unterzogen, um eine homogene Population zu erhalten. Eine Rekombinante, die das gesamte FeLV-env-Gen exprimiert, wurde als vCP-36 bezeichnet.

Beispiel 16

Konstruktion von Rous-assoziiertem Virus Typ 1-(RAV-1)-Hüll-(env)-Gen exprimierendem rekombinantem Geflügelpockenvirus vFP-22

Der Clon penvRV1PT des RAV-1-Hüll-Gens enthält 1,1 Kbp der codierenden Sequenz von RAV-1-env-DNA, cloniert als Kpn I-Sac I-Fragment in M13mp18. Dieses am 5'-Ende vollständige Fragment, dem aber ein Teil der Sequenz am 3'-Ende fehlt, wurde in den folgenden Manipulationen benutzt. Ein über ein Gel gereinigtes 1,1 Kbp Eco RI-Pst I-Fragment aus penvRV1PT wurde in die Eco RI- und Pst I-Stellen von pUC 9 eingefügt und ergab pRW 756. Dieses Plasmid wurde anschließend mit Kpn I und Hind III gespalten, wodurch der Vektor 59 Basen oberhalb des ATG gespalten wurde. Ein 146 bp Kpn I - Hind III-Fragment, das den vorher beschriebenen Vaccinia H6-Promotor enthielt, wurde zur Konstruktion von Plasmid pCE 6 eingefügt.

Um sicherzustellen, daß das Initiations ATG des RAV-env-Gens unter Deletion überfälliger Sequenzen neben dem 3'-Ende des H6-Promotors war, wurden zwei komplementäre synthetische Oligonucleotide mit Eco RV- und Ban II-Stellen an den Enden hergestellt. Die Oligonucleotid-

sequenz war

5'-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-AGG-CGA-GCC-3'.

Das Plasmid pCE 6 wurde mit Eco RV gespalten, das in dem H6 Promotor 24 Basen vor dem ATG spaltet, und mit Ban II, das in der RAV-env-codierenden Sequenz 7 Basen nach dem ATG spaltet. Die DNA-Abschnitte wurden ligiert und zur Transformation von E. coli Zellen benutzt. Das daraus hervorgehende Plasmid, pCE 7, stellte den H6-Promotor und die korrekte 5'-Sequenz für die abschließende Konstruktion zur Verfügung.

Durch Restriktionskartierung wurde gefunden, daß Clon mp19env (190) das vollständige RAV-1-env-Gen enthält. Ein das vollständige Gen enthaltendes 1,9 Kbp Kpn I-Sac I-Fragment von mp19env (190) wurde in die Kpn I- und Sac I-Stellen von pUC 18 eingesetzt und bildete pCE 3. Dieses Plasmid wurde mit Hpa I, das 132 Basen nach dem Initiations-ATG in der RAV-1 codierenden Sequenz spaltet, und mit Sac I, das am 3'-Ende des Gens spaltet, verdaut. Der vorstehend beschriebene FPV-Insertionsvektor pCE 11 wurde mit Sma I und Sac I gespalten, die das Plasmid in der Polylinkerregion schneiden. Das Hpa I - Sac I-Fragment von pCE 3 wurde mit pCE 11 ligiert und bildete pCE 14.

Das Plasmid pCE 7 wurde anschließend mit Xho I und Hind III gespalten, um den H6-Promotor und ein die korrekte 5'-Sequenz enthaltendes 332 Basenpaar-Fragment zur Verfügung zu stellen. Plasmid pCE 14 wurde mit Hind III verdaut, das in der Polylinkerregion des Vektors spaltet, und mit Xho I, das in der codierenden Sequenz spaltet. Diese DNA wurde mit dem aus pCE 7 erhaltenen Hind III - Xho I-Fragment verknüpft und bildete pCE 15, die abschließende Konstruktion mit dem RAV-1-Hüll-Gen.

Dieses Plasmid wurde in einem *in vitro* Rekombinationstest mit Geflügelpocken FP-1 als dem aufnehmenden Virus eingesetzt. Die Nachkommenschaft der Rekombination wurde auf CEF Monolayer plattiert und Plaques in einem Immunassay mit einem mit β -Galactosidase verbundenen Protein A unter Verwendung eines polyclonalen anti-RAV-1 Serums geprüft. In der Anfärbung positive Plaques wurden ausgewählt und vier Runden einer Plaque-Reinigung unterworfen, um eine homogene Population zu erzielen. Die hergestellte Rekombinante wurde als vFP-22 bezeichnet. Immunpräzipitationsexperimente unter Verwendung von mit vFP-22 infizierten CEF-Lysaten zeigten die spezifische Präzipitation von zwei Proteinen mit Molekulargewichten von 76,7 kD und 30 kD, die den beiden Genprodukten des Hüll-Gens entsprechen. Kein Vorläufer-Genprodukt war sichtbar.

In vorläufigen Tests wurde eine Immunantwort auf RAV-I Hüll-Genprodukt mit vFP-22 beimpf-ten Hühnern induziert.

Beispiel 17

Konstruktion von das GP51,30 Hüll(env)-Gen von Rinderleukämievirus-(BLV)-exprimierenden Avipoxvirus-Rekombinanten

(1) Konstruktion von pBLVF 1 und pBLVF 2

Die Plasmide pBLVF 1 und pBLVF 2 enthalten das gp51,30 env-Gen von BLV. In beiden Plasmiden ist das BLV-Gen unter der Transkriptionskontrolle des Vacciniavirus H6-Promotors und ist zwischen die flankierenden Arme von Geflügelpockenvirus (Locus f7) cloniert. Die Nucleotidsequenz der beiden Plasmide ist identisch mit Ausnahme der Codonpositionen 268 und 269. (pBLVF 1 codiert ein Protein mit den Aminosäuren Arg-Ser an diesen beiden Positionen, während pBLVF 2 ein Protein codiert, das die Aminosäuren Gln-Thr enthält).

pBLVF 1 und pBLVF 2 wurden nach folgenden Verfahren hergestellt: Das das vollständige BLV-env-Gen enthaltende Plasmid pNS97-1 wurde mit Bam HI und partiell mit Mst II gespalten. Das das vollständige gp51,30 Gen enthaltende 2,3 Kbp-Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und die überstehenden Enden (sticky ends) mit E. coli DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt. Anschließend wurden Pst I-Linker an die Enden des Fragments ligiert, was nach Spaltung mit Pst I in die Pst I-Stelle von pTP 15 ligiert wurde (Beispiel 15). Dies bringt das BLV-Gen neben den Vaccinia H6-Promotor (pTP15 enthält den in einen im Vacciniagenom nicht-essentiellen Locus clonierten Vaccinia H6-Promotor).

Anschließend wurde dieses Plasmid mit Eco RV und partiell mit Ava II gespalten. Das 5,2 Kbp-Fragment wurde isoliert und die Oligonucleotide

5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCCCAAAGAACGACG-3' und

5'-GACCGTCGTTCTTTGGGCATTACGATACAACTTAACGGAT-3' benutzt, um das Plasmid zu rezirkularisieren. Dies entfernt unnötige Basen zwischen dem BLV-Gen und den H6-Promotor.

Das daraus hervorgehende Plasmid wurde mit Pst I und partiell mit Bgl II gespalten und das das unter dem H6-Promotor stehende BLV-Gen enthaltende 1,7 Kbp-Fragment wurde in die Bam HI-Pst I-Stelle von pCE 11, dem vorstehend beschriebenen Geflügelpocken-Insertionsvektor, unter Verwendung des Locus f7 cloniert. Dies bringt das BLV-Gen neben den H6-Promotor zwischen die flankierenden Arme aus Geflügelpockenvirus. Dieses Plasmid wurde als pBLVF 1 bezeichnet.

Ein identisches Verfahren wurde benutzt, um pBLVF 2 zu konstruieren, mit der Ausnahme, daß vor der Clonierung des BLV-Gens unter dem H6-Promotor in pCE 11 ein zusätzlicher in vitro Mutageneseschritt durchgeführt wurde. Diese Mutagenese wurde mit dem folgenden Verfahren durchgeführt. Plasmid pNS97-1 wurde mit Xma I und partiell mit Stu I gespalten. Das 5.2 Kbp-Fragment wurde isoliert und die Oligonucleotide

5'-CCGGGTCAGACAACTCCCGTCGCAGCCCTGACCTTAGG-3' und

5'-CCTAAGGTCAGGGCTGCGACGGGAGTTTGTCTGAC-3' benutzt, um das Plasmid zu rezirkularisieren. Dies ändert die Nucleotidsequenz der Codons 268 und 269 von CGC-AGT nach CAA-ACT.

(2) Konstruktion von rekombinanten Viren

Die Plasmide pBLVF 1 und pBLVF 2 wurden in einem in vitro Rekombinationstest eingesetzt unter Verwendung von FP-1 als auffangendem Virus. Rekombinante Nachkommenschaft wurde ausgewählt über in situ Plaquehybridisierung. Sobald die Population aufgrund dieser Kriterien als rein eingeschätzt wurde, wurde mit einem β -Galactosidase-Protein A Immunoassay unter Verwendung einer Präparation eines für BLV gp spezifischen monoclonalen Antikörpers geprüft. Beide aus den Plasmiden pBLVF 1 bzw. pBLVF 2 hergestellten rekombinanten vFP 23 und vFP 24 zeigten eine positive Färbung in dem Immunttest. Dies zeigt, daß ein immunologisch nachweisbares Glykoprotein auf der Oberfläche der infizierten Zellen exprimiert wurde.

Die Plasmide pBLVK 4 und pBLVK 6 enthalten das BLV env gp51,30 Gen bzw. das BLV gp51,30 Gen minus einer Abspaltung. Beide Gene sind in die singuläre Eco RI-Stelle von pRW 764.2 (Locus C3) cloniert (pRW 764.2 ist in Beispiel 13 beschrieben) und unter der Transkriptionskontrolle des Vaccinia H6-Promotors.

Die Plasmide wurden nach folgendem Verfahren erhalten: pBLVF1 und pBLVF 2 wurden mit den Restriktionsenzym Hind III gespalten. Das Oligonucleotid BKL 1 (AGCTTGAATTCA) wurde in diese Stelle cloniert, wobei eine Eco RI-Stelle auf der 3'-Seite des BLV Gens erzeugt wurde. Da es außerdem eine Eco RI-Stelle auf der 5'-Seite des BLV Gens gibt, wurden diese Plasmide (pBLVK 1 und pBLVK 2) mit Eco RI gespalten und das das BLV Gen unter dem H6-Promotor enthaltende Fragment in die Eco RI-Stelle von pRW 764.2 cloniert. Die daraus hervorgehenden Plasmide wurden als pBLVK 4 bzw. pBLVK 6 bezeichnet. Diese Plasmide wurden in einem in vitro Rekombinationstest mit Kanarienvockenvirus als dem auffangenden Virus eingesetzt. Rekombinanten wurden ausgewählt und gereinigt aufgrund der Oberflächenexpression des Glykoproteins, die in einem Immunassay überprüft wurde. Rekombinanten wurden auf der Grundlage der Oberflächenexpression des Glykoproteins ausgewählt und gereinigt, wie es im Immunassay nachgewiesen wurde. Die Rekombinanten wurden als vCP 27 und vCP 28 der Plasmide pBLVK 4 bzw. pBLVK 6 bezeichnet.

Mit den Geflügelpockenrekombinanten vFP 23 und vFP 24 wurden Schafe und Rinder über eine Anzahl von Wegen geimpft. Den Tieren wurden zwei Impfungen gegeben, die zweite 45 Tage nach der ersten. Serumproben wurden 5 Wochen nach der ersten Impfung und zwei Wochen nach der zweiten Impfung entnommen.

Antikörper gegen gp51 wurde in einem kompetitiven ELISA-Test bestimmt und der Titer als der Kehrwert der Verdünnung angegeben, die eine 50 %-ige Reduktion der Verdrängung gab. Die Ergebnisse sind in Tabelle XI zusammengefaßt.

Keine der getesteten Arten zeigte eine nachweisbare Immunantwort nach der ersten Impfung.

Sowohl Schafe als auch Rinder zeigten einen signifikanten Anstieg der Antikörper nach der zweiten Impfung.

Tabelle XI

Impfung von Schafen und Rindern mit vFP23 und vFP24

| | <u>Tier</u> | | <u>Virus</u> | <u>Dosis und Route</u> | | <u>ELISA</u> | | <u>Titer</u> | |
|----|-------------|-----|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|--|------------------|--|
| | | | | 1° | 2° | 1° | | 2° | |
| 10 | Rind | B56 | FP-1 | 10 ⁸ +10 ^{8a} | 10 ⁸ +10 ⁸ | 0 | | 0 | |
| | | B59 | FP-1 | ID | subkutan | 0 | | 0 | |
| | Schaf | M89 | FP-1 | | | 0 | | 0 | |
| | | M91 | FP-1 | | | 0 | | 0 | |
| 15 | Rind | B62 | vFP23 | 10 ⁸ +10 ⁸ | 10 ⁸ +10 ⁸ | 0 | | 200 ^b | |
| | | B63 | vFP23 | ID | subkutan | 0 | | 80 | |
| | Schaf | M83 | vFP23 | | | 0 | | 80 | |
| | | M84 | vFP23 | | | 0 | | 500 | |
| | | M85 | vFP23 | | | 0 | | 100 | |
| 20 | Rind | B52 | vFP24 | 10 ⁸ +10 ⁸ | 10 ⁸ +10 ⁸ | 0 | | 200 | |
| | | B53 | vFP24 | ID | subkutan | 0 | | 60 | |
| | Schaf | M87 | vFP24 | | | 0 | | 200 | |
| | | M92 | vFP24 | | | 0 | | 20 | |
| 25 | | M93 | vFP24 | | | 0 | | 20 | |

^a Intradermales (ID) Spritzen erfolgte an zwei Stellen

^b Titer ausgedrückt als Kehrwert der Verdünnung, die 50 % Hemmung gibt

Beispiel 18

Konstruktion der das infektiöses Bronchitisvirus Mass 41-Matrixgen exprimierende Geflügel-pockenvirus vFP-1- Rekombinante vFP-26

Plasmid pIBVM63 enthält einen infektiöses Bronchitisvirus (IBV) cDNA-Clon des Matrixgens vom Stamm Mass 41. Ein 8 Kbp Eco RI-Fragment von pIBVM63 enthält das Matrixgen mit dem Peplomergen oberhalb (5') und noch weiter oberhalb eine Eco RV-Stelle. Plasmid pRW 715 hat einen Eco RI-Linker, der die beiden Pvu II-Stellen von pUC 9 verbindet. Das 8 Kbp Eco RI-Fragment aus pIBVM63 wurde in die pRW 715 Eco RI-Stelle eingefügt und führte zu pRW 763. Plasmid pRW 776 wurde erzeugt, um die 5'-seitige Eco RI-Stelle vom pRW 763 herauszunehmen und so eine singuläre Eco RI-Stelle unterhalb (3') des Matrixgens übrig zu lassen. Das isolierte lineare Produkt eines Eco RI-Partialverdau von pRW 763 wurde mit Eco RV nachgespalten. Das größte Fragment wurde isoliert, mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I an den Enden glatt gemacht und mit sich selbst ligiert, wodurch pRW 776 erzeugt wurde. Die Konstruktion pRW 776 besitzt das komplette IBV Peplomer und die Matrixgene, gefolgt von einer singulären Eco RI-Stelle.

Nur die 5'- und 3'-Enden des etwa 0,9 Kbp langen Matrixgens wurden sequenziert. Die 5'-Sequenz des Matrixgens, die am Initiationscodon (ATG) der Translation beginnt, enthält die folgende unterstrichene Rsa I-Stelle:

ATGTCCAACGAGACAAATTGTAC. Der vorher beschriebene H6-Promotor wurde an das Matrixgen mit einem synthetischen Oligonucleotid gefügt. Das synthetische Oligonucleotid enthielt die

H6-Sequenz von seiner Eco RV-Stelle bis zum ATG und bis hinein in die codierende Sequenz des Matrixgens bis zur ersten Rsa I-Stelle. Das Oligonucleotid wurde mit Bam HI- und Eco RI-kompatiblen Enden zur Insertion in pUC 9 synthetisiert und führte zu pRW 772. Das Eco RI-Ende ist auf der 3'-Seite von der Rsa I-Stelle. Anfangend mit dem Bam HI-kompatiblen Ende ist die Sequenz

des doppelsträngigen, synthetischen Oligonucleotids die folgende, wobei das ATG unterstrichen ist:

GATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCCAACGAGACAAATTGTACG
CGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAGGTTGCTCTGTTTAACATGCTTAA

5 Das lineare Produkt des Rsa I-Partialverdaus von pRW 772 wurde isoliert und nachgespalten mit Eco RI. Das pRW 772-Fragment, das nur einmal an der vorstehend genannten Rsa I-Stelle und an der Eco RI-Stelle gespalten war, wurde isoliert, mit Phosphatase behandelt und als Vektor für das Produkt des Verdaus von pRW 776 (siehe nachstehend) benutzt.

10 Das lineare, isolierte Produkt des Rsa I-Partialverdaus mit Rsa I von pRW 776 wurde mit Eco RI nachgespalten. Die Eco RI-Stelle liegt unmittelbar nach dem 3'-Ende des Matrixgens. Ein isoliertes, die codierende Matrixsequenz ab der vorstehend genannten Rsa I-Stelle enthaltendes, etwa 0,8 Kbp langes Rsa I-Eco RI-Fragment wurde in den vorstehend genannten Vektor pRW 772 eingefügt und führte zu pRW 783. Der vollständige H6-Promotor wurde gebildet durch Hinzufügen der Sequenzen, die auf der 5'-Seite der Eco RV-Stelle liegen. Das 5'-Ende des H6-Promotors war eine Hinf I-Stelle, die mit glatt gemachten Enden in die Sal I-Stelle von pUC 9 eingefügt war und so zu einer Eco RI-Stelle wurde; auf der 5'-Seite des H6-Promotors liegt die Hind III-Stelle von pUC 9. Das die 5'-Seite des H6-Promotors enthaltende Hind III-Eco RV-Fragment wurde zwischen die Hind III- und Eco RV-Stellen von pRW 783 inseriert und führte zu pRW 786. Das vollständige, von dem H6-Promotor abhängige Matrixgen enthaltende Eco RI-Fragment von pRW 786 wurde an den Enden mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I glatt gemacht, in die an den Enden glatt gemachte Bam HI-Stelle von pRW 731.15 (Locus f8) eingefügt und erzeugte so pRW 789. Die pRW 731.15 Bam HI-Stelle ist der in Beispiel 6 zur Konstruktion von vFP-8 verwendete FP-1 Locus.

20 Das Plasmid pRW 789 wurde zur Konstruktion von vFP-26 benutzt. Rekombinante Plaques wurden ausgewählt und einer in situ Plaquehybridisierung unterworfen.

25 Vorläufige Tests ergaben, daß eine Immunantwort auf das IBV Matrixprotein in mit vFP-26 geimpften Hühnern induziert worden ist.

Beispiel 19

30

Konstruktion der das infektiöse Bronchitisvirus-(IBV)-Peplomer exprimierenden Geflügelpockenvirus-FP-1-Rekombinante vFP-31

35 Der infektiöse Bronchitisvirus (IBV) Mass 41 cDNA-Clon pIBVM 63 und sein Subclon, pRW 776, wurden bei der Konstruktion von vFP-26 in Beispiel 18 beschrieben. Subclon pRW 776 enthält das 4 Kbp IBV Peplomergen, dem das Matrixgen mit einer singulären Eco RI-Stelle am 3'-Ende folgt. Nur die 5'- und 3'-Enden des ca. 4 Kbp langen IBV Peplomergens wurden sequenziert. Eine singuläre Xba I-Stelle trennt die beiden Gene. Das 5'-Ende des Peplomergens, das mit dem Initiationscodon (ATG) der Translation beginnt, enthält die folgende unterstrichene Rsa I-Stelle:

40 ATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTAC.

Der vorstehend beschriebene H6-Promotor wurde mit dem Peplomergen über ein synthetisches Oligonucleotid verknüpft. Das synthetische Oligonucleotid enthält die H6-Promotorsequenz von seiner Nru I-Stelle bis zum ATG und in die codierende Peplomersequenz bis zu ihrer ersten Rsa I-Stelle. Das Oligonucleotid wurde mit Bam HI- und Eco RI-kompatiblen Enden zur Insertion in pUC 9 synthetisiert und führte zu pRW 768. Das Eco RI-Ende liegt auf der 3'-Seite der Rsa I-Stelle. Beginnend mit dem Bam HI-kompatiblen Ende ist die Sequenz des doppelsträngigen synthetischen Oligonucleotids wie folgt, wobei das ATG unterstrichen ist:

45 GATCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTTGGTAACACCTCTT
AGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAACCATTGTGGAGAA

50 TTAGTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTACG
AATGATCACTGAGAAAACACACATGCTTAA

Das isolierte lineare Produkt eines Partialverdaus mit Rsa I von pRW 768 wurde mit Eco RI nachgespalten. Das einen einzelnen Schnitt an der vorstehend genannten Rsa I-Stelle und einen Nachschnitt mit Eco RI enthaltende pRW 768-Fragment wurde isoliert, mit Phosphatase behandelt und als Vektor für das nachstehend beschriebene Verdauungsprodukt von pRW 776 verwendet.

55

Das isolierte lineare Produkt eines Rsa I-Partialverdau von pRW 776 wurde mit Eco RI nachgespalten. Das 5 Kbp pRW 776-Fragment bis zu der Eco RI-Stelle, das einen einzelnen Schnitt an der vorgenannten Rsa I-Stelle enthielt, isoliert; das Fragment enthält IBV-Sequenzen von der vorgenannten Peplomer Rsa I-Stelle bis zu der Eco RI-Stelle am 3'-Ende des Matrixgens. Die Insertion des pRW 776-Fragments in den vorgenannten Vektor pRW 768 führte zu pRW 788. Das Matrixgen wurde an der vorgenannten Xba I-Stelle entfernt. Die 5'-Seite des H6-Promotors wurde durch Insertion des an den Enden glatt gemachten 4 Kbp langen pRW 788 Nru I-Xba I-Fragments in den an den Enden Nru I-Bam HI glatt gemachten Vektor pRW 760 an der Nru I-Stelle eingefügt und führte zu pRW 790. Der Vektor pRW 760 ist in Beispiel 11 beschrieben; kurz gesagt handelt es sich um ein Influenzanucleoprotein unter Kontrolle des Vaccinia H6-Promotors, das von dem nicht-essentiellen FP-1 Locus f7 flankiert ist. Der Vektor pRW 760 wurde erzeugt durch Entfernen der H6-Sequenzen auf der 3'-Seite von der Nru I-Stelle bis zum Ende des Nucleoproteins an Bam HI. pRW 790 ist ein IBV Peplomer unter dem Promotor H6 in der Hinc II-Stelle von pRW 731.13. Rekombination des Donorplasmids pRW 790 mit FP-1 führte zu vFP-31. Immunpräzipitationsexperimente unter Benutzung von CEF-Lysaten, die aus mit vFP-31 infizierten Zellen gewonnen wurden, zeigten spezifische Präzipitation einer kleinen Menge von Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 180 kD und von Spaltprodukten von 90 kD.

Beispiel 20

Konstruktion der Herpes Simplex gD exprimierenden Geflügelpockenvirus-FP-1-Rekombinante vFP-30

Das Herpes simplex Virus (HSV) Typ 1 Glykoprotein D-Gen (gD) vom Stamm KOS wurde in die Bam HI-Stelle von pUC 9 als ein am 5'-Bam HI-Ende mit Hpa II-NruI-Fragment, das mit dem am 3'-Bam HI-Ende verknüpft wurde, cloniert; das 5'-Ende liegt unmittelbar neben der Pst I-Stelle von pUC 9. Die 5'-Sequenz von HSV gD, die mit dem Initiationscodon (ATG) der Translation beginnt, enthält die folgende unterstrichene Nco I Stelle:

ATGGGGGGGGCTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTGTTTGTCTCATAGTG-
GGCCTCCATGG.

Der vorstehend beschriebene Vaccinia H6-Promotor wurde an das HSV gD-Gen über ein synthetisches Oligonucleotid verknüpft. Das synthetische Oligonucleotid enthält den 3'-Abschnitt des H6-Promotors von der Nru I-Stelle zum ATG und weiter zur codierenden Sequenz von gD bis zur Nco I-Stelle. Das Oligonucleotid wurde mit einem Pst I-kompatiblen Ende auf der 5'-Seite synthetisiert. Der gD Clon in pUC 9 wurde mit Pst I und Nco I gespalten und die HSV-Sequenz am 5'-Ende zum Austausch mit dem synthetischen Oligonucleotid entfernt, was zu pRW 787 führte. Die Sequenz des doppelsträngigen synthetischen Oligonucleotids ist:

GTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGAGGTGCCG-
ACGTCAGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACCCTCCACGGC-

CAGCTAGATTAGGTGCTGTTATTTTATTTGTAGTTATAGTAGGACTC
GTCGATCTAATCCACGACAATAAAATAAACATCAATATCATCCTGAGGTAC

Verdau von pRW 787 mit Nru I und Bam HI erzeugt ein Fragment von etwa 1,3 Kbp, das die 3'-Seite des H6-Promotors von der Nru I-Stelle durch die codierende Sequenz von HSV gD hindurch bis zur Bam HI-Stelle enthält. Der mit Nru I und Bam HI gespaltene Vektor pRW 760 wurde in Beispiel 11 beschrieben. Die Insertion eines 1,3 Kbp Fragments in den Vektor pRW 760 führte zu pRW 791. Der Vektor pRW 791 enthält das vollständige HSV gD Gen unter den Vaccinia H6-Promotor in der nicht-essentiellen Hinc II-Stelle in FP-1 in pRW 731.13 (Locus f7).

Rekombination des Spenderplasmids pRW 791 mit FP-1 führte zu vFP-30. Oberflächenexpression des Glykoproteins wurde in rekombinanten Plaques nachgewiesen unter Verwendung von mit β -Galactosidase verknüpftem Protein A und für HSV-1 spezifischen Seren.

Beispiel 21

Verwendung von Entomopockenpromotoren zur Regulation der Expression von Fremdgenen in Pockenvirenvektoren

(a) Hintergrund

Pockenviren von Insekten (Entomopocken) werden gegenwärtig in der Unterfamilie Entomopoxvirinae eingeordnet, die weiter unterteilt wird in drei Gattungen (A, B und C), die Entomopockenviren entsprechen, die aus den Insektenordnungen Coleoptera, Lepidoptera bzw. Orthoptera isoliert wurden. Entomopockenviren haben in der Natur einen engen Wirtsbereich und es ist nicht bekannt, daß sie in irgendeiner Vertebratenart replizieren.

Das in den vorliegenden Untersuchungen benutzte Virus wurde ursprünglich aus infizierten Larven von Amsacta moorei (Lepidoptera: arctidae) aus Indien isoliert; vgl. Roberts und Granados, J. Invertebr. Pathol. Bd. 12, (1968), Seiten 141-143. Das Virus, bezeichnet als AmEPV, ist die Leitart für Genus B.

Wildtyp AmEPV wurde von Dr. R. Granados (Boyce Thomson Institute, Cornell University) als infektiöse Hämolymphe von infizierten Estigmene acrea-Larven erhalten. Es wurde gefunden, daß das Virus in der Invertebraten-Zelllinie IPLB-LD652Y repliziert, die aus Ovariumgeweben von Lymantria dispar (Schwammspinner) (beschrieben bei Goodwin et al., In Vitro Bd. 14 (1978) Seiten 485-494) gewonnen wurde. Diese Zellen wurden bei 28°C in IPL-528-Medium gezogen, das mit 4 % fötalem Kälber- und 4 % Hühnerserum supplementiert war.

Das Wildtyp-Virus wurde auf Plaques auf LD652Y-Zellen geprüft und ein Plaque, als V1 bezeichnet, wurde für weitere Experimente ausgewählt. Dieses Isolat ruft zahlreiche Einschlußkörperchen (OBs) im Cytoplasma der infizierten Zellen gegen Ende des Infektionszyklus hervor.

(b) Promotoridentifizierung

Die Identifizierung und Kartierung eines AmEPV-Promotors wurde wie folgt erreicht. Gesamt-RNA aus infizierten LD652Y-Zellen (48 Stunden nach der Infektion; späte Phase) wurde isoliert und benutzt, um mit 32P-markierte erste Strang-cDNA zu erzeugen. Die cDNA wurde dann benutzt, um "Blots" zu prüfen, die Restriktionsverdaus von AmEPV-Genom enthielten. Dieser Southern Blot führte zur Aufdeckung eines starken Signals auf einem 2,6 kb Cla I-Fragment, was anzeigte, daß dieses Fragment ein stark exprimiertes Gen codierte. Das Fragment wurde in einen Plasmidvektor cloniert und seine DNA-Sequenz bestimmt.

Analyse der Sequenzdaten ergab einen offenen Leserahmen, der in der Lage war, ein 42 kD Polypeptid zu codieren. In vitro Translation der Gesamt-RNA zum Zeitpunkt 48 Stunden nach der Infektion und Auftrennung der Produkte über SDS-PAGE führte zu einem Polypeptid von ca. 42 kD.

(c) Konstruktion eines rekombinanten Vacciniavirus mit der Expression eines Fremdgens unter der Kontrolle des Entomopockenvirus-Promotors.

Um zu bestimmen, ob ein Entomopockenvirus-Promotor in einem Vertebraten-Pockenvirussystem funktionieren würde, wurde das folgende Plasmid konstruiert: ein Oligonucleotid wurde chemisch synthetisiert, das 107 Basen von der 5'-Seite des Translationsstartsignals des 42K Gens (nachfolgend als AmEPV 42K-Promotor bezeichnet) enthielt und von einer Bgl II-Stelle am 5'-Ende und am 3'-Ende von den ersten 14 Basen der codierenden, an einer Eco RI-Stelle aufhörenden Region von Hepatitis B-Virus pre-S2 flankiert ist. Die AmEPV 42K-Promotorsequenz ist im folgenden beschrieben:

```

TCAAAAAAATATAAATGATTCACCATC
TGATAGAAAAAAAATTTATTGGAAGA
ATATGATAATATTTTGGGATTTCAA
ATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATG

```

Der AmEPV 42K-Promotor wurde mit dem Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (HBVsAG) wie folgt ligiert. Ein das Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen und den codierenden Bereich von pre-S2 (Typ ayw wie beschrieben bei Galibert et al., Nature Bd. 281 (1979), Seiten 646-650) enthaltendes pUC-Plasmid wurde erzeugt, das von den Vacciniavirusarmen in der nicht-essentiellen Region des Vacciniavirusgenoms, das das Hämagglutinin-(HA)-Molekül codiert (HA-Arme beschrieben in Beispiel 15; HA-Region beschrieben von Shida, Virology Bd. 150 (1986), Seiten 451-462) flankiert

war. Das vorstehend beschriebene Oligonucleotid wurde in dieses Plasmid eingefügt, indem die singuläre Eco RI-Stelle in den HBVsAg codierenden Bereich und die singuläre Bgl II-Stelle in dem HA-Vacciniaarm benutzt wurde. Das daraus hervorgehende rekombinante Vacciniavirus wurde als vP 547 bezeichnet.

Die Expression der codierenden HBVsAg-Sequenz unter der Kontrolle des Entomopocken 42K-Promotors wurde mit einem Immunoassay nachgewiesen. Entsprechende Kulturen der Säugetierzelllinie BSC-40 wurden mit Ausgangsvacciniavirus oder der Rekombinante vP 547 infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat in Reihenverdünnungen auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Die Membran wurde zuerst mit einem Ziegen-anti-HBV-Serum und anschließend mit 125 J-Protein A inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein Röntgenfilm mit der Membran belichtet. Positive Signale wurden in mit vP 547 infizierten Kulturen, jedoch nicht in mit Elternvirus infizierten Kulturen gefunden, was eine Erkennung des AmEPV 42K-Promotors durch Vacciniavirus in Säugetierzellen andeutet.

Die vorstehenden Ergebnisse wurden bestätigt durch Verwendung eines Ausria-Assays (vgl. Beispiel 1 für Details), um HBVsAg in infizierten Säugetierzellen nachzuweisen. Vacciniavirusrekombinanten, die entweder das HBVsAg-Gen an AmEPV42K oder an den Vacciniavirus H6-Promotor gekoppelt hatten, wurden verwendet, um BSC-40 Zellen zu infizieren; das Ausmaß der Expression von sAg wurde in einem Ausria-Test ermittelt. Wie in Tabelle XII dargestellt, zeigen die Daten, daß die Menge an Expression von HBVsAg bei Verwendung des 42K-Promotors signifikant war.

Tabelle XII

Expression von HBVsAg in rekombinantem Vacciniavirus

| <u>RekombinantesVirus</u> | <u>Promotor</u> | <u>Ausria P/N-Verhältnis</u> |
|---------------------------|-----------------|------------------------------|
| vP-410 | Kontrolle | 1,0 |
| vP-481 | H6 | 24,3 |
| VP-547 | 42K | 44,9 |

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um die zeitabhängige Natur der Regulation des AmEPV 42K Promotors in einem Vertebraten-Pockenvirussystem zu bestätigen. Gleichartige Kulturen von BSC-40 Zellen wurden mit vP 547 in Gegenwart oder Abwesenheit von 40 µg/ml Cytosin Arabinosid, einem deshalb die späte virale Transkription blockierenden Inhibitor der DNA-Replikation infiziert. Die Mengen der Expression wurden in einem Ausria-Test 24 Stunden nach Infektion überprüft. Die Ergebnisse zeigen, daß der 42K Promotor als ein früher Promotor in einem Vacciniavirus-Replikationssystem erkannt wurde.

Die Verwendung des AmEPV 42K-Promotors zur Expression von Fremdgenen in einem Säugetiersystem ist ersichtlich verschieden von der Verwendung des Autographa californica NPV Polyhedrin-Promotors zur Genexpression in Invertebraten-Systemen (Luckow und Summers, Biotechnology, Bd. 6 (1988), Seiten 47-55). Der Polyhedrinpromotor wird nicht durch den Transkriptionsapparat in Säugetierzellen erkannt (Tjla et al., Virology, Bd. 125 (1983), Seiten 107-117). Die Verwendung des AmEPV 42K-Promotors in Säugetierzellen zeigt erstmals, daß ein Insektenviruspromotor zur Expression von fremden Genen in einem nicht-insektenviralen Vektor in Nicht-Invertebratenzellen benutzt worden ist.

Um festzustellen, ob Avipoxviren ebenfalls den 42K-Entomopockenpromotor erkennen würden, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Identische Kulturen von CEF-Zellen wurde mit 10 pfu pro Zelle entweder von Geflügelpockenvirus, Kanarienvirus oder Vacciniavirus geimpft und gleichzeitig mit 25 µg eines der folgenden Plasmide transfiziert: 1) Plasmid 42K.17, das die HBV pre-S₂ + sAg codierende Sequenz mit dem 42K-Promotor verknüpft enthielt oder 2) Plasmid pMP15.spsP, das die identische HBVsAg codierende Sequenz mit dem Vacciniavirus H6-Promotor verknüpft enthält. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gefroren und lysiert und die Lysate unter Verwendung eines Ausria-Tests (siehe Beispiel 1) auf die Gegenwart von HBVsAg überprüft.

Die in Tabelle XIII gezeigten Ergebnisse sollten in einem qualitativen Sinn betrachtet werden. Sie deuten an, daß der Transkriptionsapparat sowohl von Geflügelpockenvirus als auch von Kana-

riepockenvirus in der Lage ist, den 42K-Promotor zu erkennen und die Transkription der damit verbundenen codierenden HBVsAg-Sequenz gestattet. Obwohl die Mengen an Expression niedriger sind als die mit dem Vacciniavirus H6-Promotor, liegen die Mengen deutlich über den Hintergrundmengen, die man mit den negativen Kontrollen erhält.

5

Tabelle XIIIErkennung des 42K Entomopockenviruspromotors durch Avipoxviren

| <u>Virus</u> | <u>Promotor</u> | <u>Verhältnis P/N</u> |
|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Geflügelpocken | 42K | 39,1 |
| | H6 | 356,8 |
| Kanarienvpocken | 42K | 90,2 |
| | H6 | 222,2 |
| Vaccinia | 42K | 369,4 |
| | H6 | 366,9 |
| Kein | 42K | 7,8 |
| Kein | H6 | 7,2 |
| Vaccinia | - | 7,2 |

Beispiel 22Immunisierung mit VCP-16 zum Schutz von Mäusen gegen eine Belastungsinfektion mit lebendem Tollwutvirus

30

Gruppen von 20 vier bis sechs Wochen alten Mäusen wurden in der Pfotenfläche mit 50 bis 100 µl einer Reihe von Verdünnungen von einer der beiden folgenden Rekombinanten beimpft: (a) vFP-6 - der in Beispiel 6 beschriebenen Geflügelpocken-Tollwutrekombinante - und (b) vCP-16 - der in Beispiel 13 beschriebenen - Kanarienvpocken-Tollwut-Rekombinante.

35

Nach 14 Tagen wurden 10 Mäuse aus jeder Gruppe geopfert und das Serum gesammelt. Der anti-Tollwuttiter in dem Serum wurde mit dem in Beispiel 7 beschriebenen RFFI-Test berechnet. Die verbleibenden 10 Mäuse aus jeder Gruppe wurden einer Belastungsinfektion durch intrazerebrale Impfung mit dem CVS-Stamm von Tollwutvirus, das in Beispiel 7 benutzt wurde, ausgesetzt. Jede Maus erhielt 30 µl, was 16 Maus-LD₅₀ entsprach. Nach 28 Tagen wurde die Zahl der überlebenden Mäuse bestimmt und die schützende Dosis 50 (PD₅₀) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIV zusammengefaßt.

40

Der bei mit vFP-6 geimpften Mäusen gefundene Schutzgrad bestätigte das in Beispiel 7 diskutierte Ergebnis der Impfung mit rekombinanten Geflügelpockenviren vFP-3. Der mit der Impfung mit vCP-16 erreichte Schutzgrad ist beträchtlich höher. Auf der Basis des berechneten PD₅₀ ist die Kanarienvpocken-Tollwut-Rekombinante 100 mal wirksamer beim Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit Tollwut als die Geflügelpocken-Tollwut-Rekombinante.

45

Tabelle XIVDie durch zwei Avipox-Tollwut-Rekombinanten erzielte schützende Immunität gegen eine Belastungsinfektion mit Tollwutvirus

50

55

| | Geflügelpocken vFP-6 | | | Kanarienvpocken vCP-16 | | |
|----|---------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|------------|-----------------|
| | Impf-dosis | RFFI Titer | Überlebens-rate | Impf-dosis | RFFI Titer | Überlebens-rate |
| 5 | 7.5 ^a | 2.3 ^b | 7/10 | 6.5 | 2.5 | 10/10 |
| 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 |
| | 1.5 | 0.6 | 0/10 | 0.5 | 0.4 | 0/10 |
| 15 | 1 PD ₅₀ = 6.17 | | | 1 PD ₅₀ = 4.18 | | |

a Virus-Titer, ausgedrückt als log₁₀ TCID₅₀

b RFFI-Titer, ausgedrückt als log₁₀ der höchsten Serumverdünnung, die eine Reduktion um mehr als 50 % in der Anzahl der fluoreszierenden Vertiefungen in einem RFFI-Test ergibt.

Beispiel 23

Verwendung von Geflügelpockenpromotorelementen zur Expression von Fremdgenen

I. Identifizierung des ein 25.8 Kilodalton (kD) Genprodukt codierenden Geflügelpockengens

Sichtbarmachen von in mit Geflügelpocken (FP-1) infizierten CEF-Lysaten vorhandenen Proteintypen mittels Coomassie Brilliantblau-Anfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen zeigte einen reichlich vorhandenen Typ mit einem offenbaren Molekulargewicht von 25,8 kD. Dieses Protein fehlte in nicht-infizierten Zelllysaten. Puls-Experimente unter Verwendung von ³⁵S-Methionin zur Radiomarkierung synthetisierter Proteine zu bestimmten Zeiten nach der Infektion zeigten wiederum die große Menge an FP-1-induziertem Protein und zeigten, daß es 6 bis 54 Stunden nach Infektion synthetisiert wird. An seinem Spitzenwert macht dieses FP-1 25,8 kD Protein ca. 5 bis 10 % des in dem Zelllysate vorhandenen Gesamtproteins aus.

Die große Menge an durch FP-1 induziertem 25,8 kD Protein legte nahe, daß das dieses Genprodukt codierende Gen von einem starken FP-1 Promotorelement reguliert wird. Um dieses Promotorelement zur nachfolgenden Verwendung bei der Expression von Fremdgenen in Pockenvirenrekombinanten zu lokalisieren, wurde eine Polysomen-Präparation aus mit FP-1 infizierten CEF-Zellen 54 Stunden nach Infektion gewonnen. RNA aus dieser Polysomenpräparation wurde isoliert und führte dann, wenn man sie zur Programmierung eines Kaninchenreticulocyten-*in vitro*-Translationssystem benutzte, vorwiegend zur Bildung von 25,8 kD FP-1 Protein.

Die Polysomen-RNA wurde außerdem als Matrize zur cDNA-Synthese des ersten Strangs unter Verwendung eines Oligo (dT)12-18 als Primer benutzt. Der erste Strang der cDNA wurde als eine Hybridisierungssonde in einer Southern-Blot-Analyse mit genomischen Verdaus von FP-1 benutzt. Ergebnisse aus diesen Hybridisierungsanalysen legten nahe, daß das für das 25,8 kD Protein codierende Gen in einem 10.5 Kbp Hind III-Fragment enthalten war. Dieses genomische Hind III-Fragment wurde anschließend isoliert und mit einem kommerziellen Vektor, pBS (Stratagene, La Jolla, CA.), cloniert und der Clon als pFP23k-1 bezeichnet. Weitere Hybridisierungsanalysen unter Verwendung des ersten Strangs der cDNA als Sonde gegen Verdaus von pFP23k-1 führten zur Lokalisierung des 25.8 kD Gens auf einem 3.2 Kbp Eco RV-Sub-Fragment. Dieses Fragment wurde in pBS subcloniert und als pFP23k-2 bezeichnet.

Etwa 2.4 Kbp dieses FP-1 Eco RV-Fragments wurden mit der Sanger-Didesoxy-Kettenabbruchsmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 74 (1977), Seiten 5463-5467) sequenziert. Die Analyse der Sequenz ergibt einen offenen Leserahmen (ORF), der ein Genprodukt mit einem Molekulargewicht von 25.8 kD codiert. *In vitro* run-off-Transkription dieses ORF

durch Polymerase des Bakteriophagen T7 (Stratagene, La Jolla, CA) in einem pBS Vektor erzeugt eine RNA-Art, die bei Benutzung zur Programmierung eines Kaninchenreticulocyten in vitro-Translationssystems (Promega Biotec, Madison, WI) eine Polypeptidart mit einem offenbaren Molekulargewicht von 25.8 kD ergibt. Dieses Polypeptid wandert auf einem SDS-Polyacrylamidgel gemeinsam mit dem reich vorhandenen 25.8 kD Protein, das in mit FP-1 infizierten CEFs beobachtet wird. Diese Ergebnisse legen nahe, daß es sich um das codierende Gen für das durch FP-1 induzierte, reich vorhandene 25.8 kD Genprodukt handelt.

II. Verwendung von Upstream-Promotorelementen des FP-1 25.8 kD Gens zur Expression des Katzenleukämievirus (FeLV) env-Gens in FP-1 und Vacciniarekombinanten.

Ein den regulatorischen Bereich des FP-1 25.8 kD Gens enthaltendes 270 bp Eco RV/Eco RI-Fragment (FP25.8K Promotor) und 21 bp der codierenden Sequenz des 25.8 kD Gens wurden aus pFP23k-2 isoliert. Nachstehend wird die Nucleotidsequenz der FP 25.8K Promotorregion vorgestellt, die benutzt wurde, um pFeLV25.8F1 und pFeLV25.81A zu erzeugen. Diese 270 Nucleotide lange Sequenz stellt 249 Nucleotide des 5'-Bereichs vor dem Initiationscodon (ATG) für das 25.8 kD Genprodukt und die ersten 21 bp der codierenden Sequenz zur Verfügung.

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

Dieses Fragment wurde an den Enden glatt gemacht und dann in einen mit Sma I verdauten FeLV env-Sequenzen enthaltenden FP-1 Insertionsvektor (pFeLVF1; siehe Beispiel 15) eingefügt. Dieser Insertionsvektor ermöglichte Rekombination mit dem f7 Locus des FP-1 Genom. Die Einfügung der FP25.8K Promotor upstream-Sequenzen auf der 5'-Seite des FeLV env-Gens und die richtige Orientierung wurde durch Sequenzanalyse bestätigt. Diese Insertion stellt kein perfektes ATG für die ATG-Substitution zur Verfügung, da das von dem 25.8 kD Gen bereitgestellte ATG sich nicht im Leseraster des FeLV env ATG befindet und daher kein Fusionsprotein gebildet wird. Das FP-1 Insertionsplasmid, das den FP25.8 kD Promotor oberhalb des FeLV env Gens enthielt, wurde als pFeLV25.8F1 bezeichnet.

Eine ähnliche Konstruktion wurde hergestellt unter Verwendung des das FeLV Gen enthaltenden Vacciniavirus-Insertionsvektors pFeLV1A (siehe Beispiel 15). Der H6-Promotor wurde aus pFeLV1A ausgeschnitten durch Verdau mit Bgl II und Sma I. Nachdem die Bgl II-Restriktionsstelle am Ende glatt gemacht war, wurde das den FP25.8K Promotor enthaltende, am Ende glatt gemachte 270 bp Eco RV/Eco RI-Fragment neben dem 5'-Ende des FeLV env-Gens bestätigt. Diese Konstruktion wurde durch Sequenzanalyse überprüft. Auch in dieser Rekombinante gibt es kein perfektes ATG für ATG Substitution, da das ATG und das 25.8 kD Gen nicht im Leseraster mit dem ATG des FeLV-Gens ist. Der die 25.8KD Gen upstream-Region neben dem 5'-Ende des FeLV-Gens enthaltende Vaccinia-Insertionsvektor (Kopenhagen-Stamm) wurde als pFeLV25.81A bezeichnet.

Die Insertionsplasmide pFeLV25.8F1 und pFeLV25.81A wurden zur in vitro Rekombination mit FP-1 (pFeLV25.8F1) und dem Kopenhagen-Stamm des Vacciniavirus (pFeLV25.81A) als den auffangenden Viren benutzt. Die Nachkommenschaft der Rekombination wurde auf passende Zellmonolayer plattiert und rekombinante Viren wurden nach einen Immunttest mit mit β -Galactosidase verbundenem Protein A und einem Rinder-anti-FeLV-Serum (Antibodies, Inc., Davis, CA.) ausgewählt. Vorläufige Ergebnisse legen nahe, daß der FP25.8K Promotor die Expression von Fremdgene in Pockenviren-Rekombinanten steuern kann.

Beispiel 24

Sicherheit und Wirksamkeit von vFP-6 und vCP-16 bei Geflügel

Mit den beiden Avipoxrekombinanten vFP-6 und vCP-16 (beschrieben in den Beispielen 6 und

13) wurden 18 Tage alte Hühnerembryonen, Eintagsküken und 28 Tage alte Küken beimpft und die Reaktion der Vögel nach drei Kriterien ausgewertet: 1) Effekt der Impfung auf das Ausschlüpfen, Impfreaktionen und Sterblichkeit 2) die von dem Tollwutglykoprotein hervorgerufene Immunantwort und 3) die von den Geflügelpockenantigenen hervorgerufene Immunantwort. Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt.

A. Sicherheitstests.

Gruppen von zwanzig 18 Tage alten Embryonen wurden in die Allantoishöhle mit 3,0 oder 4,0 \log_{10} TCID₅₀ entweder von vFP-6 oder vCP-16 beimpft. Nach den Ausschlüpfen wurden die Küken 14 Tage beobachtet, danach wurde ihnen einzeln Blut entnommen und die Seren gesammelt. Die beiden Rekombinanten, mit denen die Hühnerembryonen beimpft wurden, hatten keinen Effekt auf die Ausschlüpfrate der Eier und die Küken blieben gesund während der 14-tägigen Beobachtungsphase.

Gruppen von zehn SPF-Eintagsküken wurden mit 3,0 \log_{10} TCID₅₀ einer jeden der Rekombinanten intramuskulär geimpft. Die Küken wurden 28 Tage lang beobachtet und Serumproben 14 und 28 Tage nach der Impfung gesammelt. Mit keiner der beiden Rekombinanten wurde eine Impfreaktion an der Impfstelle beobachtet und die Küken blieben gesund während der 28 Tage der Beobachtungsphase.

Gruppen von zehn 28 Tage alten Küken wurden mit einem der beiden rekombinanten Viren beimpft, wobei sie entweder 3,0 \log_{10} TCID₅₀ intramuskulär oder 3,0 \log_{10} TCID₅₀ über die Hautroute (Geflügelnetzwerk) erhielten. Die Küken wurden 28 Tage lang beobachtet und Serumproben 14 und 28 Tage nach der Impfung gesammelt. Bei keiner der beiden Rekombinanten wurde eine Reaktion auf die intramuskuläre Impfung beobachtet. Impfung in die Haut führte zu einer sehr kleinen Impfreaktion auf Geflügelpocken mit Läsionen, die in der Größe heterogen waren. Kanarienspockenimpfung führte zur Ausbildung einer normalen Läsion auf der Haut an der Impfstelle. Alle Läsionen waren bis zum Ende des Experiments zurückgegangen.

B. Immunantwort.

Der in Beispiel 7 beschriebene RFFI-Test wurde benutzt, um die Mengen an Antikörper gegen das Tollwutglykoprotein festzustellen. Für jede Gruppe wurden die Ergebnisse als der geometrisch gemittelte Titer der individuellen Seren ausgedrückt, die auf Internationale Einheiten (IU) entsprechend einem Standardserum umgerechnet wurden, das 23,4 IU enthielt. Der kleinste positive Wert wurde als ein IU festgelegt und benutzt, um die Prozentzahl positiver Vögel zu bestimmen. Antikörper gegen Avipoxviren wurden mit einer ELISA-Methode unter Verwendung eines Geflügelpockenvirusstamms als Antigen getestet. Jede Serumprobe wurde 1/20 und 1/80 verdünnt. Eine Standardkurve wurde unter Verwendung der positiven und negativen Seren aufgestellt. Der kleinste positive Wert wurde berechnet, indem das Mittel der verschiedenen Werte der negativen Seren mit zweifacher Standardabweichung hinzugefügt wurde.

Die Ergebnisse der serologischen Beobachtungen werden in Tabelle XV für vFP-6 und Tabelle XVI für vCP-16 gezeigt.

Eine begrenzte Antikörperbildung sowohl auf Tollwut wie auf Geflügelpockenantigene wurde beobachtet bei Embryonen, die entweder mit vFP-6 oder vCP-16 beimpft waren. Der Geflügelpockenvektor rief eine Antikörperbildung auf beide Antigene in einer größeren Anzahl von Vögeln hervor als der Kanarienspockenvektor, doch die Antwort war immer noch heterogen.

Mit vFP-6 beimpfte Eintagsküken zeigten eine gute Antikörperbildung, wobei alle Küken auf Tollwut und Geflügelpockenantigene seropositiv 28 Tage nach der Impfung waren. Die Antwort auf die Impfung mit vCP-16 war sehr viel niedriger, wobei 40 % der Küken seropositiv für Tollwutglykoprotein nach 28 Tagen und 10 % seropositiv für Avipoxantigene waren.

Mit vFP-6 intramuskulär geimpfte, 28 Tage alte Küken zeigten 100 % Serokonversion auf beide Antigene 14 Tage nach der Impfung. Obwohl die Mehrzahl der Küken ebenso Serokonversion nach Impfung in die Haut zeigte, waren die erreichten Titer sowohl für Tollwut- wie für Avipoxantigene viel niedriger. Wie zuvor zeigten mit vCP-16 sowohl über den intramuskulären als auch den kutanen Weg geimpfte Küken eine uneinheitliche Antwort mit einem Maximalwert von 70 % Serokonversion auf Tollwut über intramuskuläre Beimpfung. Der niedrige Wert einer Serokonversion für Avipoxantigene nach Impfung mit Kanarienspocken könnte den Grad der serologischen Verwandt-

schaft zwischen den Viren widerspiegeln.

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl vFP-6 wie vCP-16 sicher für die Impfung von Hühnern in einem weiten Altersbereich sind. Der Geflügelpockenvektor vFP-6 scheint effizienter bei der Auslösung einer Immunantwort in Hühnern zu sein. Für die beiden rekombinanten Avipoxviren Geflügelpocken und Kanarienvogelpocken wurde aber signifikant gezeigt, daß sie für eine Impfung in ovum nützlich sind.

Tabelle XV

Immunantwort gegen Geflügelpocken/Tollwut-Glykoprotein (vFP-6) bei Hühnern verschiedenen Alters

| Antikörper | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------|-------------|----------------|------|--|
| Positive Gruppen | Dosis (TCID ₅₀) | Zeit nach Impfung (Tage) | Tollwut Glykoprotein | | Geflügelpocken | | |
| | | | Ø IU Titer | % Vögel/1IU | Ø Elisa OD | % | |
| Embryonen | 10 ³ | 3 + 14 | 0.28 | 15% | 0.125 | 54% | |
| | 10 ⁴ | 3 + 14 | 0.87 | 30% | 0.129 | 46% | |
| 18 Tage alt | 10 ³ | 14 | 1.8 | 90% | 0.109 | 70% | |
| | | 28 | 4.2 | 100% | 0.234 | 100% | |
| Eintagsküken i.m. | 10 ³ | 14 | 3.7 | 100% | 0.317 | 100% | |
| | | 28 | 2.7 | 100% | 0.378 | 100% | |
| 28 Tage alte Küken, i.m. | 10 ³ | 14 | 1.6 | 100% | 0.191 | 100% | |
| | | 28 | 0.54 | 90% | 0.161 | 80% | |
| 28 Tage alte Küken, Durchstechung | 10 ³ | 14 | 1.6 | 100% | 0.191 | 100% | |
| | | 28 | 0.54 | 90% | 0.161 | 80% | |

Tabelle XVI

Immunantwort gegen Kanarienvogelpocken/Tollwut-Glykoprotein (vCP-16) von Hühnern bei verschiedenem Alter

| Antikörper | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------|-------------|---------------------|-----|--|
| Positive Gruppen | Dosis (TCID ₅₀) | Zeit nach Impfung (Tage) | Tollwut Glykoprotein | | Kanarienvogelpocken | | |
| | | | Ø IU Titer | % Vögel/1IU | Ø Elisa OD | % | |
| Embryonen | 10 ³ | 3 + 14 | 0.14 | 0% | 0.068 | 25% | |
| | 10 ⁴ | 3 + 14 | 0.19 | 8% | 0.059 | 25% | |
| 18 Tage alt | 10 ³ | 14 | 0.18 | 10% | 0.027 | 0% | |
| | | 28 | 0.21 | 40% | 0.059 | 10% | |
| Eintagsküken i.m. | 10 ³ | 14 | 0.18 | 10% | 0.027 | 0% | |
| | | 28 | 0.21 | 40% | 0.059 | 10% | |

| | Dosis (TCID ₅₀) | Zeit nach Impfung (Tage) | Antikörper | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|-------------|----------------|------------|
| | | | Tollwut Glykoprotein | | Geflügelpocken | |
| Positive Gruppen | | | Ø IU Titer | % Vögel/1IU | Ø Elisa OD | % |
| 28 Tage alte Küken i.m. | 10 ³ | 14 28 | 0.61 0.24 | 70% 30% | 0.093 0.087 | 60% 30% |
| 28 Tage alte Küken Durchstechung | 10 ³ | 14 28 | 0.34 0.11 | 40% 10% | 0.071 0.061 | 30% 10% |

Beispiel 25Sicherheit und immunogene Wirkung einer Impfung von Ferkeln mit vFP-6

Zwei Gruppen von drei Ferkeln wurden mit der Rekombinante vFP-6 beimpft über einen der beiden Wege:

- a) drei Tiere erhielten 8,1 log₁₀TCID₅₀ durch eine intramuskuläre Impfung; und
b) drei Tiere erhielten die gleiche Dosis durch orale Impfung.

Allen Tieren wurde in wöchentlichen Abständen Blut entnommen und alle Tiere erhielten eine Auffrischimpfung der gleichen Dosis über den gleichen Weg am Tag 35. Die Ferkel wurden täglich auf klinische Symptome beobachtet. Die Seren wurden auf anti-Geflügelpocken-Antikörper mit einem ELISA-Test und einen Serumneutralisationstest geprüft. Tollwutantikörper wurden in einem RFFI-Test bestimmt.

Alle Ferkel blieben bei guter Gesundheit und keine Läsionen wurden nach der Impfung beobachtet. Die Temperaturkurven waren normal, wobei kein Unterschied zwischen geimpften und nicht geimpften Tieren zutage trat. Sowohl die über den intramuskulären als auch oralen Weg geimpften Ferkel entwickelten eine Antikörperbildung auf Geflügelpockenantigene, wie durch ELISA- und Serumneutralisation bestimmt wurde. Eine zweite Antwort war offenkundig nach der Auffrischimpfung. (Ergebnisse nicht gezeigt). Alle Ferkel entwickelten außerdem eine Immunantwort auf Tollwutglykoprotein, wie in einem RFFI-Test bestimmt, und ein Auffrischeffekt war bei beiden Wegen offenkundig. Diese Ergebnisse sind in Tabelle XVII zusammengefaßt.

Die Ergebnisse zeigen an, daß die Impfung mit Geflügelpocken/Tollwutrekombinanten unschädlich für Ferkel ist und daß die Rekombinante in der Lage ist, eine signifikante Immunantwort auf das Tollwutglykoprotein nach oraler oder intramuskulärer Impfung hervorzurufen.

Tabelle XVIIGegen Tollwutglykoprotein erzeugte Antikörper in mit vFP-6 geimpften Ferkeln

| Impfweg | Tier Nr. | Tollwut 14 | Antikörper nach Tagen | | | (RFFI Titer) | |
|---------|-------------|------------------|--------------------------|-----|-----------------|--------------|----|
| | | | 21 | 28 | 35 ^b | 42 | 49 |
| I.M. | 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 |

| Impfweg | Tier Nr. | Tollwut | Antikörper nach Tagen | | | (RFFI Titer) | |
|---------|-------------|---------|--------------------------|-----|-----|-----------------|-----|
| | | | 14 | 21 | 28 | 35 ^b | 42 |
| I.M. | 987 | 3 | 2 | 2.1 | 2 | 3 | 3 |
| Oral | 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 |

- a Titer ausgedrückt als \log_{10} der höchsten Serumverdünnung, die eine Reduktion um mehr als 50 % in der Anzahl der fluoreszierenden Nöpfchen in einem RFFI-Test ergibt.
b Tiere erhielten eine zweite Impfung am Tag 35.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Virushaltiger Impfstoff, der beim Einbringen in einen Vertebraten zum Induzieren einer Immunantwort in dem Vertebraten auf ein gegebenes Pathogen befähigt ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Impfstoff als das für die Immunantwort verantwortliche Virus ein rekombinantes Avipoxvirus enthält, das ein exogenes DNA-Insert, das in einer nicht-essentiellen Region in das virale Genom nach einer geeigneten Promotorsequenz inseriert worden ist, enthält, welches exogene DNA-Insert ein Antigen des genannten Pathogens codiert und zur Expression dieses Antigens in vivo in dem Vertebraten unter der Kontrolle der Promotorsequenz und ohne produktive Replikation des Virus im Vertebraten befähigt ist.
2. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das rekombinante Avipoxvirus ein rekombinantes Geflügelpockenvirus oder Kanarienvogelpockenvirus ist.
3. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das von dem rekombinanten Virus exprimierte Antigen, wenn das rekombinante Virus in den Vertebraten eingeführt wird, ein Antigen eines Säugetierpathogens ist.
4. Impfstoff nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen das Tollwut G-Antigen, das gp51,30-Hüllantigen des Rinderleukämievirus, das FeLV-Hüllantigen des Katzenleukämievirus oder das Glykoprotein D-Antigen des Herpes simplex-Virus ist.
5. Rekombinantes Virus, das zu Induktion einer Immunantwort auf ein Säugetierpathogen befähigt ist, wenn es in ein Säugetier eingeführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass das rekombinante Virus ein rekombinantes Avipoxvirus umfasst, das ein exogenes DNA-Insert, das in einer nicht-essentiellen Region des Avipoxvirusgenoms nach einer geeigneten Promotorsequenz inseriert worden ist, enthält, welches exogene DNA-Insert ein Antigen zum genannten Pathogen inseriert und zur Expression dieses Antigens in vivo in dem Säugetier unter der Kontrolle der Promotersequenz und ohne produktive Replikation des Virus im Säugetier befähigt ist.
6. Rekombinantes Virus nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen, für welches das genannte exogene DNA-Insert codiert und das durch das rekombinante Virus im Säugetier exprimiert werden kann, das Tollwut G-Antigen, das gp51,30-Hüllantigen des Rinderleukämievirus, das FeLV-Hüllantigen des Katzenleukämievirus oder das Glykoprotein D-Antigen des Herpes Simplex-Virus ist.
7. Rekombinantes Virus nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass das rekombinante Virus zur Expression des Antigens ohne produktive Replikation des Virus in einer Säugetierspezies, ausgewählt unter Hunden, Katzen, Mäusen, Kaninchen, Rindern, Schafen und Schweinen, befähigt ist.
8. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Promotorsequenz für das Antigen, für welches das exogene DNA-Insert codiert, eine Avipox-Promotorsequenz umfasst, die in das virale Genom als Teil dieses exogenen DNA-Inserts inseriert und darin vor der Antigen-codierenden Sequenz angeordnet ist, um

dadurch die Expression des Antigens zu fördern oder zusätzlich zu fördern, wenn das rekombinante Virus in das Säugetier eingebracht wird.

- 5 9. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Promotorsequenz für das Antigen, für welches das exogene DNA-Insert codiert, eine Nicht-Avipox-Promotorsequenz umfasst, die in das virale Genom als Teil dieses exogenen DNA-Inserts insertiert und darin vor der Antigen-codierenden Sequenz angeordnet ist, um dadurch die Expression des Antigens zu fördern oder zusätzlich zu fördern, wenn das rekombinante Virus in das Säugetier eingebracht wird.
- 10 10. Rekombinantes Avipoxvirus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene DNA-Insert eine Nicht-Avipox-Promotorsequenz umfasst, welche Sequenz entweder ein Vaccinia-Promotor oder ein Entomopoxpromotor ist.
11. Rekombinantes Avipoxvirus nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nicht-Avipox-Promotorsequenz a) eine unter den NH-, 11K- und Pi Sequenzen ausgewählte Vaccinia-Promotorsequenz oder b) eine 42K-Entomopox-Promotorsequenz ist.
- 15 12. Impfstoff, umfassend ein rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 5 bis 11.
13. Verfahren zum Exprimieren eines Genproduktes in vitro, gekennzeichnet durch Einführen eines rekombinanten Virus, wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert oder nach einem der Ansprüche 5 bis 7 in die Zellen einer in vitro-Zellkultur, welches Virus ein exogenes DNA-Insert enthält, das in einen nicht-essentiellen Bereich des Viralgenoms nach einer geeigneten Promotorsequenz insertiert worden ist, welches exogenen DNA-Insert für das Genprodukt codiert und zur Expression dieses Genproduktes in der genannten Kultur unter der Kontrolle der Promotorsequenz und ohne produktive Replikation des Virus befähigt ist, und durch Exprimierenlassen des Genproduktes in der Zellkultur.
- 20
- 25

KEINE ZEICHNUNG

30

35

40

45

50

55