



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 41 92 786 B4** 2006.08.24

(12)

Patentschrift

(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 41 92 786.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US91/08703**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1992/008789**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.11.1991**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **29.05.1992**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **13.01.1994**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **24.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 7/01** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/165 (2006.01)
A61K 39/175 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
621614 **20.11.1990** **US**
776867 **22.10.1991** **US**

(73) Patentinhaber:
Virogenetics Corp., Troy, N.Y., US

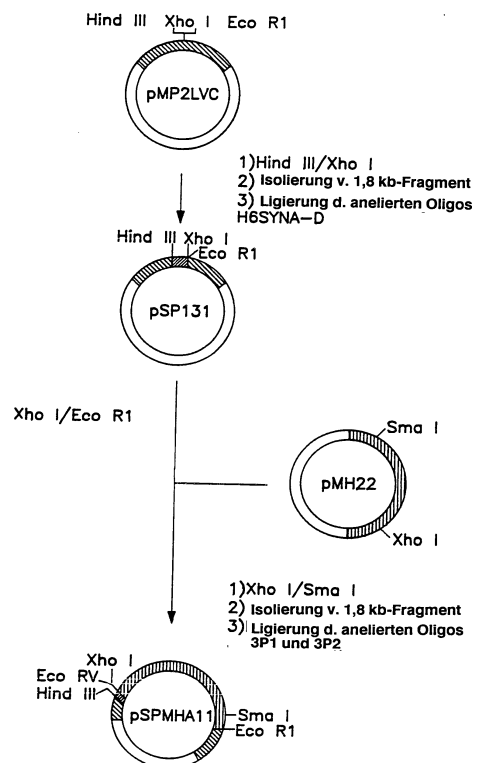
(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Paoletti, Enzo, Delmar, N.Y., US; Taylor, Jill, Albany, N.Y., US

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85,
S. 1252-1256, 1988;
J. Vir. S. 536-541, 1986;
Technological Advances in Vaccine Development,
S. 321-334, 1988;

(54) Bezeichnung: **Masernvirus-Rekombinanter Pockenvirus-Impfstoff**

(57) Hauptanspruch: Rekombinantes Pockenvirus, das in einer nichtessentiellen Region des Pockenvirusgenoms DNA enthält, die mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert.



Beschreibung

VERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN

[0001] Diese Anmeldung ist eine Teilfortführung der gleichzeitig anhängigen Patentanmeldung Serien-Nr. US 07/621 614, angemeldet am 20. November 1990.

Fachgebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Pockenvirus und Verfahren zu dessen Herstellung und Verwendung. Insbesondere betrifft die Erfindung ein rekombinantes Pockenvirus, das Genprodukte eines Morbillivirusgens exprimiert, und Impfstoffe, die eine schützende Immunität gegen Morbillivirus-Infektionen bereitstellen.

[0003] In dieser Anmeldung wird auf mehrere Veröffentlichungen durch arabische Ziffern in Klammern bezuggenommen. Die vollständigen Zitate dieser Referenzen finden sich am Ende der Beschreibung direkt vor den Patentansprüchen. Diese Referenzen beschreiben den Stand der Technik, auf dem die Erfindung beruht.

Stand der Technik

[0004] Das Vacciniavirus und kürzlich auch andere Pockenviren wurden zur Insertion und Expression von fremden Genen verwendet. Die Grundtechnik zur Insertion von fremden Genen in lebende infektiöse Pockenviren umfaßt die Rekombination zwischen Pocken-DNA-Sequenzen in einem Donorplasmid, die ein fremdes Genelement flankieren, und homologen Sequenzen, die im aufnehmenden ("rescuing") Pockenvirus vorliegen (Piccini et al., 1987).

[0005] Insbesondere werden die rekombinanten Pockenviren in zwei Stufen konstruiert, die dem Fachmann bekannt sind und die den Methoden zur Erzeugung von synthetischen Rekombinanten des Vacciniavirus entsprechen, die im US-Patent Nr. 4 603 112 beschrieben werden, wobei die Offenbarung dieses Patentess hierin durch Bezugnahme eingeschlossen wird.

[0006] Als erstes wird die DNA-Gensequenz, die in das Virus eingefügt werden soll, insbesondere ein offenes Leseraster aus einer Nicht-Pocken-Quelle, in ein E. coli-Plasmidkonstrukt eingebracht, in das DNA, die zu einem DNA-Abschnitt des Pockenvirus homolog ist, eingefügt wurde. Getrennt davon wird die DNA-Gensequenz, die eingefügt werden soll, an einen Promotor ligiert. Die Promotor-Gen-Verknüpfung wird in dem Plasmidkonstrukt so positioniert, daß die Promotor-Gen-Verknüpfung an beiden Enden durch DNA flankiert wird, die zu einer solchen DNA-Sequenz homolog ist, die einen Abschnitt der Pocken-DNA flankiert, der einen nichtessentiellen Locus enthält. Das resultierende Plasmidkonstrukt wird sodann durch Züchtung in E. coli-Bakterien vermehrt (Clewell, 1972) und isoliert (Clewell et al., 1969; Maniatis et al., 1982).

[0007] Als zweites wird das isolierte Plasmid zusammen mit dem Pockenvirus in eine Zellkultur, z. B. in Hühnerembryo-Fibroblasten, transfiziert. Durch Rekombination zwischen homologer Pocken-DNA im Plasmid bzw. im viralen Genom entsteht ein Pockenvirus, das durch das Vorliegen von fremden DNA-Sequenzen in einer nichtessentiellen Region seines Genoms modifiziert ist. Der Begriff "fremde" DNA bezeichnet exogene DNA, insbesondere DNA aus einer Nicht-Pocken-Quelle, die Genprodukte codiert, die von diesem Genom, in das die exogene DNA eingefügt ist, üblicherweise nicht hergestellt werden.

[0008] Genetische Rekombination bedeutet im allgemeinen den Austausch von homologen DNA-Abschnitten zwischen zwei DNA-Strängen. In bestimmten Viren kann RNA die DNA ersetzen. Homologe Nucleinsäureabschnitte sind Bereiche von Nucleinsäure (DNA oder RNA), die die gleiche Sequenz der Nucleotidbasen aufweisen.

[0009] Eine genetische Rekombination kann während der Replikation oder Herstellung von neuen Virusgenomen innerhalb der infizierten Wirtszelle von Natur aus stattfinden. Auf diese Weise kann eine genetische Rekombination während des viralen Replikationszyklus zwischen viralen Genen vor sich gehen, wenn die Wirtszelle, in der die Replikation stattfindet, mit zwei oder mehreren verschiedenen Viren oder anderen genetischen Konstrukten gleichzeitig infiziert ist. Durch Austausch eines DNA-Abschnitts eines ersten Genoms wird der Genomabschnitt eines zweiten, gleichzeitig infizierenden Virus konstruiert, wobei dessen DNA zu derjenigen des ersten viralen Genoms homolog ist.

[0010] Eine Rekombination kann jedoch auch zwischen DNA-Abschnitten in verschiedenen Genomen stattfinden, die nicht genau homolog sind. Wenn ein solcher Abschnitt aus einem ersten Genom zu einem Abschnitt eines anderen Genoms mit der Ausnahme homolog ist, daß innerhalb des ersten Abschnitts beispielsweise ein genetischer Marker oder ein eine antigene Determinante codierendes Gen in einem Abschnitt der homologen DNA eingefügt ist, kann trotzdem eine Rekombination stattfinden, und die Produkte dieser Rekombination können sodann durch die Gegenwart dieses genetischen Markers oder Gens im rekombinanten viralen Genom nachgewiesen werden.

[0011] Die erfolgreiche Expression der eingefügten genetischen DNA-Sequenz durch das modifizierte infektiöse Virus setzt zwei Bedingungen voraus: Erstens muß die Insertion in einer nichtessentiellen Region des Virus stattfinden, damit das modifizierte Virus lebensfähig bleibt. Die zweite Bedingung für die Expression von eingefügter DNA besteht darin, daß ein Promotor in geeigneter Beziehung zur eingefügten DNA vorliegen muß. Der Promotor muß so plaziert sein, daß er stromaufwärts der zu exprimierenden DNA-Sequenz liegt.

[0012] Hundestaupavirus (CDV) und Masernvirus (MV) sind Mitglieder der Morbillivirus-Untergruppe, einer Gattung der Paramyxovirus-Familie (Diallo, 1990; Kingsbury et al., 1978). Die Viren enthalten ein nichtsegmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität. Hundestaupavirus ist eine hochinfektiöse, fieberhafte Erkrankung von Hunden und anderen Fleischfressern. Die Mortalitätsrate ist hoch; sie liegt im Bereich zwischen 30 und 80%. Hunde, die überleben, leiden häufig an dauerhaften Schäden des Zentralnervensystems (Fenner et al., 1987). Auf ähnliche Weise löst das Masernvirus eine akute Infektionskrankheit aus, die durch ein generalisiertes makropapulöses Exanthem gekennzeichnet ist. Die Krankheit befällt hauptsächlich Kinder.

[0013] Die Eigenschaften der Morbilliviren sind kürzlich von Norrby und Oxman (1990) und Diallo (1990) beschrieben worden. Zwei Strukturproteine sind äußerst wichtig für die Induktion einer schützenden Immunantwort, dies war auch bei anderen Paramyxoviren festgestellt worden (Avery und Niven, 1979; Merz et al., 1980). Hierbei handelt es sich um das Membran-Hämagglutinin-Glykoprotein (HA), das für die Hämagglutination und die Anheftung des Virus an die Wirtszelle verantwortlich ist, und das Fusions-Glykoprotein (F), das die Membranfusion zwischen dem Virus und der infizierten Zelle oder zwischen infizierten und benachbarten nichtinfizierten Zellen bewirkt (Graves et al., 1978). Die Anordnung der Gene im MV-Genom ist von Richardson et al. (1985) und Dowling et al. (1986) aufgeklärt worden. Die Nucleotidsequenz des MV-HA-Gens und des MV-F-Gens ist von Alkhatib und Briedis (1986) bzw. Richardson et al. (1986) bestimmt worden.

[0014] CDV und MV sind strukturell ähnlich und weisen eine enge serologische Verwandtschaft auf. Immunpräzipitationsstudien haben gezeigt, daß Antiserum gegen MV alle CDV-Proteine (P, NP, F, HA und M) präzipitiert. Im Gegensatz dazu präzipitiert Antiserum gegen CDV alle MV-Proteine mit Ausnahme des HA-Glykoproteins (Hall et al., 1980; Orvell et al., 1980; Stephenson et al., 1979). Angesichts dieser engen serologischen Verwandtschaft ist früher schon gezeigt worden, daß eine Impfung mit MV bei Hunden einen Schutz bei einem CDV-Kontakt ("challenge") bewirkt (Gillespie et al., 1960; Moura et al., 1961; Warren et al., 1960). Neutralisierende Antikörper gegen CDV sind in menschlichen anti-MV-Seren beschrieben worden (Adams et al., 1957; Imagawa et al., 1960; Karzon, 1955; Karzon, 1962), jedoch sind neutralisierende Antikörper gegen MV nicht in anti-CDV-Seren aus Hunden gefunden worden (Delay et al., 1965; Karzon, 1962; Roberts, 1965).

[0015] MV-HA- und -F-Gene sind in mehreren viralen Vektoren exprimiert worden, umfassend Vacciniavirus (Drillien et al., 1988; Wild et al., 1991), Geflügelpockenvirus (Spehner et al., 1990; Wild et al., 1990), Adenovirus (Alkhatib et al., 1990) und Baculovirus (Vialard et al., 1990). In diesen Studien wurden authentische MV-Proteine exprimiert, die in Hämagglutinationstests (Vialard et al., 1990), Hämolysetests (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al., 1990) oder Zellfusionstests (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al., 1990; Wild et al., 1991) funktionell waren. Nach Insertion in einen Vacciniavirus-Vektor führte die Expression von entweder dem HA- oder dem F-Protein dazu, daß bei Mäusen eine schützende Immunantwort gegen MV-Encephalitis ausgelöst wurde (Drillien et al., 1988). Auf ähnliche Weise löste die Expression des F-Proteins in einem Geflügelpockenvirus-Vektor eine schützende Immunantwort gegen MV-Encephalitis bei Mäusen aus (Wild et al., 1990). Norrby et al., 1986 beschreibt, dass das Fusions-Glykoprotein in einer Vakzine zum Schutz eines Hundes gegen Hundestaupavirus eingesetzt wurde. Taylor et al., 1998 beschreibt, dass in Geflügelpockenvirus fremde Gene unter der Kontrolle eines Pockenviruspromotors exprimiert werden können und als Vakzine bei Hunden eingesetzt werden können. Solche Studien über die Schutzwirkung sind mit keinen anderen Vektoren beschrieben worden.

[0016] Die Europäische Patentanmeldung Nr. 0 314 569 betrifft die Expression eines MV-Gens in Geflügelpocken.

[0017] Perkus et al. (1990) haben kürzlich zwei einmalige Wirtsbereichgene in Vacciniavirus beschrieben. Diese Gene codieren Wirtsbereichfunktionen, die die Replikation von Vacciniavirus auf verschiedenen Zellsubstraten in vitro erlauben. Die Gene codieren Wirtsbereichfunktionen für die Replikation von Vacciniavirus sowohl auf menschlichen Zellen als auch auf Zellen, die von Kaninchen oder Schweinen stammen. Die Definition dieser Gene schafft die Voraussetzung für die Entwicklung eines Vacciniavirus-Vektors, der zwar die fremden Gene von Interesse noch exprimieren würde, der aber gleichzeitig stark in seiner Fähigkeit zur Replikation in bestimmten Zellen eingeschränkt wäre. Dies würde die Sicherheitsaspekte von Vacciniavirus-Rekombinanten stark erhöhen.

[0018] Ein attenuierter Vektor wurde durch die gemeinsame Deletion von sechs nichtessentiellen Regionen aus dem Copenhagen-Stamm von Vacciniavirus entwickelt. Von diesen Regionen weiß man, daß sie Proteine codieren, die bei der viralen Virulenz eine Rolle spielen können. Diese deletierten Regionen sind das tk-Gen, das hämorrhagische Gen, das T-Typ-Einschlußgen, das Hämagglutinin-Gen und das Gen, das die große Untereinheit der Ribonuclease-Reductase codiert, sowie die früher definierten C7L bis K1L-Sequenzen (Perkus et al., 1990). Die Sequenzen und die Stellungen dieser Gene im Genom des Copenhagen-Stamms von Vacciniavirus sind früher bestimmt worden (Goebel et al., 1990 a, b). Der resultierende attenuierte Vacciniastamm wird mit NYVAC bezeichnet.

[0019] Die Technologie zur Erzeugung von Vacciniavirus-Rekombinanten ist kürzlich auf andere Mitglieder der Pockenviren-Familie ausgedehnt worden, die einen stärker eingeschränkten Wirtsbereich aufweisen. Das Avipockenvirus der Geflügelpocken ist gentechnisch als rekombinantes Virus hergestellt worden, das das Rabies-G-Gen exprimiert (Taylor et al., 1988 b). Dieses rekombinante Virus wird auch in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO89/03429 beschrieben. Bei Impfung einer Anzahl von Nicht-Vogel-Arten mit der Rekombinante wird eine Immunantwort gegen Tollwut ausgelöst, die Mäuse, Katzen und Hunde vor einem letalen Tollwut-Kontakt schützt.

[0020] Sowohl Hundestaupe als auch Masern werden zur Zeit durch den Einsatz von lebenden attenuierten Impfstoffen bekämpft (Fenner et al., 1987; Preblud et al., 1988). Für die Kontrolle von CDV wird die Immunisierung im Alter von acht Wochen unter Verwendung eines attenuierten Lebendimpfstoffs und erneut im Alter von 12 bis 16 Wochen empfohlen. Obwohl die Immunität gegen CDV das ganze Leben anhält, wird wegen der hohen Infektiosität des Krankheitserregers und der Schwere der Erkrankung üblicherweise eine jährliche Wiederimpfung empfohlen.

[0021] Ein Problem bei dem allgemein anerkannten Vorgehen der fortwährenden Wiederimpfung besteht darin, daß CDV-immune Mütter neutralisierende Antikörper über das Kolostrum auf ihre Nachkommen übertragen. Die Schwierigkeit besteht darin, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem diese Antikörperspiegel so weit gesunken sind, daß die jungen Hunde geimpft werden können. Hierdurch wird eine Zeitspanne offengelassen, in der junge Hunde möglicherweise für eine CDV-Infektion empfänglich sind. Die Verwendung eines rekombinanten Impfstoffs, der nur die Masernvirus-Glykoproteine exprimiert, stellt eine Möglichkeit dar, um die Hemmwirkungen von mütterlichem Antikörper zu überwinden und die Impfung von Neugeborenen zu erlauben. Tatsächlich ist gezeigt worden, daß die CDV-spezifischen Antikörper, die in den von CDV-immunen Müttern gesäugten jungen Hunden vorlagen, die Entwicklung von MV-spezifischen Antikörpern nicht verhinderten, wenn die jungen Hunde mit einem MV-Impfstoff geimpft wurden (Baker et al., 1966).

[0022] Andere Einschränkungen der häufig verwendeten modifizierten CDV-Lebendimpfstoffe sind früher beschrieben worden (Tizard, 1990) und hängen mit der Fähigkeit dieser Impfstoff-Stämme zusammen, sich innerhalb der geimpften Tiere zu replizieren. Diese ungünstigen Effekte fallen am stärksten auf, wenn der CDV-Impfstoff-Stamm den Hunden zusammen mit dem Hunde-Adenovirus-1 und -2 geimpft wird, dies führt zu Immunsuppression, Thrombocytopenie und Encephalitis (Bestetti et al., 1978; Hartley, 1974; Phillips et al., 1989). Außerdem wurde gezeigt, daß die modifizierten CDV-Lebendimpfstoffe in anderen Tierarten, einschließlich Füchsen, Wackelbären, Frettchen und dem Panda die Staupe auslösen (Bush et al., 1976; Carpenter et al., 1976; Kazacos et al., 1981). Somit würde die Verwendung eines rekombinanten CDV-Impfstoffs die fortwährende Einführung von modifiziertem lebendem CDV in die Umgebung und mögliche Impfstoff-assoziierte und durch Impfstoff induzierte Komplikationen, die bei Verwendung der herkömmlichen CDV-Impfstoffe aufgetreten sind, ausschließen.

[0023] Die Verwendung von Pockenvirus-Vektoren stellt außerdem eine Möglichkeit dar, um die nachgewiesene Hemmwirkung von mütterlichem Antikörper auf die Impfung mit den gegenwärtig bei Hunden eingesetzten, lebenden attenuierten CDV-Stämmen zu verhindern. Bei jungen Hunden, die von Müttern geboren werden, die vorher als junge Hündinnen mit einer Pockenvirus-Rekombinante immunisiert worden waren, tritt kei-

ne Beeinträchtigung durch CDV-spezifische mütterliche Antikörper mehr auf. Außerdem stellt die Fähigkeit von sowohl Vacciniavirus- als auch Kanarienspockenvirus-Vektoren die MV-HA- und -F-Gene enthalten, diese Antworten zu induzieren, und das Fehlen einer serologischen Kreuzreaktivität zwischen den zwei Pockenviren einen weiteren Vorteil dadurch bereit, daß der eine Vektor früh im Leben des jungen Hundes verwendet werden könnte und der andere später eingesetzt werden könnte, um die CDV-spezifische Immunität aufzufrischen. Auf diese Weise würde die Freisetzung von lebenden attenuierten CDV-Stämmen in die Umgebung vermieden werden, die mit dem Auftreten von Komplikationen einhergeht, die durch den Impfstoff induziert werden oder mit dem Impfstoff assoziiert sind (Tizard, 1990).

[0024] Hieraus geht hervor, daß die Bereitstellung eines Morbillivirus-rekombinanten Pockenvirus und von Impfstoffen, die eine schützende Immunität gegen Morbillivirus-Infektionen bereitstellen, ein sehr wünschenswerter Fortschritt gegenüber dem heutigen Stand der Technik wäre.

Aufgabenstellung

Aufgaben der Erfindung

[0025] Eine Aufgabe der Erfindung ist somit die Bereitstellung von rekombinanten Pockenviren, die mindestens zwei Genprodukte von Morbilliviren exprimieren, und die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung solcher rekombinanter Pockenviren.

[0026] Desweiteren wird die Bereitstellung der Clonierung und Expression von codierenden Sequenzen von Morbillivirus, insbesondere codierenden Sequenzen von Masernvirus, in einem Pockenvirus-Vektor, insbesondere Vacciniavirus- oder Kanarienspockenvirus-Vektoren beschrieben.

[0027] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Impfstoffs, der befähigt ist, Morbillivirus-neutralisierende Antikörper, Hämagglutination-hemmende Antikörper und eine schützende Immunität gegen eine Morbillivirus-Infektion und einen letalen Morbillivirus-Kontakt zu induzieren, wobei insbesondere ein übergreifender Schutz von Hunden gegen Hundestaupe unter Verwendung eines Masernvirus-rekombinanten Pockenvirus-Impfstoffs bereitgestellt wird.

[0028] Diese und weitere Aufgaben und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden durch die nachstehende Beschreibung verdeutlicht.

Darstellung der Erfindung

[0029] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein rekombinantes Pockenvirus, das in einer nichtessentiellen Region des Pockenvirusgenoms eine DNA-Sequenz aus Morbilli-Virus enthält, wobei die DNA mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert. Das Pockenvirus ist vorzugsweise ein Vaccinia-virus oder ein Avipockenvirus, wie z. B. Kanarienspockenvirus. Das Morbillivirus ist vorzugsweise Masernvirus.

[0030] Gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert das rekombinante Pockenvirus Genprodukte des fremden Morbillivirusgens. Insbesondere codiert die fremde DNA ein Masernvirus-Glykoprotein, vorzugsweise Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein. Vorzugsweise werden durch das rekombinante Pockenvirus eine Vielfalt von Masernvirus-Glykoproteinen gemeinsam im Wirt exprimiert.

[0031] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen Impfstoff zur Induktion einer Immunantwort in einem tierischen Wirt, der mit dem Impfstoff geimpft wurde, wobei der Impfstoff einen Träger und ein rekombinantes Pockenvirus umfaßt, das in einer nichtessentiellen Region DNA aus Morbillivirus, insbesondere Masernvirus, enthält, wobei die DNA mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert. Vorzugsweise codiert und exprimiert die DNA ein Masernvirus-Glykoprotein, insbesondere Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein. Vorzugsweise werden im Wirt eine Vielfalt von Masernvirus-Glykoproteinen gemeinsam exprimiert. Das im erfindungsgemäßen Impfstoff eingesetzte Pockenvirus ist vorzugsweise ein Vacciniavirus oder ein Avipockenvirus, wie z. B. Kanarienspockenvirus.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0032] Die beiliegenden Zeichnungen tragen zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung bei:

[0033] Fig. 1 zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSPM2LHAVC, das zur Herlei-

tung des rekombinanten Vacciniavirus vP557, welches das MV-Hämagglutinin-Gen exprimiert, verwendet wurde;

[0034] **Fig. 2** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSPMFVC, das zur Herleitung des rekombinanten Vacciniavirus vP455 verwendet wurde, welches das MV-Fusions-Gen exprimiert;

[0035] **Fig. 3** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW843, das zur Herleitung des rekombinanten Vacciniavirus vP756 verwendet wurde, welches das MV-Hämagglutinin-Gen exprimiert;

[0036] **Fig. 4** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW850, das zur Herleitung des rekombinanten Vacciniavirus vP800 verwendet wurde, welches das MV-Fusions-Gen exprimiert;

[0037] **Fig. 5** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW800, das zur Herleitung des rekombinanten Kanarienvirus vCP40 verwendet wurde, welches das MV-Fusions-Gen exprimiert;

[0038] **Fig. 6** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW810, das zur Herleitung der rekombinanten Kanarienviren vCP50, welches das MV-Hämagglutinin-Gen exprimiert, und vCP57 verwendet wurde, welches die MV-Fusions- und MV-Hämagglutinin-Gene zusammen exprimiert;

[0039] **Fig. 7** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW852, das zur Herleitung des rekombinanten Kanarienvirus vCP85 verwendet wurde, welches das MV-Hämagglutinin-Gen exprimiert;

[0040] **Fig. 8** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW853A, das zur Herleitung des rekombinanten Kanarienvirus vCP82 verwendet wurde, welches die MV-Hämagglutinin- und Fusions-Gene zusammen exprimiert;

[0041] **Fig. 9** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSD460 zur Deletion des Thymidinkinase-Gens und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP410;

[0042] **Fig. 10** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSD486 zur Deletion der hämorrhagischen Region und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP553;

[0043] **Fig. 11** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pMP494Δ zur Deletion der ATI-Region und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP618;

[0044] **Fig. 12** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSD467 zur Deletion des Hämagglutinin-Gens und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP723;

[0045] **Fig. 13** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pMPCSK1Δ zur Deletion der Gengruppe (C7L – K1L) und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP804;

[0046] **Fig. 14** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pSD548 zur Deletion der Ribonucleotid-Reductase, großen Untereinheit, und zur Erzeugung des rekombinanten Vacciniavirus vP866 (NY-VAC); und

[0047] **Fig. 15** zeigt schematisch ein Verfahren zur Konstruktion von Plasmid pRW857, das zur Herleitung des rekombinanten NYVAC-Virus vP913 verwendet wurde, welches die MV-Hämagglutinin- und Fusions-Gene zusammen exprimiert.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0048] Die nachstehenden Beispiele dienen dem besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung und ihrer vielen Vorteile und werden lediglich zur Erläuterung dargestellt.

Beispiel 1 – Erzeugung von Vacciniavirus-Rekombinanten, die das Masern-Hämagglutinin-Gen enthalten

[0049] Das zur Herstellung der beiden Rekombinanten verwendete aufnehmende Virus war der Copenhagener-Stamm von Vacciniavirus, aus dem das Thymidinkinase-Gen deletiert worden war. Alle Viren wurden auf einschichtigem VERO-Zellrasen gezüchtet und titriert.

[0050] Der frühe/späte Vacciniavirus-H6-Promotor (Rosel et al., 1986; Taylor et al., 1988 a, b) wurde durch Aneinanderlagern der vier überlappenden Oligonucleotide, H6SYN A bis D, konstruiert. Die resultierende H6-Sequenz sieht folgendermaßen aus:

Vacciniavirus-H6-Promotor (SEQ ID NR: 1/SEQ ID NR: 2):

HindIII

5' AGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGG
GTTGT

AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACA

GTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCAATTATCGCGATATCCGTT
AAGTT
CAATTTAACTTTCGCTCTTTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAA
TTCAA

TGTATCGTAC-3'
ACATAGCATGAGCT-5'

XhoI

[0051] Bezugnehmend auf Fig. 1 wurden die aneinandergelagerten H6SYN-Oligonucleotide in das mit XhoI/HindIII gespaltene pMP2LVC ligiert, wodurch Plasmid pSP131 erhalten wurde. Das Plasmid pMP2LVC enthält die am weitesten links gelegenen 0,4 kbp der Vacciniavirus (Copenhagen Stamm)-HindIII-K-Region innerhalb von pUC18. Die Konstruktion von pMP2LVC wurde folgendermaßen durchgeführt: Ein 0,4 kbp großes HindIII/SalI-Fragment aus der HindIII-K-Region wurde isoliert und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2mM dNTPs mit glatten Enden versehen. Dieses Fragment wurde in pUC18 eingefügt, das mit PvuII gespalten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pMP2VC bezeichnet. Das Plasmid pMP2VC wurde mit SSpl linearisiert. Die synthetischen Oligonucleotide MPSYN52 (SEQ ID NR: 3) (5'-ATTATTTTATAAGCTTGGATCCCTCGAGGGTACCCCGGGGAGCTCGAATTCT-3') und MPSYN53 (SEQ ID NR: 4) (5'-AGAATTCGAGCTCCCGGGGGTACCCTCGAGGGATCCAAGCT-TATAAAAATAAT-3') wurden aneinandergelagert und in die am weitesten links gelegene der zwei innerhalb der Vacciniavirus-Sequenzen liegenden SSpl-Stellen eingefügt. Das resultierende Plasmid pMP2LVC enthält eine "Multiple-Cloning-Region" in der intergenen Region zwischen den offenen Leserastern K1L und K2L.

[0052] Die aneinandergelagerten Oligonucleotide 3P1 (SEQ ID NR: 5) (5'-GGGAAG-ATGGAACCAATCGCAGATAG-3') und 3P2 (SEQ ID NR: 6) (5'-AATTCTATCTG-CGATTGGGGTCCATCTTCCC-3'), die die äußersten 3'-Sequenzen des HA-Gens und ein klebriges EcoRI-Ende enthielten, wurden an ein 1,8 kbp großes XhoI/SmaI-Fragment aus pMH22, das den Rest des HA-Gens enthielt, und an das mit XhoI und EcoRI gespaltene pSP131 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit pSPMHA11 bezeichnet. Das Plasmid pMH22 wurde von einem cDNA-Clon mit voller Länge des Masern HA-Gens hergeleitet, indem am ATG-Initiations-Codon eine XhoI-Stelle erzeugt wurde (Alkhatib et al., 1986).

[0053] Ein 1,9 kbp großes HindIII/EcoRI-Fragment aus pSPMHA11, das das Masern-HA-Gen enthielt, wurde isoliert und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2mM dNTPs mit glatten Enden versehen. Das isolierte Fragment wurde in pMP409DVC eingefügt (Guo et al., 1989), das mit BalI gespalten und mit "Mung Bean"-Nuclease mit glatten Enden versehen worden war. Die Insertion in diesen Vektor ergab Plasmid pSPMHA41. Die XhoI-Stelle zwischen dem H6-Promotor und dem Initiations-Codon des HA-Gens wurde durch gezielte Doppelstrangbruch-Mutagenese mittels Oligonucleotiden (Mandecki, 1982) entfernt, wobei das Oligonucleotid HAXHOD (SEQ ID NR: 7) (5'-ATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCAC-CACAACGAGACCGGAT-3') verwendet wurde. Plasmid pSPM2LHAVC wurde durch dieses Verfahren erzeugt. Das Insertionsplasmid pSPM2LHAVC wurde für die in vitro-Rekombinationsexperimente mit Vacciniavirus vP458 als aufnehmendes Virus verwendet, wobei die Rekombinante vP557 erzeugt wurde. vP458 enthält das E. coli-lac-Z-Gen in der M2L-Insertionsstelle von vP410. Diese Vacciniavirus-Rekombinante enthält das Masern-HA-Gen im M2L-Locus des Genoms, wobei es das lac-Z-Gen ersetzt.

Beispiel 2 – Erzeugung von Vacciniavirus-Rekombinanten, die das Masern-Fusionsgen enthalten

[0054] Bezugnehmend auf Fig. 2 wurden die aneinandergelagerten Oligonucleotide 3PA (SEQ ID NR: 8)

(5'-CCTAAAGCCTGATCTTACGGGAACATCAAATCCTATGTAAGGTCGCTCTGATTTTTATCGGCCGA-3') und 3 PB (SEQ ID NR: 9) (5'-AGCTTCGGCCGATAAAAATCAGAGCGACCTTACATAGGATTTTGATGTTCCCGTAAGATCAGGCTTTAGG-3'), enthaltend das 3'Ende des Masern-Fusions-Gens, ein frühes Transkriptions-Terminations-Signal von Vacciniavirus (Yuen et al., 1987) und EagI- und HindIII-Enden, an ein 1 kBp großes Sall/HaeIII-Fragment aus pCRF2 (erhalten von C. Richardson, National Research Council of Canada (Biotechnology Institute), Montreal, Canada H3A 1A1) und das mit Sall und HindIII gesplattene pUC8 ligiert. Das resultierende Plasmid pMF3PR14 enthält das 3'-Ende des 1 kBp großen Fragments des Masern-Fusionsgens.

[0055] Die aneinandergelagerten Oligonucleotide 5PA (SEQ ID NR: 10) (5'-GGGATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTC-3') und 5PB (SEQ ID NR: 11) (5'-ATGGCAGAGACGTTACCTTGAGACCCATCC-3'), enthaltend eine 5'-SmaI-Stelle und eine 3'-BstXI-Stelle, wurden an ein 820 Bp großes BstXI/Sall-Fragment aus pCRF2 und das mit SmaI und Sall gesplattene pUC8 ligiert. Das resultierende Plasmid pSPMF5P16 enthält den 5'-Teil des Masern-Fusionsgens. Das 820 Bp große SmaI/Sall-Fragment aus pSPMF5P16 und das 1 kBp große Sall/EagI-Fragment aus pMF3PR14 wurden in pTP15 ligiert, das mit SmaI und EagI gesplatt worden war. Das Plasmid pTP15 (Guo et al., 1989) enthält den frühen/späten H6-Promotor von Vacciniavirus, flankiert durch Sequenzen aus dem HA-Locus des Vacciniavirus (Copenhagen Stamm)-Genoms. Das resultierende Plasmid, das das Masern-Fusionsgen direkt 3' neben dem H6-Promotor innerhalb des HA-Insertionsplasmids enthält, wurde mit pSPHMF7 bezeichnet.

[0056] Die gezielte Mutagenese mittels Oligonucleotiden wurde mit pSPHMF7 durchgeführt. Zuerst wurde eine in vitro-Mutagenesereaktion durchgeführt (Mandecki, 1982), um eine korrekte ATG:ATG-Verbindung des H6-Promotors mit dem Masern-Fusionsgen zu erzeugen, indem die SmaI-Stelle unter Verwendung des Oligonucleotids SPMD (SEQ ID NR: 12) (5'-TATCCGTTAAGTTTGTATGGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3') entfernt wurde. Hiermit wurde pSPMF75M20 erzeugt. Anschließend wurde die BglII-Stelle am 5'-Ende des H6-Promotors unter Verwendung von Oligonucleotid SPBGD (SEQ ID NR: 13) (5'-AATAAATCACTTTTATCTAATTCTTTATTCTATACTT-AAAAAGT-3') gemäß einem bekannten Verfahren (Mandecki, 1982) entfernt. Das resultierende Plasmid wurde mit pSPMFVC bezeichnet. Dieses Plasmid wurde für in vitro-Rekombinationsexperimente mit Vacciniavirus vP410 als aufnehmendes Virus zur Erzeugung von vP455 verwendet.

Beispiel 3 – Immunpräzipitations-Analyse

[0057] Um festzustellen, ob die Rekombinanten vP455 und vP557 authentische Proteine exprimierten, wurden Immunpräzipitationsexperimente im wesentlichen wie beschrieben durchgeführt (Taylor et al., 1990). In wenigen Worten, einschichtige VERO-Zellrasen wurden mit 10 pfu (Plaque-bildenden Einheiten) pro Zelle von entweder parentalen oder rekombinanten Viren in Gegenwart von ³⁵S-Methionin infiziert. Das Fusionsprotein wurde aus dem Lysat der infizierten Zellen spezifisch ausgefällt, wobei ein gegen ein Carboxy-terminales Fusionspeptid gerichtetes Kaninchen-Antiserum verwendet wurde. Das Hämagglutinin-Protein wurde aus dem Lysat der infizierten Zellen spezifisch ausgefällt, wobei ein polyclonales monospezifisches anti-Hämagglutinin-Serum verwendet wurde.

[0058] Bei der Immunpräzipitation unter Verwendung eines Fusions-spezifischen Serums wurden keine radioaktiv markierten Produkte in nichtinfizierten VERO-Zellen, in parental infizierten VERO-Zellen oder in Zellen, die mit der HA-Rekombinanten vP557 infiziert worden waren, nachgewiesen. In Zellen, die mit der Fusions-Rekombinanten vP455 infiziert waren, wurden der Fusions-Vorläufer F₀ mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kD und die zwei Spaltprodukte F1 und F2 mit Molekulargewichten von 44 kD und 23 kD nachgewiesen. Ähnlich wurden bei der Immunpräzipitation der glykosylierten Form des HA-Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 75–77 kD keine Produkte in nichtinfizierten VERO-Zellen, in parental infizierte Zellen oder in VERO-Zellen, die mit vP455 infiziert waren, nachgewiesen.

[0059] Außerdem zeigten Immunfluoreszenz-Studien, daß beide Proteine auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimiert wurden.

Beispiel 4 – Zellfusionsexperimente

[0060] Ein Merkmal der Zellpathogenität von Morbillivirus ist die Erzeugung von Synzytien, die entstehen, indem infizierte Zellen mit umgebenden nichtinfizierten Zellen fusionieren und anschließend die Zellkerne in den Mittelpunkt des Synzytiums wandern (Norrby et al., 1982). Es wurde gezeigt, daß dies ein wichtiges Verfahren der viralen Vermehrung darstellt, das bei Paramyxoviren in Gegenwart von Hämagglutinin-spezifischen Antikörpern stattfinden kann (Merz et al., 1980). Diese Fähigkeit ist aufgrund der Analogie mit anderen Paramyxoviren dem Amino-Terminus des F1-Peptides zugeschrieben worden (Choppin et al., 1981; Novick et al., 1988;

Paterson et al., 1987).

[0061] Um zu bestimmen, ob die in Vacciniavirus exprimierten Masernproteine funktionell aktiv waren, wurden einschichtige VERO-Zellrasen mit den parentalen oder rekombinanten Viren vP455 bzw. vP557 mit 1 pfu pro Zelle beimpft. Nach einstündiger Absorption bei 37°C wurde das Impfmateriale entfernt, das Überschichtungsmedium ersetzt und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. 18 Stunden nach der Infektion wurden die Platten mit einem Mikroskop begutachtet und fotografiert. Keine Zellfusionsaktivität zeigte sich bei VERO-Zellen, die mit parental Virus, vP455 oder vP557 geimpft worden waren. Wenn vP455 und vP557 jedoch zusammen inkubiert wurden, wurde eine effiziente Zellfusionsaktivität beobachtet.

[0062] Dieses Ergebnis ist kürzlich von Wild et al. (1991) bestätigt worden, die festgestellt haben, daß für die Bildung von Synzytien in einer Vielzahl von Zelllinien, die mit Masern/Vacciniavirus-Rekombinanten infiziert waren, die Expression von sowohl Fusions- als auch Hämagglutinin-Genen erforderlich waren. Das Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zu einem früheren Bericht (Alkhatib, 1990), in dem eine Zellfusion in 293 Zellen beschrieben wurde, die mit vielen verschiedenen Adenovirus-Rekombinanten, die das Masern-Fusionsprotein exprimierten, infiziert waren. Ähnlich wurde berichtet (Vialard et al., 1990), daß eine Zellfusion bei Insektenzellen beobachtet wurde, die mit einer Baculovirus-Rekombinante infiziert waren, die das Masern-Fusionsprotein jedoch nur exprimiert, wenn sie bei pH 5,8 inkubiert wurde. In keinem der Fälle wurde die Fusionsaktivität durch gleichzeitige Infektion mit der geeigneten Rekombinante, die das Masern-Hämagglutinin-Protein exprimiert, gesteigert. Variierbare Faktoren, die den Fusionsprozeß beeinflussen können, sind Zelltyp (Giraudon et al., 1984), der pH-Wert des Mediums (Vialard et al., 1990) und die Stärke der Expression des Fusionsproteins (Norrby et al., 1982).

Beispiel 5 – Serologische Tests

[0063] Die Technik zum Testen von Virus-neutralisierendem (VN) Antikörper wurde bereits früher ausführlich beschrieben (Appel et al., 1973). Der Test auf CDV-VN-Antikörpertiter wurde in VERO-Zellen mit dem adaptierten Onderstepoort-Stamm von CDV durchgeführt. Der Test auf MV-VN-Antikörpertiter wurde in VERO-Zellen mit dem adaptierten Edmonston-Stamm von MV durchgeführt. Die Ergebnisse der serologischen Tests werden in Tabelle 1 gezeigt.

[0064] Hunde, die, wie in Beispiel 6 beschrieben, mit entweder dem parental Vacciniavirus oder dem das Masern-Fusionsprotein exprimierenden vP455 immunisiert worden waren, entwickelten keinen neutralisierenden Antikörper gegen MV. Hunde die entweder mit dem das HA-Protein exprimierenden vP557 immunisiert oder mit den beiden Rekombinanten vP455 und vP557 gemeinsam geimpft worden waren, entwickelten nach einer einzigen Impfung neutralisierende Antikörper. Die Antikörperspiegel entsprachen denjenigen, die durch Impfung mit dem attenuierten Edmonston-Stamm von MV induziert worden waren.

Tabelle 1

Titer der Masernvirus-neutralisierenden Antikörper als Antwort auf die Impfung

Immunisierung	Hund-Nr.	Tage nach der Impfung					
		0 ^a	7	14	21 ^b	28	35 ^c
Vaccinia	4/1	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	4/2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
VP455	4/3	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	4/4	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
VP557	4/5	<1.0	2.2 ^d	2.9	2.9	3.4	3.4
	4/6	<1.0	2.7	2.9	2.9	3.9	3.4
VP455 & VP557	4/7	<1.0	2.7	3.4	3.2	3.4	3.4
	4/8	<1.0	2.5	2.9	2.9	3.6	2.9
MV	4/14				<1.0		2.9
	4/15				<1.0		3.2

a) Zeitpunkt der ersten Immunisierung

b) Zeitpunkt der zweiten Immunisierung (erste Immunisierung mit MV)

c) Zeitpunkt des Kontakts

d) Titer, ausgedrückt als log₁₀ der letzten Antikörper-Verdünnung, die in einem Mikrotiter-Neutralisationstest, wie von Appel et al. (1973) beschrieben, eine vollständige Neutralisation der Infektiosität zeigt.

[0065] Um zu bestimmen, ob die Expression der Masernvirus-Proteine in den Hunden, die mit den Rekombinanten geimpft worden waren, zur Induktion einer schützenden Immunantwort gegen eine CDV-Exposition ausreichte, wurden 14 spezielle pathogenfreie Beagle-Hunde im Alter von zehn Wochen in der Studie eingesetzt. Blutproben wurden zu Beginn des Experiments und danach wiederholt gesammelt. Vier Gruppen mit jeweils zwei Hunden in der Gruppe wurden mit zwei Injektionen im Abstand von drei Wochen immunisiert. Die erste Gruppe erhielt nur Vacciniavirus. Die zweite Gruppe erhielt Vacciniavirus mit einer Insertion für das F-Protein des Masernvirus (vP455). Die dritte Gruppe erhielt Vacciniavirus mit einer Insertion für das HA-Antigen von MV (vP557), und die vierte Gruppe erhielt eine Kombination aus 2 und 3. Jeder Hund wurde mit etwa 4×10^8 pfu Vacciniavirus in Volumina zu 1 ml geimpft (0,6 ml subcutan und 0,4 ml intramuskulär). Zwei Kontrollhunde erhielten 10^5 50%-Gewebekultur-infektiöse-Dosen ($TCID_{50}$) des attenuierten Edmonston-Stamms von MV intramuskulär (Menge von 1 ml) und zwei Kontrollhunde erhielten sc. 10^4 $TCID_{50}$ des attenuierten Rockborn-Stamms von CDV zwei Wochen vor dem Kontakt mit virulentem CDV. Zwei Kontrollhunde blieben vor dem Kontakt ungeimpft.

[0066] Alle Hunde wurden durch intranasale Infektion mit 1 ml Gewebekulturflüssigkeit, die 10^4 $TCID_{50}$ des Snyder Hill-Stamms des virulenten CDV enthielt, zwei Wochen nach der letzten Impfung in Kontakt gebracht. Die klinischen Reaktionen der Hunde wurden durch tägliche Beobachtungen und durch Messen der Körpertemperatur und durch zweimal wöchentlich durchgeführte Bestimmung der Zunahme bzw. Abnahme des Körpergewichts überwacht. Die zirkulierenden Blutlymphocyten wurden vor dem Kontakt und an den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach dem Kontakt (dpc) gezählt. Die Virusisolierung aus "Buffy coat"-Zellen durch gemeinsame Züchtung mit Hundelungen-Makrophagen (Appel et al., 1967) wurde an den dpc 3, 5, 7 und 10 versucht. Blutproben für die serologischen Tests wurden vor der Impfung und in wöchentlichen Intervallen bis zum Zeitpunkt des Kontakts und an den dpc 7, 10 und 20 gesammelt.

[0067] Die Ergebnisse des Kontakts finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 2

Auswirkung der Immunisierung auf die klinischen Zeichen nach Kontakt von Hunden mit virulentem CDV

Anzahl der Tage nach Infektion mit virulentem CDV		Anzahl der Tage nach Infektion mit virulentem CDV				
Immunisierung	Hund-Nr.	Entkräftung	Gewichts- verlust	erhöhte Körpertemp. ^a	Lympho- penie ^b	Virus- Isolierung ^c Tod
Vaccinia	4/1 4/2	4-10 ^d 4-10 ^d	3-10 3-10	4, 5, 7, 10 4, 5, 8-10	7-10 3-10	3-7 3-7 10 10
VP455	4/3 4/4	4-8 4-6	7-10 7-10	4, 5, 7-10 4-6	5, 7 7	5-7 5-7 - -
VP557	4/5 4/6	ND ^e ND	ND ND	6, 7 ND	10 ND	7 ND - -
VP455 & VP557	4/7 4/8	ND ND	ND 7	7 6	7 ND	7 7 - -
MV	4/14 4/15	ND ND	ND 7	ND 5	7 5	ND ND - -
CDV-Ro	4/16 4/17	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND - -
Keine	4/18 4/19	6, 14-17 ^d 4-10 ^d	7-17 3-10	5, 7 4, 5, 7	13-17 3, 7, 10	10 3-10 17 10

a) Über 39,5°C.

b) Weniger als 2×10^3 Lymphocyten pro mm³.

c) Isoliert aus "Buffy coat"-Zellen, die mit Hundelungen-Makrophagen zusammen gezüchtet wurden.

d) Hund litt an Dehydratation und wurde eingeschlachtet.

e) Nicht bestimmt.

[0068] Nicht-immunisierte Kontrollhunde und Hunde, die mit parentalem Vacciniavirus geimpft worden waren, entwickelten die klinischen Zeichen einer ernsten Erkrankung und wurden bei Auftreten der Dehydratation eingeschläfert. Die beiden mit vP455 immunisierten Hunde zeigten einige Zeichen einer Infektion mit CDV, umfassend Gewichtsverlust, erhöhte Körpertemperatur und Lymphopenie, jedoch waren diese Symptome von kürzerer Dauer als bei den Kontrollhunden. Trotzdem überlebten beide Hunde die letale CDV-Exposition. Hunde, die mit vP557 oder mit beiden Rekombinanten gemeinsam geimpft worden waren, zeigten minimale Zeichen einer Infektion und überlebten den Kontakt. Die Hunde, die entweder mit dem attenuierten Edmonston-Stamm von MV oder mit dem attenuierten Rockborn-Stamm von CDV geimpft worden waren, überlebten den Kontakt mit minimalen Zeichen einer Erkrankung.

Beispiel 7 – Weitere Vaccinia/Masern-Konstrukte

[0069] Bezugnehmend auf [Fig. 3](#) wurde eine zweite Vacciniavirus-Rekombinante, die das Masern-HA-Gen innerhalb des tk-Locus enthielt, erzeugt (vP756), wobei das Insertionsplasmid pRW843 verwendet wurde. pRW843 wurde folgendermaßen konstruiert. Ein 1,8 kBp großes EcoRV/SmaI-Fragment, enthaltend die am weitesten 3' gelegenen 24 Bp des H6-Promotors, fusioniert in einer korrekten ATG:ATG-Konfiguration an das HA-Gen, dem die am weitesten 3' gelegenen 26 Bp fehlten, wurde aus pSPM2LHAVC isoliert. Dieses Fragment wurde verwendet, um das 1,8 kBp große EcoRV/SmaI-Fragment von pSPMHA11 zu ersetzen, wodurch pRW803 erzeugt wird. Plasmid pRW803 enthält den gesamten H6-Promotor, der korrekt an das gesamte Masern-HA-Gen angehängt ist.

[0070] Bei Untersuchung von früheren Konstrukten mit dem Masern-HA-Gen fiel auf, daß die Sequenz für Codon 18 (CCC) im Vergleich zu der veröffentlichten Sequenz (Alkhatib et al., 1986) deletiert war. Die CCC-Sequenz wurde durch Oligonucleotid-Mutagenese mittels der Kunkel-Methode (Kunkel, 1985) ersetzt, wobei das Oligonucleotid RW117 (SEQ ID NR: 14) (5'-GACTATCCTACTTCCCTTGGGATGGGGTTATCTTTGTA-3') verwendet wurde.

Pro 18

[0071] Eine einzelsträngige Matrize wurde von Plasmid pRW819 hergeleitet, das die H6/HA-Kassette aus pRW803 in pIB125 (IBI, New Haven, CT.) enthält. Das mutagenisierte Plasmid, das das eingefügte (CCC) zur Codierung eines Prolinrestes bei Codon 18 enthält, wurde mit pRW820 bezeichnet. Die Sequenz zwischen den HindIII- und XbaI-Stellen von pRW820 wurde durch Nucleotidsequenzanalyse bestätigt. Die HindIII-Stelle liegt am 5'-Rand des H6-Promotors, während die XbaI-Stelle 230 Bp stromabwärts des Initiations-Codons des HA-Gens liegt. Ein 1,6 kBp großes XbaI/EcoRI-Fragment aus pRW803, das die codierenden HA-Sequenzen stromabwärts der XbaI-Stelle enthält und das Terminations-Codon einschließt, wurde verwendet, um das entsprechende Fragment aus pRW820 zu ersetzen, wodurch pRW837 erzeugt wurde. Die innerhalb von pRW837 enthaltene mutagenisierte Expressionskassette wurde durch Spaltung mit HindIII und EcoRI hergeleitet, unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2 mM dNTPs mit glatten Enden versehen und in die SmaI-Stelle von pSD573VCVQ eingefügt, wodurch pRW843 erhalten wurde. Das Plasmid pRW843 wurde für in vitro-Rekombinationsexperimente mit vP618 als aufnehmendes Virus verwendet, wodurch vP756 erhalten wurde. Das parentale Virus vP618 ist ein Copenhagen-Stamm-Virus, aus dem das Thymidinkinase-Gen, das hämorrhagische Gen und das A-Typ-Einschlußgen entfernt worden waren. Durch Immunpräzipitations-Analyse ist gezeigt worden, daß die Rekombinante vP756 ein rekombinantes Hämagglutinin-Glykoprotein von etwa 75 kD korrekt exprimiert.

[0072] Bezugnehmend auf [Fig. 4](#) wurde eine zweite Vacciniavirus-Rekombinante (vP800), die das Masern-Fusionsgen im ATI-Locus des Genoms enthält, unter Verwendung von Insertionsplasmid pRW850 erzeugt. Zur Konstruktion von pRW850 wurden die nachstehenden Arbeitsschritte durchgeführt. Plasmid pSPMF75M20, enthaltend das Masern-Fusionsgen, verbunden in einer korrekten ATG:ATG-Konfiguration mit dem H6-Promotor, wurde mit NruI und EagI gespalten. Das 1,7 kBp große Fragment mit glatten Enden, das die am weitesten 3' gelegenen 28 Bp des H6-Promotors und das gesamte Fusionsgen enthielt, wurde isoliert und in pRW823 eingefügt, das mit NruI und XbaI gespalten und mit glatten Enden versehen worden war. Das resultierende Plasmid pRW841 enthält den H6-Promotor, gebunden an das Masern-Fusionsgen, im Plasmidvektor pIB125 (IBI, New Haven, CT.). Die H6/Masern-Fusions-Expressionskassette wurde aus pRW841 durch Spaltung mit SmaI hergeleitet und das resultierende 1,8 kBp große Fragment in das mit SmaI gespaltene pSD494VC eingefügt, wodurch pRW850 erhalten wurde. Das Plasmid pRW850 wurde für in vitro-Rekombinationsexperimente mit vP618 als aufnehmendes Virus verwendet, wodurch vP800 erhalten wurde. Durch Immunpräzipitations-Analyse ist gezeigt worden, daß die Rekombinante vP800 ein authentisch prozessiertes Fusions-Glykoprotein exprimiert.

Beispiel 8 – Bestimmung von Masern-neutralisierendem Antikörper in Meerschweinchen und Kaninchen, die mit vP455 geimpft worden waren

[0073] Zwei Kaninchen wurden intradermal an fünf Stellen mit insgesamt 1×10^8 pfu der Rekombinante vP455 geimpft, die das Masern-Fusionsprotein exprimiert. Beide Kaninchen wurden in Woche 12 mit einer identischen Dosis wiedergeimpft. Serielle Blutproben wurden gesammelt und die Kaninchen in Woche 14, zwei Wochen nach der Wiederimpfung, auf das Vorliegen von neutralisierenden Antikörpern im Serum getestet.

[0074] Vier Meerschweinchen wurden subcutan mit jeweils 1×10^8 pfu der Rekombinante vP455 geimpft. Am Tag 21 wurde eine identische Wiederimpfung verabreicht. Serielle Blutproben wurden gesammelt.

[0075] Das Vorliegen von Masernvirus-neutralisierendem Antikörper im Serum wurde unter Verwendung eines Mikrotitertests (Appel et al., 1973) bestimmt, wobei 10 TCID₅₀ des Virus pro Mikrotiter-Vertiefung eingesetzt wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Ergebnisse der Masernvirus-neutralisierenden Antikörper im Serum von Meerschweinchen und Kaninchen, die mit VP455 geimpft worden waren

Woche nach der Impfung								
	0	2	3	4	5	7	14	
<u>Tier</u>								
Meerschweinchen								
1	N.D. ^a	N.D.	N.D.-.8 ^b	1.3-1.3	1.3-1.5	1.3	N.T ^c	
2	N.D.	N.D.	.8-1.0	.8-1.3	1.3-1.5	N.D.	N.T.	
3	N.D.	N.D.	N.D.-.8	.8-1.5	1.0-1.3	1.0	N.T.	
6	N.D.	N.D.	.8-.8	.8-	1.0-1.3	1.0	N.T.	
Kaninchen								
W44	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1.5	
W86	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1.5	
a) Nicht nachweisbar.								
b) Ergebnisse aus zwei Tests.								
c) Nicht getestet.								

Beispiel 9 – Erzeugung von Masernvirus-rekombinanten Kanarienvirus

[0076] Masern/Kanarienvirus-Rekombinanten wurden entwickelt, wobei eine ähnliche Strategie wie diejenige verwendet wurde, die früher für Geflügelpockenvirus beschrieben wurde (Taylor et al., 1988 a, b).

[0077] Plasmide zur Insertion der Masern-F- und -HA-Gene in Kanarienvirus wurden folgendermaßen erzeugt.

[0078] Bezugnehmend auf [Fig. 5](#) wurde das 1,8 kbp große BalII/EagI-Fragment mit glatten Enden aus pSPMF75M20, enthaltend das mit dem H6-Promotor versehene Masern-F-Gen, in die mit glatten Enden versehene EcoRI-Stelle von pRW764.2 eingefügt. Das Plasmid pRW764.2 enthält ein 3,4 kbp großes PvuII-Fragment aus dem Kanarienvirusgenom, das eine einzige EcoRI-Stelle aufweist, wobei nachgewiesen wurde, daß sie für die virale Replikation nicht essentiell ist. Das resultierende Plasmid, das das Masern-F-Gen enthält, wurde mit pRW800 bezeichnet und für Rekombinationsexperimente mit Kanarienvirus als aufnehmendes Virus verwendet, wodurch vCP40 erhalten wurde.

[0079] Bezugnehmend auf [Fig. 6](#) wurde das 1,8 kbp große EcoRV/SmaI-Fragment aus pSMP2LHA, enthaltend die am weitesten 3' gelegenen 28 bp des H6-Promotors, fusioniert in einer korrekten ATG:ATG-Konfiguration an das HA-Gen, zwischen der EcoRV- und der SmaI-Stelle von pSPMHA11 eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde mit pRW803 bezeichnet. Ein 2 kbp großes HindIII/EcoRI-Fragment aus pRW803, enthaltend das mit dem H6-Promotor versehene Masern-HA-Gen, wurde mit glatten Enden versehen und in die mit glatten Enden versehene BalII-Stelle von Plasmid pRW764.5 eingefügt. Das Plasmid pRW764.5 enthält ein 800 bp großes PvuII-Fragment aus dem Kanarienvirusgenom, das eine einzige BalII-Stelle aufweist, wobei früher gezeigt worden war, daß sie für das virale Wachstum nicht essentiell ist. Durch diese Insertion wurde Plasmid pRW810 erzeugt, das für Rekombinationstests verwendet wurde, wodurch vCP50 erhalten wurde.

[0080] Die einzelne Insertion der Masern-F- und -HA-Sequenzen führte zur Entwicklung der Rekombinanten vCP40 bzw. vCP50. Zur Erzeugung einer Doppelrekombinante wurde die Einfach-F-Rekombinante vCP40 als aufnehmendes Virus für die Insertion des in pRW810 enthaltenen HA-Gens verwendet. Dies führte zur Entwicklung der Doppelrekombinante vCP57.

Beispiel 10 – Immunpräzipitations-Analyse

[0081] Zur Bestätigung, daß die Rekombinanten vCP40, vCP50 und vCP57 authentische Proteine exprimierten, wurde eine Immunpräzipitations-Analyse durchgeführt, wobei monospezifische Seren verwendet wurden, die entweder gegen die HA- oder die F-Proteine gerichtet waren. Ein korrekt prozessiertes Fusionspolypeptid wurde aus Lysaten der mit vCP40 und vCP57 infizierten Zellen spezifisch ausgefällt. Der Fusionsvorläufer F₀ mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kD und die zwei Spaltprodukte F1 und F2 mit Molekulargewichten von etwa 44 bzw. 23 kD wurden nachgewiesen. Keine Fusions-spezifischen Produkte waren in nichtinfizierten Zellen, parental infizierten CEF-Zellen oder CEF-Zellen, die mit der HA-Rekombinante vCP50 infiziert waren, nachweisbar. Genauso wurde ein Glykoprotein mit etwa 75 kD aus solchen CEF-Zellen spezifisch ausgefällt, die mit der Einfach-HA-Rekombinante vCP50 und mit der Doppelrekombinante vCP57 infiziert waren. Keine HA-spezifischen Produkte wurden in nichtinfizierten Zellen, parental infizierten Zellen oder Zellen, die mit der Fusions-Rekombinante vCP40 infiziert waren, nachgewiesen.

Beispiel 11 – Zellfusionsexperimente

[0082] Zur Feststellung, daß die Masernvirus-Rekombinanten funktionell aktiv waren, wurden Zellfusionstests durchgeführt. Einschichtige VERO-Zellrasen wurden mit 1 pfu pro Zelle von parental oder rekombinanten CP-Viren infiziert und 18 Stunden nach der Infektion auf cytopathische Veränderungen in den Zellen untersucht. Keine Zellfusionsaktivität zeigte sich in VERO-Zellen, die mit parental Viren, vCP40- oder vCP50-Viren beimpft worden waren. Wenn die VERO-Zellen jedoch mit der Doppelrekombinante vCP57 beimpft wurden oder wenn die Zellen gleichzeitig mit sowohl vCP40 als auch vCP50 infiziert sind, zeigt sich eine wirksame Zell-fusionierende Aktivität.

Beispiel 12 – Serologische Tests

[0083] Hunde, die, wie in Beispiel 13 beschrieben, mit der Kanarienvirus/HA-Rekombinante vCP50, der Vaccinia/HA-Rekombinante vP557 oder der Kanarienvirus/HA/F-Doppelrekombinante vCP57 geimpft oder mit vP455 und vP557 zusammen geimpft wurden, entwickelten nach einer Impfung signifikanten neutralisie-

renden Serumantikörper gegen Masernvirus. Keiner der beiden Hunde, die mit der Kanarienvpocken/F-Rekombinante vCP40 geimpft worden waren, entwickelte nach einer oder zwei Impfungen neutralisierenden Antikörper. Die Ergebnisse der serologischen Tests werden in Tabelle 4 gezeigt.

[0084] Außerdem entwickelten Meerschweinchen, die mit der Rekombinante vCP40 geimpft worden waren, niedrige aber reproduzierbare Spiegel von neutralisierendem Antikörper im Serum.

Tabelle 4
Masernvirus-neutralisierende Antikörper-Titer (in $\log^{10}$)

		Tage nach der Impfung					
Immunisierung	Hund-Nr.	0 ^a	7	14	21 ^b	28	35 ^c
Kanarienvirus (CPV)	9/ 1	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	9/ 2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
VCP50	9/ 3	<1.0	2.7 ^d	2.9	3.2	4.4	4.1
	9/ 4	<1.0	1.7	2.7	2.7	3.9	3.9
VCP40	9/ 5	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	9/ 6	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
VCP57	9/ 7	<1.0	2.0	2.7	2.5	3.9	3.6
	9/ 8	<1.0	1.0	2.2	2.0	3.6	3.4
VP455	9/ 9	<1.0	<1.0	<1.0	1.0	1.0	1.0
VP557	9/10	<1.0	2.9	2.5	3.2	3.4	3.4
VP455 & VP557	9/11	<1.0	1.3	2.9	2.9	2.9	2.9
MV	9/12				<1.0	2.5	2.5
Kontrolle	9/13						<1.0
	9/14						<1.0
CDV-Ro	9/15				<1.0	<1.0	<1.0
a) Zeitpunkt der ersten Immunisierung							
b) Zeitpunkt der zweiten Immunisierung (erste Immunisierung mit MV und CDV-Ro)							
c) Zeitpunkt des Kontakts							
d) Bestimmung von Neutralisationstiter im Serum in bekannter Art und Weise (Appel et al., 1973).							

[0085] Um festzustellen, ob nichtreplizierende Kanarienvirus-Vektoren, die Masernvirusproteine exprimieren, eine schützende Immunantwort gegen die CDV-Exposition induzieren können, wurden spezielle pathogenfreie Beagle-Hunde im Alter von zehn Wochen mit parentalen und rekombinanten Kanarienvirus-Vektoren geimpft. Je zwei Hunde wurden gleichzeitig mit zwei subcutanen Injektionen von 1×10^8 pfu von jeder Rekombinante im Abstand von drei Wochen geimpft. Zum Vergleich wurde je ein Hund in gleicher Weise mit jeder der Vacciniavirus-Einzelrekombinanten vP455 und vP557 und einer Kombination aus den beiden geimpft. Ein Hund wurde außerdem mit einer Dosis von 10^5 TCID₅₀ des attenuierten Edmonston-Stamms von MV intramuskulär geimpft. Ein Hund wurde mit einer Dosis von 10^4 TCID₅₀ des attenuierten Rockborn-Stamms von CDV subcutan geimpft. Die Hunde wurden zwei Wochen nach der letzten Impfung mittels intranasaler Infektion mit einer letalen Dosis von 10^4 TCID₅₀ des virulenten Snyder Hill-Stamms von CDV in Kontakt gebracht. Die klinischen Reaktionen der Hunde wurden täglich überwacht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

Auswirkung der Immunisierung auf die klinischen Zeichen nach Kontakt der Hunde mit virulentem CDV

Anzahl der Tage nach der Impfung mit virulentem CDV

Immunisierung	Hund-Nr.	Entkräftung	Gewichts- verlust	erhöhte Körpertemp. ^a	Lympho- penie ^b	Virus- Isolierung ^c
Kanarienvirus (CPV)	9/ 1 9/ 2	4-10 ^d 4-10 ^d	3-10 7-10	4,5,7,8 4,5,7,8	5-10 3-10	3-10 3-10
VCP50	9/ 3 9/ 4	ND ^e ND	7-10 7	5-7 6,7	5-7 7	7 ND
VCP40	9/ 5 9/ 6	4-10 4-6	3-10 3-10	4 4-6	5-10 5	5-7 5-7
VCP57	9/ 7 9/ 8	ND ND	7-10 7-10	5,6 4-7,10	5 7-10	ND 5-7
VP455	9/ 9	6-8	7-10	4,5,8,9	5-10	3-10
VP557	9/10	ND	3-10	ND	ND	ND
VP455 & VP557	9/11	ND	3-10	ND	5-7	ND
MV	9/12	ND	7-10	ND	5	5
Keine	9/13 9/14	4-10 ^d 4-10 ^d	3-10 3-10	4-6 4-5	5-10 3-10	5-10 5-7
CDV-Ro	9/15	ND	ND	ND	ND	ND

a) Über 39,5°C. b) Weniger als 2×10^3 Lymphocyten pro mm³.

c) Isoliert aus "Buffy coat"-Zellen, die mit Hundelungen-Makrophagen in bekannter Art und Weise (Appel et al., 1967) zusammen gezüchtet wurden.

d) Hunde litten an Dehydratation und wurden eingeschläfert. e) Keine nachgewiesen.

[0086] Bei keinem der Hunde wurden im Verlauf des Experiments ungünstige Reaktionen auf die Impfung festgestellt. Die zwei Hunde, die mit parentalem Kanarienvirus immunisiert worden waren, und zwei nichtimmunisierte Kontrollhunde zeigten nach dem Kontakt mit dem virulenten CDV eine ernste Erkrankung. Alle vier Hunde zeigten Entkräftung, erhöhte Körpertemperatur, Gewichtsverlust, Lymphopenie und ernste Dehydratation. Die mit CDV-Rockborn immunisierten Hunde entwickelten vor dem Kontakt neutralisierende Antikörper im Serum gegen CDV, nicht jedoch gegen MV, und überlebten den Kontakt ohne Symptome. Die mit attenuiertem MV immunisierten Hunde entwickelten vor dem Kontakt neutralisierende Antikörper im Serum gegen MV, nicht jedoch gegen CDV, und überlebten den Kontakt mit schwachen Zeichen einer Infektion. Die Hunde, die mit vCP50, vCP57, vP557 geimpft oder mit vP455 und vP557 gemeinsam geimpft worden waren, entwickelten nach einer einzigen Impfung signifikanten neutralisierenden Serumantikörper gegen MV und überlebten den Kontakt mit nur sehr schwachen Zeichen einer Infektion.

Beispiel 14 – Weitere Kanarienvirus/Masern-Konstrukte

[0087] Bezugnehmend auf [Fig. 7](#) wurden zum Erhalt einer Kanarienvirus-Rekombinante, die das MV-HA-Gen exprimiert, die nachstehenden Insertionsplasmide erzeugt. Ein 1,8 kbp großes EcoRV/EcoRI-Fragment aus pRW837, enthaltend die am weitesten 3' gelegenen 26 Bp des H6-Promotors, korrekt fusioniert an das Masern-HA, wurde an ein 3,2 kbp großes EcoRV/EcoRI-Fragment aus pRW838 ligiert. Das von pRW838 stammende Fragment umfaßt den 5'-Bereich des H6-Promotors und flankierende Arme des C5-Locus. Die Plasmide pRW838 und pRW831 (vgl. nachstehend) wurden folgendermaßen erhalten.

[0088] Ein 880 Bp großes PvuII-Kanarienvirus-Genomfragment wurde zwischen die PvuII-Stellen von pUC9 eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde mit pRW7G4.5 bezeichnet. Die Nucleotidsequenz des 880 Bp großen Kanarienvirus-Fragments wurde bestimmt, wobei das modifizierte T7 Enzyme Sequenase™-Kit (United States Biochemical, Cleveland, OH) gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet wurde. Bei den Sequenzierungsreaktionen wurden herkömmlich synthetisierte Primer (mit 17 bis 18 Nucleotiden) verwendet, die mit dem Biosearch 8700 (San Rafael, CA) oder dem Applied Biosystems 3800 (Foster City, CA) hergestellt wurden. Hiermit wurde die Definition des offenen Leserasters C5 ermöglicht.

[0089] Um spezifisch das offene Leseraster C5 zu deletieren, wurde pRW764.5 mit RsaI partiell gespalten und das lineare Produkt isoliert. Das lineare RsaI-Fragment wurde erneut mit BglII gespalten und das pRW764.5 mit einer RsaI-BglII-Deletion von Position 156 bis Position 462 isoliert und als Vektor für die nachstehenden synthetischen Oligonucleotide verwendet: RW145 (SEQ ID NR: 15): (5'-ACTCTCAAAAGCTTC-CCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTTATAAA-3') RW146 (SEQ ID NR: 16): (5'-GATCTTTATAAAAAGCTAGCTAGCTAGAATTCCTGGGAAGCTTTTGAGAGT-3').

[0090] Die Oligonucleotide RW145 und RW146 wurden aneinandergelagert und in den vorstehend beschriebenen pRW764.5-RsaI-BglII-Vektor eingefügt. Das resultierende Plasmid ist pRW831.

[0091] Dieses Plasmid mit C5-Deletion wurde ohne Unterbrechung anderer offener Leseraster des Kanarienvirus konstruiert. Die C5-codierende Sequenz wurde durch die vorstehenden aneinandergelagerten Oligonucleotide (RW145 und RW146) ersetzt, die die Restriktionsstellen für HindIII, SmaI und EcoRI enthalten.

[0092] Das Plasmid pRW838 wurde aus pRW831 hergeleitet, indem ein SmaI-Fragment, enthaltend das Rabies-G-Gen (Taylor et al., 1988 b), 3' neben dem Vacciniavirus-H6-Promotor eingefügt wurde. Die Ligierung des 1,8 kbp großen EcoRV/EcoRI-Fragments aus pRW837 mit dem 3,2 kbp großen EcoRV/EcoRI-Fragment aus pRW838 führte zur Konstruktion von Plasmid pRW852. Das Plasmid pRW852 wurde zusammen mit einem ALVAC genannten Kanarienvirusisolat in Rekombinationsexperimenten eingesetzt, wodurch vCP85 erhalten wurde. ALVAC ist ein Plaque-cloniertes Isolat des Kanarienvirus (CPV), das vom Rentschler-Stamm, einem zur Impfung von Kanarienvögeln verwendeten, stark attenuierten CPV-Stamm, abstammt. Die Replikation von ALVAC und davon abgeleiteten Rekombinanten ist auf Vogelarten beschränkt. Die Immunpräzipitations-Analyse hat bestätigt, daß in den mit rekombinantem vCP85 infizierten CEF-Zellen ein Protein mit etwa 75 kD exprimiert wird, das von einem anti-HA-Serum des Kaninchens erkannt wird.

[0093] Bezugnehmend auf [Fig. 8](#) wurden zur Erzeugung einer Kanarienvirus-Rekombinante, die sowohl die MV-HA- als auch -F-Gene enthält, die nachstehenden Konstrukte gentechnisch hergestellt. SmaI-Restriktionsstellen wurden an die Enden des mit dem H6-Promotor versehenen Masern-Fusionsgens angefügt. Um dies zu erreichen, wurde pRW823, das das den Vacciniavirus-H6-Promotor enthaltende pIBI25 ist, stromabwärts der Promotorsequenz an der XbaI-Stelle gespalten. Die Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2 mM dNTPs in glatte Enden überführt. Die mit glatten Enden ver-

sehende DNA wurde sodann mit NruI gespalten, wodurch ein 3,0 kBp-Fragment freigesetzt wurde, das die am weitesten 5' gelegenen 100 Bp des H6-Promotors enthielt. Dieses Fragment wurde isoliert und an ein mit glatten Enden versehenes, 1,7 kBp großes EagI/NruI-Fragment aus pSPMF75 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit pRW841 bezeichnet.

[0094] Das durch Spaltung aus pRW841 erhaltene 1,8 kBp große SmaI-Fragment wurde in den Vektor mit C5-Deletion, pRW831, eingefügt. Das Plasmid pRW851 wurde an der EcoRI-Stelle, die 3' zum Fusionsgen liegt, linearisiert und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2 mM dNTPs mit glatten Enden versehen. Das Plasmid pRW837, das das Masern-HA-Gen 3' neben den H6-Promotor-Sequenzen enthält, wurde mit HindIII und EcoRI gespalten und mit dem Klenow-Fragment mit glatten Enden versehen. Das resultierende 1,8 kBp große Fragment wurde isoliert und in pRW851 eingefügt, das mit EcoRI linearisiert und mit glatten Enden versehen worden war. Das resultierende Plasmid, das die beiden Gene in einer Schwanz-an-Schwanz-Konfiguration enthält, wurde mit pRW853A bezeichnet und in den in vitro-Rekombinationsexperimenten mit Kanarienviren (ALVAC) als das aufnehmende Virus verwendet, wodurch vCP82 erzeugt wurde, das auch mit ALVAC-MV bezeichnet wird. Die Analyse der Expression unter Verwendung von Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz bestätigte, daß in den mit der Rekombinante vCP82 infizierten Zellen authentisch prozessierte HA- und F-Proteine exprimiert wurden. Die Rekombinante war auch bzgl. der Zellfusionsaktivität funktionell.

Ergebnisse der serologischen Analysen von Seren von Kaninchen und Meerschweinchen, die mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft worden waren

[0095] Vier Meerschweinchen wurden subcutan mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft. Zwei Tiere (026 und 027) erhielten jeweils 1×10^8 pfu und zwei Tiere (028 und 029) erhielten jeweils 10^7 pfu. Am Tag 28 wurden die Tiere mit einer äquivalenten Dosis wiedergeimpft. Zwei Kaninchen wurden mit 1×10^8 pfu von ALVAC-MV (vCP82) subcutan geimpft. Am Tag 28 wurden die Tiere mit einer äquivalenten Dosis wiedergeimpft. Serielle Blutproben dieser Tiere wurden auf Masernvirus-neutralisierende Aktivität analysiert, wobei entweder ein von Appel und Robson (1973) beschriebener Mikrotiter-Neutralisationstest oder ein von Albrecht et al. (1981) beschriebener Plaque-Reduktion-Neutralisationstest verwendet wurde. Außerdem wurden die Seren auf das Vorliegen von Antikörper analysiert, der zur Blockierung der durch Masernvirus induzierten Zell-Zell-Fusion befähigt ist, wobei ein Anti-Fusionstest verwendet wurde, der, wie von Merz et al. (1980) beschrieben, durchgeführt wurde.

[0096] Die Ergebnisse der Analyse auf das Vorliegen von Masernvirus-neutralisierendem Antikörper im Serum werden in den Tabellen 6 und 7 dargestellt. Beide Meerschweinchen (026 und 027), die 1×10^8 pfu ALVAC-MV erhalten hatten, wiesen nach einer einzigen Impfung Serokonversion auf, nach der zweiten Wiederimpfung zeigten die Seren einen Antikörperanstieg. Ein Tier (029), das 1×10^7 pfu erhalten hatte, zeigte auch nach einer einzigen Impfung Serokonversion. Das vierte Tier (028) zeigte nach einer Impfung keine nachweisbare Antwort, erreichte jedoch nach der zweiten Impfung äquivalente Titer.

[0097] Kaninchenserum wurden auch analysiert, indem ein Plaque-Reduktion-Neutralisationsverfahren verwendet wurde. Die Ergebnisse werden in Tabelle 7 dargestellt. Beide Tiere zeigten nach einer Impfung Serokonversion. Das Serum von Kaninchen 063 wurde sowohl durch den Mikrotiter-Neutralisationstest als auch durch den Plaque-Reduktion-Neutralisationstest getestet. Die erhaltenen Titer waren unter Verwendung beider Verfahren ähnlich. Aus Veröffentlichungen geht hervor, daß bei Kindern zum Schutz vor Krankheiten ein minimaler neutralisierender Serumtiter von 1,2 bis 1,9 erforderlich ist (Lennon und Black, 1986; Black et al., 1984). Unter Berücksichtigung dieses Wertes zeigten alle Tiere mit Ausnahme des einen Meerschweinchens, das bis zur zweiten Impfung keine Serokonversion aufwies, nach einer einzigen Impfung einen schützenden Antikörperspiegel.

Tabelle 6

Serologische Analyse der Seren von Meerschweinchen, die mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft worden waren:
Die Analyse wurde mittels Mikrotiter-Serum-Neutralisationstest durchgeführt.

Tier	Tage nach der Impfung						
	0	14	21	28 ^c	42	48	56
Meerschweinchen							
026^d	-	N.T. ^a	1.25 ^b	1.49	2.45	2.68	2.92
027	-	N.T.	1.97	1.49	2.68	2.45	2.21
028^e	-	N.T.	-	-	1.73	2.45	1.97
029	-	N.T.	0.8	1.49	2.45	2.45	2.45

a) Nicht getestet.

b) Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ des reziproken Wertes der letzten Verdünnung, die eine vollständige Neutralisation des cytopathischen Effekts zeigt.

c) Tiere, die am Tag 28 nach der Impfung wiedergeimpft wurden.

d) Tiere 026 und 027, die 1×10^8 pfu erhielten.

e) Tiere 028 und 029, die 1×10^7 pfu erhielten.

Tabelle 7

Serologische Analyse der Seren von Kaninchen, die mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft worden waren.

Tier	Tage nach der Impfung					
	0	14	21	28 ^b	42	56
Plaque-Reduktionsverfahren						
063	-	1.9 ^a	2.8	1.6	2.2	2.2
064	-	2.2	2.5	2.8	3.1	2.8
Mikrotiter-Neutralisationsverfahren						
063	-	1.5 ^c	1.7	1.5	1.7	

a) Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ des reziproken Wertes der letzten Verdünnung, die im Vergleich zum Serum vor der Impfung eine 50% Reduktion der Plaquezahl zeigt.

b) Tiere, die am Tag 28 nach der Impfung wiedergeimpft wurden.

c) Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ des reziproken Wertes der letzten Verdünnung, die eine vollständige Neutralisation des cytopathischen Effekts zeigt.

[0098] Frühere Studien haben gezeigt, daß ein inaktivierter Impfstoff mit einer schwachen Schutzwirkung einherging und bei erneutem Kontakt mit dem Virus zu einer stärkeren Masern-Erkrankung führte. Empfänger des inaktivierten Impfstoffs zeigten ein Fehlen von Antikörper gegen Fusionsprotein, und es wurde vermutet, daß das Protein durch den Inaktivierungsprozess nichtimmunogen gemacht wurde (Norrby und Gollmar, 1975; Norrby et al., 1975). Außerdem ist für andere Paramyxoviren gezeigt worden, daß Antikörper gegen das F-Protein befähigt sind, die Zelle-zu-Zelle-Ausbreitung des Virus in einer Gewebekultur zu hemmen, daß dagegen Antikörper gegen die Hämagglutinin-Komponenten hierzu nicht befähigt sind (Merz et al., 1980).

[0099] Deshalb war es wichtig, zu zeigen, daß Tiere, die mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft worden waren, den Antikörper gegen die F-Komponente induzierten, der zur Blockierung der Zelle-zu-Zelle-Übertragung von Masernvirus befähigt war. Die Ergebnisse dieses Antifusionstests werden in Tabelle 8 dargestellt. Antifusionsaktivität zeigte sich in Seren von sowohl Meerschweinchen als auch Kaninchen, die mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft worden waren. Die analysierten Seren wurden zwei oder drei Wochen nach der Wiederimpfung entnommen. Keine Antifusionsaktivität konnte in Seren von Kaninchen nachgewiesen werden, die mit dem parenteralen ALVAC-Virus geimpft worden waren.

Tabelle 8 Analyse der Seren von Meerschweinchen und Kaninchen, die mit ALVAC-MV geimpft worden waren, auf Antifusionsaktivität

Tier	Bezeichnung	Immunogen	Antifusionstiter	
			vor Impfg.	nach Impfg.
Meerschw.	026	ALVAC-MV	-	2,4 ^{a, b}
	027	ALVAC-MV	-	1,2
Kaninchen	063	ALVAC-MV	-	1,8 ^c
	064	ALVAC-MV	-	1,8
Kaninchen	W121	ALVAC	-	-
	W123	ALVAC	-	-

a) Meerschweinchenserum, die 7 Wochen nach der Impfung getestet wurden.

b) Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ des reziproken Wertes der höchsten Verdünnung, die eine vollständige Hemmung der durch Masernvirus induzierten Zellfusionierenden Aktivität zeigt.

c) Test der Kaninchenserum sechs Wochen nach der Impfung.

[0100] Weitere Tests, um das Vorliegen von Antikörper gegen sowohl die MV-Hämagglutinin- als auch MV-Fusionsproteine in Seren von Tieren zu zeigen, die mit ALVAC-MV geimpft worden waren, wurden als Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß Seren von Kaninchen, die mit ALVAC-MV geimpft worden waren, aus radioaktiv markierten Lysaten von mit dem Edmonston-Stamm von MV infizierten VERO-Zellen sowohl die Hämagglutinin- als auch Fusions-Proteine spezifisch ausfällten.

[0101] In einer ähnlichen Studie wurden Gruppen von Meerschweinchen, Kaninchen und Mäusen mit ALVAC-MV intramuskulär geimpft und ihre serologische Antwort auf Masernvirus unter Verwendung des Hämagglutinations-Hemmungs(HI)-Tests überwacht. Die serologische Antwort auf Kanarienvirus wurde durch den ELISA-Test sichtbar gemacht. In dieser Studie wurden fünf Meerschweinchen mit $5,5 \log_{10}$ TCID₅₀, dreißig Mäuse mit $4,8 \log_{10}$ TCID₅₀ und fünf Kaninchen mit $5,8 \log_{10}$ TCID₅₀ geimpft. Alle Tiere wurden am Tag 28 mit einer äquivalenten Dosis wiedergeimpft. Von den Tieren wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen und ihre Antwort auf Masernvirus in einem HI-Test bestimmt. Die Nachweisgrenze des HI-Tests entspricht einem $\log_{10}$ -Titer von 1, wobei man in Betracht ziehen muß, daß seropositive (geschützte) Kinder einen Serumtiter im Bereich von 1,6 bis 2,8 aufweisen. Die Ergebnisse der Analyse werden in den Tabellen 9, 10 und 11 gezeigt.

[0102] Seren von Mäusen wurden in Gruppen von fünf Tieren analysiert (Tabelle 9). Alle Tiere zeigten eine Primärantwort auf Kanarienvirus, die nach der zweiten Impfung verstärkt war. Die Mäuse zeigten nach einer Impfung keine Antwort auf MV. Drei von sechs Gruppen zeigten acht Wochen nach der Impfung Titer innerhalb des schützenden Bereichs. Ähnlich zeigten alle Meerschweinchen (Tabelle 10) nach einer Impfung eine Antwort auf Kanarienvirus, die nach der zweiten Impfung verstärkt war. Vier von fünf Tieren entwickelten nach einer Impfung anti-HI-Titer, wobei einer davon im schützenden Bereich lag. Eine Woche nach der zweiten Impfung lagen die Titer von allen Tieren im schützenden Bereich. Diese Titer blieben während der acht Wochen nach der Impfung erhalten, bis das Experiment abgeschlossen wurde. Alle mit ALVAC-MV (vCP82)

geimpften Kaninchen (Tabelle 11) zeigten eine serologische Antwort auf die Kanarienvpocken-Impfung. Vier von fünf Tieren zeigten nach einer Impfung Serokonversion gegen Masernvirus (eines im schützenden Bereich). Die Serumtiter aller Tiere lagen eine Woche nach der zweiten Impfung im schützenden Bereich.

Tabelle 9

Serologische Antwort von Mäusen auf die Impfung mit ALVAC-MV (vCP82)

Anti-Kanarienvpocken-Antwort

ELISA-TITER	Woche nach der Impfung					
Maus-Gruppe	0	2	4	5	6	8
1 ^a	-0.009 ^b	0.364	0.193	1.821	1.616	1.123
2	-0.026	0.047	0.240	1.739	1.963	1.986
3	-0.006	0.148	0.641	1.860	1.861	1.947
4	-0.005	0.130	0.451	1.506	1.937	1.124
5		0.687	0.542			
Mittelw.	-0.012	0.275	0.413	1.732	1.844	1.395

Anti-Masern-Antwort

HI-TITER	Woche nach der Impfung					
Maus-Gruppe	0	2	4	5	6	8
1	<1 ^c	<1	<1	<1	1	1
2	<1	<1	<1	1	1.6	1.6
3	<1	<1	1	1	2.2	2.2
4	<1	<1	<1	1.6	1	1.8
5	<1	<1	<1	1.3	1.8	1.2
Mittelw.	-	-	1	1.2	1.5	1.5

a) Gruppen von fünf Mäusen wurden ausgeblutet und die Seren vereinigt.

b) Optische Dichte in einem ELISA-Test mit Seren in einer Verdünnung von 1:800.

c) Nachweisgrenze im HI-Test entspricht einem $\log_{10}$ -Titer von 1, d.h. einer Verdünnung von 1:10. Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ des reziproken Wertes der höchsten Verdünnung, die eine Hemmung der Hämagglutination zeigt.

Tabelle 10

Serologische Antwort von Meerschweinchen auf die Impfung mit ALVAC-MV (vCP82)

Anti-Kanarienvpocken-Antwort

ELISA-TITER	Woche nach der Impfung					
Meerschw.	0	2	4	5	6	8
1	0.038 ^a	0.045	0.111	.771	1.970	1.856
2	0.010	0.072	0.234	1.768	1.786	1.785
3	-0.011	0.426	0.529	1.567	1.586	1.700
4	0.016	0.045	0.076	1.583	1.696	1.635
5	-0.020	0.012	0.050	1.583	1.859	1.847

Anti-Masern-Antwort

HI-TITER	Woche nach der Impfung					
Meerschw.	0	2	4	5	6	8
1	<1 ^b	1.18	1.90	3.11	3.41	3.11
2	<1	<1	1.00	2.20	2.20	2.08
3	<1	<1	1.18	2.51	2.68	2.98
4	<1	<1	<1	1.60	1.90	1.90
5	<1	<1	1.30	1.90	2.20	2.20

a) Optische Dichte in einem ELISA-Test mit Serum in einer Verdünnung von 1:3200.

b) Nachweisgrenze im HI-Test entspricht einem log₁₀-Titer von 1, d.h. einer Verdünnung von 1:10. Titer, ausgedrückt wie in der Legende von Tabelle 9.

Tabelle 11

Serologische Antwort von Kaninchen auf die Impfung mit ALVAC-MV (vCP82)

Anti-Kanarienvpocken-Antwort

ELISA-TITER	Woche nach der Impfung					
Kaninchen	0	2	4	5	6	8
1 ^a	-0.009 ^a	0.085	0.113	1.953	1.754	1.249
2	-0.002	0.065	0.068	0.717	0.567	0.353
3	-0.003	0.090	0.079	0.921	0.692	0.481
4	-0.005	0.034	0.068	1.558	1.324	1.076
5	-0.003	0.072	0.092	1.785	1.226	0.710

Anti-Masern-Antwort

HI-TITER		Woche nach der Impfung					
Kaninchen	0	2	4	5	6	8	
1	<1 ^b	<1	1.00	2.81	2.51	2.20	
2	<1	<1	<1	2.20	1.90	1.60	
3	<1	<1	1.30	2.81	2.51	2.38	
4	<1	1.30	1.60	3.11	3.11	2.51	
5	<1	1.00	1.30	2.68	2.38	1.90	

a) Optische Dichte in einem ELISA-Test mit Seren in einer Verdünnung von 1:1600.

b) Nachweisgrenze im HI-Test entspricht einem $\log_{10}$ -Titer von 1, d.h. einer Verdünnung von 1:10. Titer, ausgedrückt wie in der Legende von Tabelle 9.

Ergebnisse von serologischen Analysen mit Seren von mit ALVAC-MV (vCP82) geimpften Totenkopffaffen:
Einfluß eines früheren Kontakts mit Pockenvirus auf die Induktion einer gegen Masernvirus spezifischen Immunantwort

[0103] Neun Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*) wurden mit ALVAC-MV (vCP82) geimpft. Alle Affen waren gegenüber Masernvirus "naiv". Sieben der Affen hatten früher Kontakt mit Vacciniavirus und/oder Kanarienvirus gehabt. Die vorhergehende Immunisierung wird in Tabelle 12 gezeigt. Alle Affen wurden mit einer Dosis von $5,8 \log_{10}$ pfu subcutan geimpft. Vier der Tiere (#39, 42, 53 und 58) wurden fünfzehn Wochen nach der ersten Impfung mit einer äquivalenten Dosis wiedergeimpft. Anti-Masern-Antikörper wurde im HI-Test bestimmt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 12 gezeigt.

[0104] Nach der ersten Impfung zeigten zwei von neun Affen eine schwache Antwort auf die Impfung mit ALVAC-MV. Nach der zweiten Impfung zeigten alle vier wiedergeimpften Affen Serokonversion mit signifikanten Antikörpertitern in einem für die schützende Immunität erforderlichen Bereich. Die erreichten Titer waren gleich, egal ob die Affen früher Kontakt mit Vacciniavirus und ALVAC oder früher keinen Kontakt mit Pockenvirus gehabt hatten.

Tabelle 12

Impfung von Totenkopffäffchen mit ALVAC-MV (vCP82):
Immunantwort bei vorher bestehender ALVAC-Immunität

Affe #	frühere Immunität geg. Pockenviren	Anti-Masern Primär ^a	HI-Antwort Wiederimpfung ^b
36	VV, ALVAC	<1	N.B.
37	VV, ALVAC-RG	<1	N.B.
39	VV, ALVAC-RG, CP-FeLV	1	2.2.
40	VV, CP-FeLV	<1	N.B.
42	Keine	<1	2.2.
52	ALVAC	<1	N.B.
53	ALVAC-RG, ALVAC-RG	<1	1.6.
56	CP-FeLV	<1	N.B.
58	Keine	1	2.2.

VV: Vacciniavirus, Copenhagen-Stamm

ALVAC-RG: ALVAC-Rekombinante, die das Rabies-G-Gen exprimiert.

CP-FeLV-
Gen: Kanarienvpocken-Rekombinante, die das FeLV env-Gen
exprimiert.

NB: Nicht wiedergeimpft

a) Die Tiere erhielten 5,8 log₁₀ pfu sc.

b) Die Tiere 39, 42, 52 und 53 erhielten 15 Wochen nach der ersten Impfung eine Wiederholungsimpfung mit einer identischen Dosis.

Beispiel 15 – Attenuierter Vaccinia-Impfstamm NYVAC

[0105] Zur Entwicklung eines neuen Vaccinia-Impfstammes wurde der Copenhagen Vaccinia-Stamm von Vacciniavirus durch Deletion von sechs nichtessentiellen Regionen des Genoms, die bekannte oder denkbare Virulenzfaktoren codieren, modifiziert. Die aufeinanderfolgenden Deletionen werden nachstehend ausführlich beschrieben. Alle Bezeichnungen von Vaccinia-Restriktionsfragmenten, offenen Leserastern und Nucleotidpositionen beruhen auf der in Goebel et al. (1990 a, b) beschriebenen Terminologie.

[0106] Die Deletions-Loci wurden gentechnisch auch als Empfänger-Loci für die Insertion von fremden Genen hergestellt.

[0107] Die in NYVAC nacheinander deletierten Regionen werden nachstehend aufgezählt. Außerdem werden die Abkürzungen und die Bezeichnungen der offenen Leseraster für die deletierten Regionen (Goebel et al., 1990 a, b) und die jeweilige Bezeichnung der Vaccinia-Rekombinante (vP) angegeben, die alle Deletionen bis zur jeweils spezifizierten Deletion enthält:

- (1) Thymidinkinase-Gen (TK; J2R) vP410;
- (2) hämorrhagische Region (u; B13R + B14R) vP553;
- (3) A-Typ-Einschlußkörper-Region (ATI; A26L) vP618;

- (4) Hämagglutinin-Gen (HA; ASGR) vP723;
 (5) Wirtsbereich-Genregion (C7L – K1L) vP804; und
 (6) Ribonucleotid-Reductase, große Untereinheit, (l4L) vP866 (NYVAC).

DNA-Clonierung und -Synthese

[0108] Plasmide wurden konstruiert, abgesucht und nach Standardverfahren gezüchtet (Maniatis et al., 1986; Perkus et al., 1985; Piccini et al., 1987). Die Restriktionsendonucleasen wurden von GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, New England Biolabs, Beverly, MA, und Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, erhalten. Das Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase wurde von Boehringer Mannheim Biochemicals erhalten. Die BAL-31-Exonuclease und die Phagen T4-DNA-Ligase wurden von New England Biolabs erhalten. Die Reagenzien wurden verwendet, wie von den verschiedenen Lieferanten empfohlen.

[0109] Spezifische Oligodesoxyribonucleotide wurden auf einem Biosearch 8750 oder Applied Biosystems 380B DNA-Synthesizer, wie früher beschrieben (Perkus et al., 1989), hergestellt. Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Sequenase (Tabor et al., 1987), wie früher beschrieben (Guo et al., 1989), durchgeführt. Die DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Bestätigung der Sequenz (Engelke et al., 1988) wurde unter Verwendung von herkömmlich synthetisierten Oligonucleotid-Primern und dem GeneAmp-DNA-Amplification-Reagent-Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) in einem automatischen Perkin Elmer Cetus DNA Thermal-Cycler durchgeführt. Überschüssige DNA-Sequenzen wurden aus den Plasmiden durch Spaltung mit Restriktionsendonuclease deletiert, worauf eine eingeschränkte Spaltung mit BAL-31-Exonuclease und eine Mutagenese (Mandecki, 1986) unter Verwendung von synthetischen Oligonucleotiden folgte.

Zellen, Virus und Transfektion

[0110] Die Herkunft und die Züchtungsbedingungen des Copenhagen-Stamms von Vacciniavirus sind bereits früher beschrieben worden (Guo et al., 1989). Die Erzeugung von rekombinantem Virus durch Rekombination, die in situ-Hybridisierung an Nitrocellulosefiltern und das Absuchen auf β -Galactosidase-Aktivität ist schon früher beschrieben worden (Panicali et al., 1982; Perkus et al., 1989).

Konstruktion von Plasmid pSD460 zur Deletion des Thymidinkinase-Gens (J2R)

[0111] Bezugnehmend auf [Fig. 9](#) enthält Plasmid pSD406 Vaccinia-HindIII J (Pos. 83 359–88 377), cloniert in pUC8. pSD406 wurde mit HindIII und PvuII gespalten und das 1,7 kB-Fragment aus der linken Seite des HindIII J in das mit HindIII/SmaI gespaltene pUC8 cloniert, wodurch pSD447 erzeugt wurde. pSD447 enthält das gesamte Gen für J2R (pos. 83 855–84 385). Das Initiations-Codon ist innerhalb einer NlaIII-Stelle enthalten, und das Terminations-Codon ist innerhalb einer SspI-Stelle enthalten. Die Richtung der Transkription ist in [Fig. 9](#) durch einen Pfeil angegeben.

[0112] Zum Erhalt eines linken flankierenden Arms wurde ein 0,8 kB großes HindIII/EcoRI-Fragment aus pSD447 isoliert, sodann mit NlaIII gespalten und ein 0,5 kB großes HindIII/NlaIII-Fragment isoliert. Die aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotide MPSYN43/MPSYN44 (SEQ ID NR: 17/SEQ ID NR: 18)

		<u>SmaI</u>	
MPSYN43	5'	TAATTAAGCTACCCGGG	3'
MPSYN44	3'	GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA	5'
		<u>NlaIII</u> <u>EcoRI</u>	

wurden mit dem 0,5 kB großen HindIII/NlaIII-Fragment in das mit HindIII/EcoRI gespaltene Vektorplasmid pUC18 ligiert, wodurch Plasmid pSD449 erzeugt wurde.

[0113] Zum Erhalt eines Restriktionsfragments, das einen rechten flankierenden Arm von Vaccinia und pUC-Vektor-Sequenzen enthält, wurde pSD447 mit SspI (partiell) innerhalb der Vaccinia-Sequenzen und mit HindIII an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle gespalten und ein 2,9 kB großes Vektorfragment isoliert. Dieses Vektorfragment wurde mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN45/MPSYN46 (SEQ ID NR: 19/SEQ ID NR: 20)

HindIII SmaI
 MPSYN45 5' AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA
 MPSYN46 3' AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT

NotI SspI
 ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCCTAATTAATAAT 3' MPSYN45
 TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA 5' MPSYN46

ligiert, wodurch pSD459 erzeugt wurde.

[0114] Um den linken und den rechten flankierenden Arm in ein Plasmid zu kombinieren, wurde ein 0,5 kB großes HindIII/SmaI-Fragment aus pSD449 isoliert und mit dem mit HindIII/SmaI gespaltenen Vektorplasmid pSD459 ligiert, wodurch Plasmid pSD460 erzeugt wurde. pSD460 wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem parentalen Wildtyp-Vacciniavirus Copenhagen-Stamm VC-2 verwendet. Eine ³²P-markierte Sonde wurde durch Primer-Extension synthetisiert, wobei MPSYN45 (SEQ ID NR: 19) als Matrize und das komplementäre Oligonucleotid MPSYN47 mit 20 Nucleotiden (SEQ ID NR: 21) (5'-TTAGTTAATTAGGCGGC-CGC-3') als Primer verwendet wurde. Das rekombinante Virus vP410 wurde durch Plaque-Hybridisierung identifiziert.

Konstruktion von Plasmid pSD486 zur Deletion der hämorrhagischen Region (B13R + B14R)

[0115] Bezugnehmend auf [Fig. 10](#) enthält Plasmid pSD419 Vaccinia Sall G (Pos. 160 744–173 351), cloniert in pUC8. pSD422 enthält das rechts angrenzende Vaccinia-Sall-Fragment, Sall J (Pos. 173 351–182 746), cloniert in pUC8. Um ein Plasmid zu konstruieren, bei dem die hämorrhagische Region, u, B13R – B14R (Pos. 172 549–173 552), deletiert ist, wurde pSD419 als Quelle für den linken flankierenden Arm und pSD422 als Quelle für den rechten flankierenden Arm verwendet. Die Richtung der Transkription für die u-Region wird in [Fig. 10](#) durch einen Pfeil angegeben.

[0116] Zur Entfernung von unerwünschten Sequenzen aus pSD419 wurden Sequenzen links von der NcoI-Stelle (Pos. 172 253) durch Spaltung von pSD419 mit NcoI/SmaI entfernt, worauf die Überführung in glatte Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und die Ligierung folgten, wodurch Plasmid pSD476 erzeugt wurde. Ein rechter flankierender Arm von Vaccinia wurde durch Spaltung von pSD422 mit HpaI am Terminations-Codon von B14R und durch Spaltung mit NruI 0,3 kB rechts davon erhalten. Dieses 0,3 kB-Fragment wurde isoliert und mit einem 3,4 kB großen HincII-Vektorfragment, isoliert aus pSD476, ligiert, wodurch Plasmid pSD477 erzeugt wurde. Die Stelle der partiellen Deletion der Vaccinia-u-Region in pSD477 ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Die verbleibenden B13R-codierenden Sequenzen in pSD477 wurden durch Spaltung mit ClaI/HpaI entfernt und das resultierende Vektorfragment mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden SD22mer/SD20mer (SEQ ID NR: 22/SEQ ID NR: 23)

ClaI BamHI HpaI
 SD22mer 5' CGATTACTATGAAGGATCCGTT 3'
 SD20mer 3' TAATGATACTTCCTAGGCAA 5'

ligiert, wodurch pSD479 erzeugt wurde. pSD479 enthält ein Initiations-Codon (unterstrichen), gefolgt von einer BamHI-Stelle. Um die E. coli-β-Galactosidase in den B13-B14-(u)-Deletions-Locus unter die Kontrolle des u-Promotors zu stellen, wurde ein 3,2 kB großes BamHI-Fragment, enthaltend das β-Galactosidase-Gen (Shapira et al., 1983), in die BamHI-Stelle von pSD479 eingefügt, wodurch pSD479BG erzeugt wurde. pSD479BG wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit Vacciniavirus vP410 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP533 wurde in Gegenwart des chromogenen Substrats X-gal als blaues Plaque isoliert. In vP533 ist die B13R-B14R-Region deletiert und durch β-Galactosidase ersetzt.

[0117] Um die β-Galactosidase-Sequenzen aus vP533 zu entfernen, wurde Plasmid pSD486, ein Derivat von pSD477, verwendet, das eine Polylinker-Region, aber kein Initiations-Codon an der u-Deletions-Verknüpfungsstelle enthielt. Zuerst wurde das ClaI/HpaI-Vektorfragment aus dem vorstehend erwähnten pSD477 mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden SD42mer/SD40mer (SEQ ID NR: 24/SEQ ID NR: 25)

ClaI SacI XhoI HpaI
 SD42mer 5' CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT 3'
 SD40mer 3' TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCCCGAGCTCCCTAGGCAA 5'
BglII SmaI BamHI

ligiert, wodurch Plasmid pSD478 erzeugt wurde. Sodann wurde die EcoRI-Stelle an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle durch Spaltung von pSD478 mit EcoRI zerstört und anschließend mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase in glatte Enden überführt und ligiert, wodurch Plasmid pSD478E⁻ erzeugt wurde. pSD478E wurde mit BamHI und HpaI gespalten und mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden HEM5/HEM6 (SEQ ID NR: 26/SEQ ID NR: 27)

		<u>Bam</u> HI	<u>Eco</u> RI	<u>Hpa</u> I	
HEM5	5'	GATCCGAATTCTAGCT			3'
HEM6	3'	GCTTAAGATCGA			5'

ligiert, wodurch Plasmid pSD486 erzeugt wurde. pSD486 wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem rekombinanten Vacciniavirus vP533 verwendet, wodurch vP553 erzeugt wurde, das in Gegenwart von X-gal als klares Plaque isoliert wurde.

Konstruktion von Plasmid pMP494Δ zur Deletion der ATI-Region 26L

[0118] Bezugnehmend auf [Fig. 11](#) enthält pSD414 Sall B, cloniert in pUC8. Zur Entfernung von unerwünschten DNA-Sequenzen links von der A26L-Region wurde pSD414 mit XbaI innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 137 079) und mit HindIII an der pUV/Vaccinia-Verknüpfungsstelle gespalten, sodann mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase mit glatten Enden versehen und ligiert, wodurch Plasmid pSD483 erhalten wurde. Zur Entfernung unerwünschter Vaccinia-DNA-Sequenzen rechts von der A26L-Region wurde pSD483 mit EcoRI (Pos. 140 665 und an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle) gespalten und ligiert, wodurch Plasmid pSD484 erzeugt wurde. Zur Entfernung der A26L-codierenden Region wurde pSD484 mit NdeI (partiell) etwas stromaufwärts vom A26L ORF (Pos. 139 004) und mit HpaI (Pos. 137 889) etwas stromabwärts vom A26L ORF gespalten. Das 5,2 kB große Vektorfragment wurde isoliert und mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden ATI3/ATI4 (SEQ ID NR: 28/SEQ ID NR: 29)

		<u>Nde</u> I	
ATI3	5'	TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTTAATTAAAAGTATATTCAAAAAATAAGT	
ATI4	3'	ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA	

		<u>Bgl</u> II	<u>Eco</u> RI	<u>Hpa</u> I	
		TATATAAATAGATCTGAATTCGTT			3' ATI3
		ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA			5' ATI4

ligiert, wobei die Region stromaufwärts von A26L rekonstruiert und das A26L ORF durch eine kurze Polylinker-Region ersetzt wurde, die die Restriktionsstellen BglII, EcoRI und HpaI enthält, wie vorstehend angegeben. Das resultierende Plasmid wurde mit pSD485 bezeichnet. Da die BglII- und EcoRI-Stellen in der Polylinker-Region von pSD485 nicht einmalig sind, wurden unerwünschte BglII- und EcoRI-Stellen aus dem Plasmid pSD483 (vorstehend beschrieben) durch Spaltung mit BglII (Pos. 140 136) und mit EcoRI an der pUV/Vaccinia-Verknüpfungsstelle entfernt, worauf die Überführung in glatte Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und die Ligierung folgten. Das resultierende Plasmid wurde mit pSD489 bezeichnet. Das 1,8 kB große ClaI(Pos. 137 198)/EcoRV(Pos. 139 048)-Fragment aus pSD489, das das A26L ORF enthielt, wurde durch das entsprechende 0,7 kB große Polylinker-enhaltende ClaI/EcoRV-Fragment aus pSD485 ersetzt, wodurch pSD492 erzeugt wurde. Die BglII- und EcoRI-Stellen in der Polylinker-Region von pSD492 sind einmalig.

[0119] Eine 3,3 kB-BglII-Kassette, enthaltend das E. coli-β-Galactosidase-Gen (Shapira et al., 1983) unter der Kontrolle des Vaccinia-11 kDa-Promotors (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990), wurde in die BglII-Stelle von pSD492 eingefügt, wodurch pSD493KBG erhalten wurde. Das Plasmid pSD493KBG wurde zur Rekombination mit dem aufnehmenden Virus vP553 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP581, das die β-Galactosidase in der A26L-Deletions-Region enthält, wurde in Gegenwart von X-gal als blaues Plaque isoliert.

[0120] Zur Erzeugung eines Plasmids zur Entfernung der β-Galactosidase-Sequenzen aus dem rekombinanten Vacciniavirus vP581 wurde die Polylinker-Region von Plasmid pSD492 durch Mutagenese (Mandecki, 1986) deletiert, wobei das synthetische Oligonucleotid MPSYN177 (SEQ ID NR: 30) (5'-AAAATGGGCGTG-GATTGTTAACTTTATATA-ACTTATTTTTTTGAATATAC-3') verwendet wurde. Im resultierenden Plasmid pMP494Δ ist die Vaccinia-DNA, einschließlich die Positionen [137 889–138 937], umfassend das gesamte A26L ORF, deletiert. Die Rekombination zwischen dem pMP494Δ und der β-Galactosidase-enhaltenden Vaccinia-Rekombinante vP581 führte zur Vaccinia-Deletions-Mutante vP618, die in Gegenwart von X-gal als klares Plaque isoliert wurde.

Konstruktion von Plasmid pSD467 zur Deletion des Hämagglutinin-Gens (A56R)

[0121] Bezugnehmend auf [Fig. 12](#) beinhaltet das Vaccinia Sall G-Restriktionsfragment (Pos. 160 744–173 351) die HindIII A/B-Verknüpfungsstelle (Pos. 162 539). pSD419 enthält Vaccinia-Sall G, cloniert in pUC8. Die Richtung der Transkription für das Hämagglutinin(HA)-Gen ist in [Fig. 12](#) durch einen Pfeil angegeben. Die aus HindIII B hergeleiteten Vaccinia-Sequenzen wurden durch Spaltung von pSD419 mit HindIII innerhalb der Vaccinia-Sequenzen und an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle und durch anschließende Ligierung entfernt. Das resultierende Plasmid pSD456 enthält das HA-Gen, A56R, das von 0,4 kB großen Vaccinia-Sequenzen links und 0,4 kB großen Vaccinia-Sequenzen rechts flankiert wird. Die A56R-codierenden Sequenzen wurden entfernt, indem pSD456 mit RsaI (partiell; 161 090) stromaufwärts der A56R-codierenden Sequenzen und mit EagI (Pos. 162 054) nahe dem Ende des Gens gespalten wurde. Das 3,6 kB große RsaI/EagI-Vektorfragment aus pSD456 wurde isoliert und mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN59 (SEQ ID NR: 31), MPSYN62 (SEQ ID NR: 32), MPSYN60 (SEQ ID NR: 33) und MPSYN61 (SEQ ID NR: 34)

RsaI

MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGA-
MPSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTTCATAAACCTTTCAAATATCCATCAACTATCT
5'

MPSYN59 -ACAAAATACATAATT

BglII

MPSYN60 5' TGTA AAAAATAAATCACTTTTTATACTAAGATCT-
MPSYN61 3' TGT TTTTATGTATTA AAAACATTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTAGA-

SmaI PstI EagI

MPSYN60 -CCCGGGCTGCAGC 3'
MPSYN61 -GGGCCCCGACGTCGCCGG 5'

ligiert, wobei die DNA-Sequenzen stromaufwärts vom A56R ORF rekonstruiert und das A56R ORF durch eine Polylinker-Region, wie vorstehend erwähnt, ersetzt wird. Das resultierende Plasmid ist pSD466. Die Vaccinia-Deletion in pSD466 schließt die Positionen (161 185–162 053) ein. Die Stelle der Deletion in pSD466 ist in [Fig. 12](#) mit einem Dreieck gekennzeichnet.

[0122] Eine 3,2 kB große BalII/BamHI(partiell)-Kassette, enthaltend das E. coli-β-Galactosidase-Gen (Shapiro et al., 1983) unter der Kontrolle des Vaccinia-11 kDa-Promotors (Bertholet et al., 1985; Guo et al., 1989), wurde in die BalII-Stelle von pSD466 eingefügt, wodurch pSD4GGKBG erzeugt wurde. Das Plasmid pSD466KBG wurde zur Rekombination mit dem aufnehmenden Virus vP618 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP708, das die β-Galactosidase in der A56R-Deletion enthält, wurde in Gegenwart von X-gal als blaues Plaque isoliert.

[0123] Die β-Galactosidase-Sequenzen wurden aus vP708 unter Verwendung des Donorplasmids pSD467 deletiert. pSD467 ist mit pSD466 identisch, mit der Ausnahme, daß die EcoRI, SmaI und BamHI-Stellen aus der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle entfernt worden waren, indem pSD466 mit EcoRI/BamHI gespalten und anschließend mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase mit glatten Enden versehen und ligiert wurde. Die Rekombination zwischen vP708 und pSD467 ergab die rekombinante Vaccinia-Deletions-Mutante vP723, die in Gegenwart von X-gal als klares Plaque isoliert wurde.

Konstruktion von Plasmid pMPCSK1Δ zur Deletion der offenen Leseraster [C7L – K1L]

[0124] Bezugnehmend auf [Fig. 13](#) wurden die nachstehenden Vaccinia-Clone zur Konstruktion von pMPCSK1Δ verwendet. pSD420 ist Sall H, cloniert in pUC8. pSD435 ist KpnI F, cloniert in pUC18. pSD435 wurde mit SphI gespalten und wiederligiert, wodurch pSD451 erzeugt wurde. In pSD451 sind die DNA-Sequenzen links von der SphI-Stelle (Pos. 27 416) in HindIII M entfernt (Perkus et al., 1990). pSD409 ist HindIII M, cloniert in pUC8.

[0125] Zur Bereitstellung eines Substrats zur Deletion der [C7L – K1L]-Gengruppe aus Vaccinia wurde die E. coli-β-Galactosidase zuerst in den Vaccinia-M2L-Deletions-Locus (Guo et al., 1990) folgendermaßen eingefügt. Zur Entfernung der BalII-Stelle in pSD409 wurde das Plasmid mit BalII in den Vaccinia-Sequenzen (Pos. 28 212) und mit BamHI an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle gespalten, sodann ligiert, wodurch Plasmid

pMP409B erzeugt wurde. pMP4098 wurde an der einzigen SphI-Stelle (Pos. 27 416) gespalten. Die M2L-codierenden Sequenzen wurden durch Mutagenese (Guo et al., 1990; Mandecki, 1986) entfernt, wobei das synthetische Oligonucleotid

BglII

MPSYN82 (SEQ ID NO:35) 5'
TTTCTGTATATTTGCACCAATTAGATCTTACTCAAAA
TATGTAACAATA 3'

verwendet wurde. Das resultierende Plasmid pMP409D enthält eine einzige BalII-Stelle, eingefügt im M2L-Deletions-Locus, wie vorstehend angegeben. Eine 3,2 kB große BamHI(partiell)/BalII-Kassette, enthaltend das E. coli-β-Galactosidase-Gen (Shapira et al., 1983) unter der Kontrolle des 11 kDa-Promotors (Bertholet et al., 1985), wurde in das mit BalII gespaltene pMP409D eingefügt. Das resultierende Plasmid pMP409DBG (Guo et al., 1990) wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem aufnehmenden Vacciniavirus vP723 eingesetzt. Das rekombinante Vacciniavirus vP784, das β-Galactosidase eingefügt in den M2L-Deletions-Locus enthält, wurde in Gegenwart von X-gal als blaues Plaque isoliert.

[0126] Ein Plasmid, bei dem die Vacciniagene [C7L – K1L] deletiert sind, wurde in pUC8 zusammengebaut, das mit SmaI und HindIII gespalten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase mit glatten Enden versehen worden war. Der linke flankierende Arm, der aus Vaccinia-HindIII C-Sequenzen besteht, wurde durch Spaltung von pSD420 mit XbaI (Pos. 18 628) und anschließendes Versehen mit glatten Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Spaltung mit BalII (Pos. 19 706) erhalten. Der rechte flankierende Arm, der aus Vaccinia-HindIII K-Sequenzen besteht, wurde durch Spaltung von pSD451 mit BalII (Pos. 29 062) und EcoRV (Pos. 29 778) erhalten. Im resultierenden Plasmid pMP581CK sind die Vaccinia-Sequenzen zwischen der BglII-Stelle (Pos. 19 706) in HindIII C und der BglII-Stelle (Pos. 29 062) in HindIII K deletiert. Die Deletionsstelle der Vaccinia-Sequenzen in Plasmid pMP581CK ist in [Fig. 13](#) mit einem Dreieck gekennzeichnet.

[0127] Zur Entfernung von überflüssiger DNA an der Vaccinia-Deletions-Verknüpfungsstelle wurde Plasmid pMP581CK an den NcoI-Stellen innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 18 811; 19 655) gespalten, mit Bal-31-Exonuclease behandelt und einer Mutagenese (Mandecki, 1986) unterworfen, wobei das synthetische Oligonucleotid MPSYN233 (SEQ ID NR: 36) 5'- TGTCATTTAACTA TACTCATATTAATAAAAATAATATT-TATT-3' verwendet wurde. Im resultierenden Plasmid pMPCSK1Δ sind die Vaccinia-Sequenzen in den Positionen 18 805–29 108 deletiert, die 12 offene Leseraster [C7L – K1L] von Vaccinia umfassen. Die Rekombination zwischen pMPCSK1Δ und der β-Galactosidase-enthaltenden Vaccinia-Rekombinante vP784 führte zur Vaccinia-Deletions-Mutante vP804, die in Gegenwart von X-gal als klares Plaque isoliert wurde.

Konstruktion von Plasmid pSD548 zur Deletion der großen Untereinheit der Ribonuclease-Reductase (I4L)

[0128] Bezugnehmend auf [Fig. 14](#) enthält Plasmid pSD405 Vaccinia-HindIII I (Pos. 63 875–70 367), cloniert in pUC8. pSD405 wurde mit EcoRV innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 67 933) und mit SmaI an der pUC/Vaccinia-Verknüpfungsstelle gespalten und ligiert, wodurch Plasmid pSD518 erhalten wurde. pSD518 wurde als Quelle aller Vaccinia-Restriktionsfragmente verwendet, die bei der Konstruktion von pSD548 eingesetzt wurden.

[0129] Das Vaccinia-I4L-Gen erstreckt sich von Position 67 371–65 059. Die Richtung der Transkription von I4L ist in [Fig. 4](#) durch einen Pfeil angegeben. Zum Erhalt eines Vektorplasmidfragments, in dem ein Teil der I4L-codierenden Sequenzen deletiert ist, wurde pSD518 mit BamHI (Pos. 65 381) und HpaI (Pos. 67 001) gespalten und unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase mit glatten Enden versehen. Dieses 4,8 kB große Vektorfragment wurde mit einer 3,2 kB großen SmaI-Kassette ligiert, die das E. coli-β-Galactosidase-Gen (Shapira et al., 1983) unter der Kontrolle des Vaccinia 11 kDa-Promotors (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990) enthielt, wodurch Plasmid pSD524KBG erzeugt wurde. pSD524KBG wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit Vacciniavirus vP804 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP855, das die β-Galactosidase in einer partiellen Deletion des I4L-Gens enthielt, wurde in Gegenwart von X-gal als blaues Plaque isoliert.

[0130] Um β-Galactosidase und den Rest von I4L ORF aus vP855 zu deletieren, wurde das Deletionsplasmid pSD548 konstruiert. Die linken und die rechten flankierenden Arme von Vaccinia wurden getrennt voneinander in pUC8 zusammengesetzt, wie nachstehend ausführlich beschrieben und in [Fig. 14](#) schematisch dargestellt.

[0131] Zur Konstruktion eines Vektorplasmids zur Aufnahme des linken flankierenden Arms von Vaccinia wur-

de pUC8 mit BamHI/EcoRI gespalten und mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden 518A1/518A2 (SEQ ID NR: 37/SEQ ID NR: 38)

```

      BamHI   RsaI
518A1  5'  GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT
518A2  3'      GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA

      BglII   EcoRI
      TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG      3'   518A1
      AACTCTTATTTTCTAGAATCCTTAA  5'   518A2

```

ligiert, wodurch Plasmid pSD531 erhalten wurde. pSD531 wurde mit RsaI (partiell) und BamHI gespalten und ein 2,7 kB großes Vektorfragment isoliert. pSD518 wurde mit BglII (Pos. 64 459)/RsaI (Pos. 64 994) gespalten und ein 0,5 kB-Fragment isoliert. Die zwei Fragmente wurden aneinander ligiert, wodurch pSD537 erzeugt wurde, das den kompletten flankierenden Arm von Vaccinia links der I4L-codierenden Sequenzen enthält.

[0132] Zur Konstruktion eines Vektorplasmids zur Aufnahme des rechten flankierenden Arms von Vaccinia wurde pUC8 mit BamHI/EcoRI gespalten und mit den aneinandergelagerten synthetischen Oligonucleotiden 518B1/518B2 (SEQ ID NR: 39/SEQ ID NR: 40)

```

      BamHI BglII SmaI
518B1  5'  GATCCAGATCTCCCGGGAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAGGGATT
518B2  3'  GTCTAGAGGGCCCTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATCCCTAA

      RsaI   EcoRI
      GACGTATGTAGCGTACTAGG      3'   518B1
      CTCATACTACGCATGATCCTTAA  5'   518B2

```

ligiert, wodurch Plasmid pSD532 erhalten wurde. pSD532 wurde mit RsaI(partiell)/EcoRI gespalten und ein 2,7 kB großes Vektorfragment isoliert. pSD518 wurde mit RsaI innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 67 436) und mit EcoRI an der Vaccinia/pUC-Verknüpfungsstelle gespalten und ein 0,6 kB-Fragment isoliert. Die zwei Fragmente wurden aneinander ligiert, wodurch pSD538 erzeugt wurde, das den kompletten flankierenden Arm von Vaccinia rechts der I4L-codierenden Sequenzen enthält.

[0133] Der rechte flankierende Arm von Vaccinia wurde als ein 0,6 kB großes EcoRI/BglII-Fragment aus pSD538 isoliert und in das mit EcoRI/BglII gespalte Vektorplasmid pSD537 ligiert. In dem resultierenden Plasmid pSD539 ist das I4L ORF (Pos. 65 047–67 386) durch eine Polylinker-Region ersetzt, die von 0,6 kB Vaccinia-DNA links und 0,6 kB Vaccinia-DNA rechts flankiert ist, alles in einem pUC-Hintergrund. Die Deletionsstelle innerhalb der Vaccinia-Sequenzen ist in [Fig. 14](#) mit einem Dreieck gekennzeichnet. Um eine mögliche Rekombination von β -Galactosidase-Sequenzen in dem von pUC abgeleiteten Teil von pSD539 mit den β -Galactosidase-Sequenzen im rekombinanten Vacciniavirus vP855 zu verhindern, wurde die Vaccinia-I4L-Deletionskassette von pSD539 in pRC11 überführt, einen pUC-Abkömmling, aus dem alle β -Galactosidase-Sequenzen entfernt und durch eine Polylinker-Region ersetzt worden waren (Colinas et al., 1990). pSD539 wurde mit EcoRI/PstI gespalten und das 1,2 kB-Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in das mit EcoRI/PstI gespalte pRC11 (2,35 kB) ligiert, wodurch pSD548 erzeugt wurde. Die Rekombination zwischen pSD548 und der β -Galactosidase-enthaltenden Vaccinia-Rekombinante vP855 führte zur Vaccinia-Deletionsmutante vP866, die in Gegenwart von X-gal als klares Plaque isoliert wurde.

[0134] DNA aus dem rekombinanten Vacciniavirus vP866 wurde analysiert, indem Restriktionsspaltungen und anschließend Elektrophorese auf einem Agarosegel durchgeführt wurden. Die Restriktionsmuster waren wie erwartet. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) (Engelke et al., 1988) unter Verwendung von vP866 als Matrize und von Primern, die die sechs vorstehend beschriebenen Deletions-Loci flankieren, erzeugten DNA-Fragmente mit den erwarteten Größen. Die Sequenzanalyse der durch die PCR erzeugten Fragmente in den Bereichen der Deletions-Verknüpfungsstellen bestätigte, daß die Verknüpfungsstellen wie erwartet aussahen. Das rekombinante Vacciniavirus vP866, das die sechs gentechnisch hergestellten Deletionen, wie vorstehend beschrieben, enthält, wurde mit Vaccinia-Impfstamm "NYVAC" bezeichnet.

Beispiel 16 – Konstruktion der NYVAC-MV-Rekombinante die die Masern-Fusions- und -Hämagglutinin-Glykoproteine exprimiert

[0135] cDNA-Kopien der Sequenzen, die die HA- und F-Proteine des Masernvirus MV (Edmonston-Stamm) codieren, wurden in NYVAC eingefügt, wodurch eine mit NYVAC-MV (vP913) bezeichnete Doppelrekombinante erzeugt wurde. Die Rekombinante exprimiert authentisch die beiden Masern-Glykoproteine auf der Oberfläche von infizierten Zellen. Die Immunpräzipitations-Analyse zeigte die korrekte Prozessierung der beiden F- und HA-Glykoproteine. Außerdem wurde gezeigt, daß die Rekombinante die Erzeugung von Synzytien induziert.

Zellen und Viren

[0136] Das aufnehmende Virus, das zur Herstellung von NYVAC-MV verwendet wurde, war der modifizierte Copenhagen-Stamm von Vacciniavirus, der mit NYVAC bezeichnet wurde. Alle Viren wurden gezüchtet und auf einschichtigem VERO-Zellrasen titriert.

Plasmid-Konstruktion

[0137] Bezugnehmend auf [Fig. 15](#) und auf Taylor et al. (1991) enthält Plasmid pSPM2LHA das gesamte Masern-HA-Gen, gebunden in einer richtigen ATG-zu-ATG-Konfiguration an den Vacciniavirus-H6-Promotor, der früher beschrieben worden ist (Taylor et al., 1988 a, b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989). Aus pSPM2LHA wurde ein 1,8 kbp großes EcoRV/SmaI-Fragment isoliert, das die am weitesten 3' gelegenen 24 Bp des H6-Promotors enthält, die in einer richtigen ATG:ATG-Konfiguration an das HA-Gen, dem die am weitesten 3' gelegenen 26 Bp fehlen, fusioniert sind. Dieses Fragment wurde zum Ersetzen des 1,8 kbp großen EcoRI/SmaI-Fragments von pSPMHA11 (Taylor et al., 1991) verwendet, wodurch pRW803 erhalten wurde. Plasmid pRW803 enthält den gesamten H6-Promotor, richtig gebunden an das gesamte Masern-HA-Gen.

[0138] Plasmid pSD513VCVQ wurde aus Plasmid pSD460 durch Zusatz von Polylinker-Sequenzen hergeleitet. Plasmid pSD460 wurde hergeleitet, um die Deletion des Thymidinkinase-Gens aus Vacciniavirus zu ermöglichen ([Fig. 9](#)).

[0139] Zur Insertion des Masernvirus-F-Gens in das HA-Insertionsplasmid wurde pSPHMF7 bearbeitet. Das Plasmid pSPHMF7 (Taylor et al., 1991) enthält das Masern-F-Gen 3' neben dem früher beschriebenen Vacciniavirus-H6-Promotor. Um eine richtige ATG-zu-ATG-Konfiguration zu erhalten und intervenierende Sequenzen zwischen dem 3'-Ende des Promotors und dem ATG des Masern-F-Gens zu entfernen, wurde eine gezielte Mutagenese mittels Oligonucleotiden unter Verwendung von Oligonucleotid SPMAD (SEQ ID NR: 41)
SPMAD: 5'-TATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3'
durchgeführt. Das resultierende Plasmid wurde mit pSPMF75M20 bezeichnet.

[0140] Das Plasmid pSPMF75M20, das das Masern-F-Gen nun gebunden in einer richtigen ATG-zu-ATG-Konfiguration an den H6-Promotor enthält, wurde mit NruI und EagI gespalten. Das resultierende, mit glatten Enden versehene 1,7 kbp-Fragment, das die am weitesten 3' gelegenen 27 Bp des H6-Promotors und das gesamte Fusionsgen enthält, wurde isoliert und in ein intermediäres Plasmid, pRW823, eingefügt, das mit NruI und XbaI gespalten und mit glatten Enden versehen worden war. Das resultierende Plasmid pRW841 enthält den H6-Promotor, gebunden an das Masern-F-Gen, im Plasmidvektor pIBI25 (IBI, New Haven, CT). Die H6/Masern-F-Kassette wurde aus pRW841 durch Spaltung mit SmaI herausgeschnitten und das resultierende 1,8 kbp-Fragment in pRW843 (enthaltend das Masern-HA-Gen) eingefügt. Das Plasmid pRW843 wurde zuerst mit NotI gespalten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2 mM dNTPs mit glatten Enden versehen. Das resultierende Plasmid pRW857 enthält somit die Masernvirus-F- und -HA-Gene, die in einer Schwanz-an-Schwanz-Konfiguration verbunden sind. Beide Gene sind mit dem Vacciniavirus-H6-Promotor verbunden.

Entwicklung von NYVAC-MV

[0141] Das Plasmid pRW857 wurde in die mit NYVAC (vP866) infizierten VERO-Zellen transfiziert, wobei das früher beschriebene Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren (Panicali et al., 1982; Piccini et al., 1987) eingesetzt wurde. Positive Plaques wurden mittels in situ-Plaque-Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten MV-F- und -HA-Sonden herausgesucht und sechs aufeinanderfolgenden Zyklen einer Plaque-Reinigung unterworfen, bis eine reine Population erhalten wurde. Ein repräsentatives Plaque wurde sodann ampli-

fiziert und die resultierende Rekombinante mit NYVAC-MV (vP913) bezeichnet.

Immunfluoreszenz

[0142] Die indirekte Immunfluoreszenz wurde wie früher beschrieben durchgeführt (Taylor et al., 1990). Die verwendeten monospezifischen Reagenzien wurden aus Seren hergestellt, indem Kaninchen mit Kanarienvpocken-Rekombinanten geimpft wurden, die entweder die Masern-F- oder -HA-Gene exprimieren.

Immunuräzipitation

[0143] Die Immunpräzipitations-Reaktionen wurden wie früher beschrieben durchgeführt (Taylor et al., 1990), wobei ein anti-Masern-Serum vom Meerschweinchen verwendet wurde (Whittaker M. A. Bioproducts, Walkersville, MD).

Zellfusionsexperimente

[0144] Einschichtige VERO-Zellrasen in 60 mm Schalen wurden mit einer Menge von 1 pfu pro Zelle von parentalen oder rekombinanten Viren beimpft. Nach einer einstündigen Absorption bei 37°C wurde das Impfmateriel entfernt, das Überschichtungsmedium ersetzt und die Schalen über Nacht bei 37°C inkubiert. Zwanzig Stunden nach der Infektion wurden die Schalen untersucht.

[0145] Um festzustellen, ob die Expressionsprodukte sowohl der Masernvirus-F- als auch -HA-Gene auf der Oberfläche der infizierten Zelle präsentiert wurden, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt, wobei monospezifische Seren eingesetzt wurden, die in Kaninchen gegen die Kanarienvpocken-Rekombinanten erzeugt worden waren, die entweder die Masern-F- oder die -HA-Gene exprimierten. Die Ergebnisse zeigten, daß auf der Oberfläche der infizierten Zellen sowohl die F- als auch die HA-Genprodukte exprimiert wurden, was durch starke Oberflächen-Fluoreszenz mit den beiden monospezifischen Seren demonstriert wurde. Mit keinem der Seren zeigte sich eine Hintergrundfärbung auf Zellen, die mit dem parentalen NYVAC-Stamm beimpft worden waren, außerdem lag keine kreuzreaktive Färbung vor, wenn monospezifische Seren gegen Vaccinia-Einzelrekombinanten getestet wurden, die entweder das HA- oder das F-Gen exprimierten.

[0146] Um zu zeigen, daß die von NYVAC-MV exprimierten Proteine mit Masernvirus-spezifischen Seren immunreaktiv waren und in der infizierten Zelle authentisch prozessiert wurden, wurde eine Immunpräzipitations-Analyse durchgeführt. Einschichtige VERO-Zellrasen wurden mit einer Menge von 10 pfu pro Zelle von parentalen oder rekombinanten Viren in Gegenwart von ³⁵S-Methionin beimpft. Die Immunpräzipitations-Analyse machte ein HA-Glykoprotein mit etwa 76 kDa und die gespaltenen Fusionsprodukte F₁ und F₂ mit Molekulargewichten von 44 kDa bzw. 23 kDa deutlich. Keine Masern-spezifischen Produkte wurden in nichtinfizierten VERO-Zellen oder in VERO-Zellen, die mit dem parentalen NAVAC-Virus infiziert waren, nachgewiesen.

[0147] Ein Merkmal der Zellpathologie von MV ist die Erzeugung von Synzytien, die entstehen, indem infizierte Zellen mit umgebenden infizierten oder nichtinfizierten Zellen fusionieren und anschließend die Zellkerne zum Mittelpunkt des Synzytiums wandern (Norby et al., 1982). Es wurde gezeigt, daß dies ein wichtiges Verfahren der viralen Vermehrung darstellt, das bei Paramyxoviren in Gegenwart von Hämagglutinin-spezifischem Virus-neutralisierendem Antikörper stattfinden kann (Merz et al., 1980). Um festzustellen, ob die in Vacciniavirus exprimierten MV-Proteine funktionell aktiv waren, wurden einschichtige VERO-Zellrasen mit NYVAC und NYVAC-MV beimpft und auf cytopathische Effekte untersucht. Eine starke zellfusionierende Aktivität zeigte sich in den mit NYVAC-MV infizierten VERO-Zellen etwa 18 Stunden nach der Infektion. Keine zellfusionierende Aktivität zeigte sich in den Zellen, die mit parentalem NYVAC infiziert waren.

Ergebnisse der serologischen Analyse von Seren von Kaninchen, die mit NYVAC-MV (vP913) geimpft worden waren

[0148] In dieser Studie wurden zwei Kaninchen mit 1×10^8 pfu von NYVAC-MV (vP913) subcutan geimpft. Am Tag 28 wurden die Tiere mit einer äquivalenten Dosis wiedergeimpft. Serielle Blutproben wurden unter Verwendung des Plaque-Reduktionsverfahrens auf MV-neutralisierende Aktivität analysiert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 13 dargestellt. Die Ergebnisse legen dar, daß keines der Kaninchen auf die erste Impfung mit NYVAC-MV eine Antwort zeigte. Die stark ansteigende Antwort nach der zweiten Impfung demonstriert jedoch, daß die Tiere "geimpft" waren. Beide Tiere erreichten neutralisierende Antikörpertiter im schützenden Bereich.

[0149] Die in Beispiel 14 angegebene in vivo-Analyse der Immunogenität von ALVAC-MV (vCP82) zeigt, daß die Rekombinante bei Impfung von verschiedenen Arten befähigt ist, eine serologische Antwort zu induzieren, die mit serologischen Standardtests meßbar ist. Die erreichten Titer liegen in dem Bereich, der für den Schutz vor der Krankheit erforderlich ist. Genauso wird bei Kaninchen durch die Impfung mit NYVAC-MV (vP913) ein Spiegel von Masernvirus-neutralisierendem Antikörper induziert, der als Schutz wirkt.

Tabelle 13 Titer der neutralisierenden Antikörper gegen Masern ($\log_{10}$) in Seren von Kaninchen, die mit NYVAC-MV (vP913) geimpft worden waren

Tier		Titer in Wochen nach der Impfung					
		W0	W2	W4 ^c	W5	W6	W7
Kaninchen ^a	A116	<1	<1	<1	2,8 ^b	2,2	2,2
	A117	<1	<1	<1	1,9	1,9	1,9

a) Kaninchen erhielten 8,0 $\log_{10}$ pfu von NYVAC-MV (vP913) sc.

b) Titer, exprimiert als $\log_{10}$ des reziproken Werts der letzten Verdünnung, die eine 50% Reduktion der Plaquezahl im Vergleich zum Serum vor der Impfung zeigt.

c) Tiere wurden am Tag 26 wiedergeimpft.

Referenzen

- Adams, J.M., and D.T. Imagawa, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 96, 240–244 (1957).
- Albrecht, P., K. Herrman, and G.R. Burns, J. Virol. Methods 3, 251–260 (1981).
- Alkhatib, G., and D. Briedis, Virology 150, 479–490 (1986).
- Alkhatib, G., C. Richardson, and S-H. Shen, Virology 175, 262–270 (1990).
- Appel, M.J.G., and O.R. Jones, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 571–574 (1967).
- Appel, M.J.G., and D.S. Robson, Am. J. Vet. Res. 34, 1459–1463 (1973).
- Avery, R.J., and J. Niven, Infect. Immun. 26, 795–801 (1979).
- Baker, J.A., B.E. Sheffy, D.S. Robson, J. Gilmartin, Cornell Vet (USA) 56, 588–594 (1966).
- Bertholet, C., R. Drillien, and R. Wittek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096–2100 (1985).
- Bestetti, G., R. Fatzer, and R. Frankhauser, Acta Neuropathol. 43, 69–75 (1978).
- Black, F.L., L.L. Berman, M. Libel, C.A. Reichelt, F. de P. Pinheiro, A.T. da Rosa, F. Figuera, and E.S. Gonzales, Bull. W.H.O. 62, 315–319 (1984).
- Bush, M., R.J. Montali, D. Brownstein, A.E. James, Jr., and M.J.G. Appel, J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 959–960 (1976).
- Carpenter, J.W., M.J.G. Appel, R.C. Erickson, and M.N. Novilla, J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 961–964 (1976).
- Choppin, P.W., C.D. Richardson, D.C. Merz, W.W. Hall, and A. Scheid, J. Infect. Dis. 143, 352–363 (1981).
- Clewell, D.B., J. Bacteriol. 110, 667–676 (1972).
- Clewell, D.B., and D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159–1166 (1969).
- Colinas, R.J., R.C. Condit, and E. Paoletti, Virus Research 18, 49–70 (1990).
- Delay, P.D., S.S. Stone, D.T. Karzon, S. Katz, and J. Enders, Am. J. Vet. Res. 26, 1359–1373 (1965).
- Diallo, A., Vet. Micro. 23, 155–163 (1990).
- Dowling, P.C., B.M. Blumberg, J. Menonna, J.E. Adamus, P. Cook, J.C. Crowley, D. Kolakofsky, and S.D. Cook, J. Gen. Virol. 67, 1987–1992 (1986).
- Drillien, R., D. Spehner, A. Kirn, P. Giraudon, R. Buckland, F. Wild, and J.P. Lecocq, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1252–1256 (1988).
- Engelke, D.R., P.A. Hoener, and F.S. Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 544–548 (1988).
- Fenner, F., P.A. Bachmann, E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, M.J. Studdert, and D.O. White, In Veterinary Virology, ed. F. Fenner, (Academic Press, Inc., New York) pp. 485–503 (1987).
- Gillespie, J.H., and D.T. Karzon, Proc. Soc. Exp. Biol Med. 105, 547–551 (1960).
- Giraudon, P., Ch. Gerald, and T.F. Wild, Intervirology 21, 110–120 (1984).
- Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, Virology 179, 247–266 (1990a).
- Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, Virology 179, 517–563 (1990b).

28. Graves, M.C., S.M. Silver, and P.W. Choppin, *Virology* 86, 254–263 (1978).
29. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, *J. Virol.* 63, 4189–4198 (1989).
30. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, J. Taylor, E. Norton, G. Allen, B. Languet, P. Desmettre, and E. Paoletti, *J. Virol.* 64, 2399–2406 (1990).
31. Hall, W.W., R.A. Lamb, and P.W. Choppin, *Virology* 100, 433–449 (1980).
32. Hartley, W.J., *Vet. Path.* 11, 301–312 (1974).
33. Imagawa, D.T., P. Goret, and J.M. Adams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 1119–1123 (1960).
34. Karton, D.T., *Pediatrics* 16, 809–818 (1955).
35. Karzon, D.T., *Annals of the N.Y. Academy of Sci.* 101, 527–539 (1962).
36. Kazacos, K.R., H.L. Thacker, H.L. Shivaprasad, and P.P. Burger, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1166–1169 (1981).
37. Kingsbury, D.W., M.A. Bratt, P.W. Choppin, R.P. Hanson, T. Hosaka, V. ter Meulen, E. Norrby, W. Plowright, R. Rott, and W.H. Wunner, *Intervirology* 10, 137–152 (1978).
38. Kunkel, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488–492 (1985).
39. Lennon, J.L., and F.L. Black, *J. Ped.* 108, 671–676 (1986).
40. Mandecki, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7177–7181 (1982).
41. Mandecki, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7177–7181 (1986).
42. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1982).
43. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1986).
44. Merz, D.C., A. Schied, and P. Choppin, *J. Exp. Med.* 151, 275–288 (1980).
45. Moura, R.A., and J. Warren, *J. Bact.* 82, 702–705 (1961).
46. Norrby, E., and Y. Gollmar, *Infect. Immun.* 11, 231–239 (1975).
47. Norrby, E., G. Enders-Ruckle, and V. ter Meulen, *J. Infect. Dis.* 132, 262–269 (1975).
48. Norrby, E., S.N. Chen, T. Togashi, H. Shesberadaran, and K.P. Johnson, *Archives of Virology* 71, 1–11 (1982).
49. Norrby, E., and M.N. Oxman, In *Fields Virology* 2nd Ed., B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. (Raven Press, NY) pp. 1013–1044 (1990).
50. Novick, S.L. and D. Hoekstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7433–7437 (1988).
51. Orvell, C., and E. Norrby, *J. Gen. Virol.* 50, 231–245 (1980).
52. Panicali, D., and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927–4931 (1982).
53. Paterson, R.G., and R.A. Lamb, *Cell* 48, 441–452 (1987).
54. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas, and E. Paoletti, *Science* 229, 981–984 (1985).
55. Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, *J. Virol.* 63, 3829–3836 (1989).
56. Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P. Johnson, K. Limbach, E.K. Norton, and E. Paoletti, *Virology* 179, 276–286 (1990).
57. Phillips, T.R., J.L. Jensen, M.J. Rubino, W.C. Yang, and R.D. Schultz, *Can. J. Vet. Res.* 53, 154–160 (1989).
58. Piceini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, In *Methods in Enzymology*, Vol. 153, eds. Wu, R., and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545–563 (1987).
59. Preblud, S.R., and S.L. Katz, In *Vaccines*, eds. S.A. Plotkin and E.A. Mortimer, (W.B. Saunders Co.) pp. 182–222 (1988).
60. Richardson, C.D., A. Berkovich, S. Rozenblatt, and W. Bellini, *J. Virol.* 54, 186–193 (1985).
61. Richardson, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima, and R. Lazzarini, *Virology* 155, 508–523 (1986).
62. Roberts, J.A., *J. Immunol.* 94, 622–628 (1965).
63. Rosel, J.L., P.L. Earl, J.P. Weir, and B. Moss, *J. Virol.* 60, 436–449 (1986).
64. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 (1977).
65. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, and M.J. Casadaban, *Gene* 25, 71–82 (1983).
66. Spehner, D., R. Drillien, and J.P. Lecocq, *J. Virol.* 64, 527–533 (1990).
67. Stephenson, J.R. and V. ter Meulen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 6601–6605 (1979).
68. Tabor, S., and C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767–4771 (1987).
69. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R.G. Webster, and E. Paoletti, *Vaccine* 6, 504–508 (1988a).
70. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmettre, and E. Paoletti, *Vaccine* 6, 497–503 (1988b).
71. Taylor, J., C. Edbauer, A. Rey-Senelongue, J.F. Bouquet, E. Norton, S. Goebel, P. Desmettre, and E. Paoletti, *J. Virol.* 64, 1441–1450 (1990).
72. Taylor, J., S. Pincus, J. Tartaglia, C. Richardson, G. Alkhatib, D. Briedis, M. Appel, E. Norton, and E. Paoletti, *J. Virol.* 65, 4263–4272 (1991).
73. Tizard, I., *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1851–1858 (1990).

74. Vialard, J., M. Lalumiere, T. Vernet, D. Briedis, G. Alkhatib, D. Henning, D. Levin, and C. Richardson, J. Virol. 64, 37–50 (1990).
75. Warren, J., M.K. Nadel, E. Slater, and S.J. Millian, Amer. J. Vet. Res. 21, 111–119 (1960).
76. Wild, T.F., E. Malvoisin, and R. Buckland, J. Gen. Virol. 72, 439–442 (1991).
77. Wild, F., P. Giraudon, D. Spehner, R. Drillien, and J-P. Lecocq, Vaccine 8, 441–442 (1990).
78. Yuen, L., and B. Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6417–6421 (1987).
79. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmettre, and E. Paoletti, Tech. Adv. Vac. Development, 321–334 (1988c).
80. Norrby, E., G. Utter, C. Örvell and M. Appel, J. Virol. 58, 536–541 (1986)

Patentansprüche

1. Rekombinantes Pockenvirus, das in einer nichtessentiellen Region des Pockenvirusgenoms DNA enthält, die mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert.
2. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 1, wobei das Morbillivirus Masernvirus ist.
3. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 2, wobei eines der mindestens zwei durch diese DNA codierten Antigene Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein ist.
4. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 2, wobei eines der mindestens zwei durch diese DNA codierten Antigene Masernvirus-Fusions-Glykoprotein ist.
5. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 2, wobei die DNA zwei Masernvirus-Glykoproteine codiert.
6. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 5, wobei die Masernvirus-Glykoproteine Hämagglutinin-Glykoprotein und Fusions-Glykoprotein sind.
7. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 2, wobei die DNA in einem Wirt durch Produktion von zwei Masernvirus-Glykoproteinen exprimiert wird.
8. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 7, wobei die Masernvirus-Glykoproteine Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein sind.
9. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 1, wobei das Pockenvirus ein Vacciniavirus ist.
10. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 1, wobei das Pockenvirus ein Avipockenvirus ist.
11. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 10, wobei das Avipockenvirus Kanarienvpockenvirus ist.
12. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 1, wobei die DNA durch Rekombination in das Pockenvirus eingeführt wird.
13. Rekombinantes Pockenvirus, das DNA, die mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert, und einen Promotor zur Expression der DNA enthält.
14. Impfstoff zur Induktion einer Immunantwort in einem mit dem Impfstoff geimpften tierischen Wirt, wobei der Impfstoff einen Träger und ein rekombinantes Pockenvirus umfaßt, das in einer nichtessentiellen Region DNA enthält, die mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert.
15. Impfstoff nach Anspruch 14, wobei das Morbillivirus Masernvirus ist.
16. Impfstoff nach Anspruch 15, wobei eines der mindestens zwei durch die DNA codierten und exprimierten Antigene Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein ist.
17. Impfstoff nach Anspruch 15, wobei eines der mindestens zwei durch die DNA codierten und exprimierten Antigene Masernvirus-Fusions-Glykoprotein ist.
18. Impfstoff nach Anspruch 15, wobei die DNA zwei Masernvirus-Glykoproteine codiert und exprimiert.

19. Impfstoff nach Anspruch 18, wobei die Masernvirus-Glykoproteine Hämagglutinin-Glykoprotein und Fusions-Glykoprotein sind.
20. Impfstoff nach Anspruch 14, wobei das Pockenvirus ein Vacciniavirus ist.
21. Impfstoff nach Anspruch 14, wobei das Pockenvirus ein Avipockenvirus ist.
22. Impfstoff nach Anspruch 21, wobei das Avipockenvirus Kanarienspockenvirus ist.
23. Impfstoff nach Anspruch 14, wobei die DNA durch Rekombination in das Pockenvirus eingeführt wird.
24. Verwendung eines rekombinanten Pockenvirus, das in einer nichtessentiellen Region des Pockenvirusgenoms DNA enthält, die mindestens zwei Antigene von Morbillivirus codiert zum Schutz eines Hundes gegen Hundestaupe.
25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei das Morbillivirus Masernvirus ist.
26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die DNA Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein codiert.
27. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die DNA Masernvirus-Fusions-Glykoprotein codiert.
28. Verwendung eines rekombinanten Vaccinia- oder Avipockenvirus, das DNA aus einem Morbillivirus, das ein Masernvirus ist, in einer nicht essentiellen Region des Vaccinia- oder Avipockenvirus enthält, wobei die DNA Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und ein zusätzliches Masernvirus-Glykoprotein codiert, zum Schutz eines Hundes gegen Hundestaupe.
29. Rekombinantes Kanarienspockenvirus, das in einer nichtessentiellen Region des Kanarienspockenvirusgenoms DNA aus Masernvirus enthält, wobei die DNA mindestens zwei Antigene codiert, wobei zumindest eines der beiden Antigene ein Masernvirus-Glykoprotein codiert, ausgewählt aus Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein.
30. Rekombinantes Kanarienspockenvirus nach Anspruch 29, das vCP82 ist.
31. Rekombinantes Kanarienspockenvirus, das in einer nicht essentiellen Region des Kanarienspockenvirus DNA aus Masernvirus und einen Promotor zur Expression der DNA enthält, wobei die DNA ein Masernvirus-Glykoprotein codiert, ausgewählt aus Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein, Masernvirus-Fusions-Glykoprotein und der Kombination aus Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein.
32. Impfstoff zur Induktion einer Immunantwort in einem mit dem Impfstoff geimpften tierischen Wirt, wobei der Impfstoff einen Träger und ein rekombinantes Kanarienspockenvirus umfaßt, das in einer nichtessentiellen Region DNA aus Masernvirus enthält, wobei die DNA mindestens zwei Antigene codiert, wobei zumindest eines der beiden Antigene ein Masernvirus-Glykoprotein codiert, ausgewählt aus Masernvirus-Hämagglutinin-Glykoprotein und Masernvirus-Fusions-Glykoprotein.
33. Impfstoff nach Anspruch 32, wobei das rekombinante Kanarienspockenvirus vCP82 ist.
34. Verwendung eines rekombinanten Kanarienspockenvirus, das DNA aus Masernvirus in einer nicht essentiellen Region des Kanarienspockenvirus enthält, die Masernvirus-Fusions-Glykoprotein und mindestens ein zusätzliches Masernvirus-Glykoprotein codiert zum Schutz eines Hundes gegen Hundestaupe.
35. Rekombinantes Pockenvirus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, 12 oder 13, wobei das Pockenvirus ein Vacciniavirus ist, von dem das Thymidinkinase-Gen, die hämorrhagische Region, die A-Typ-Einschlußkörper-Region, das Hämagglutinin-Gen, die Wirtsbereich-Genregion und die Ribonucleotid-Reductase, große Untereinheit, deletiert wurden.
36. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 35, wobei das Vacciniavirus ein NYVAC-Vacciniavirus ist.
37. Impfstoff nach einem der Ansprüche 14 bis 20 oder 23, wobei das Pockenvirus ein Vacciniavirus ist, von dem das Thymidinkinase-Gen, die hämorrhagische Region, die A-Typ-Einschlußkörper-Region, das Hä-

magglutinin-Gen, die Wirtsbereich-Genregion und die Ribonucleotid-Reductase, große Untereinheit, deletiert sind.

38. Impfstoff nach Anspruch 37, wobei das Vacciniavirus ein NYVAC-Vacciniavirus ist.

39. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Pockenvirus ein Vacciniavirus ist, von dem das Thymidinkinase-Gen, die hämorrhagische Region, die A-Typ-Einschlußkörper-Region, das Hämagglutinin-Gen, die Wirtsbereich-Genregion und die Ribonucleotid-Reductase, große Untereinheit, deletiert sind.

40. Verwendung nach Anspruch 39, wobei das Vacciniavirus ein NYVAC-Vacciniavirus ist.

41. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das Vacciniavirus ein Vacciniavirus ist, von dem das Thymidinkinase-Gen, die hämorrhagische Region, die A-Typ-Einschlußkörper-Region, das Hämagglutinin-Gen, die Wirtsbereich-Genregion und die Ribonucleotid-Reductase, große Untereinheit, deletiert sind.

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei das Vacciniavirus ein NYVAC-Vacciniavirus ist.

43. Rekombinantes Pockenvirus oder Kanarienspockenvirus nach einem der Ansprüche 1 bis 8, 10 bis 13 oder 29, wobei das Pockenvirus oder das Kanarienspockenvirus ein ALVAC-Kanarienspockenvirus ist.

44. Impfstoff nach einem der Ansprüche 14 bis 19, 21 bis 23 oder 32, wobei das Pockenvirus oder das Kanarienspockenvirus ein ALVAC-Kanarienspockenvirus ist.

45. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 28 oder 34, wobei das Pockenvirus, Avispockenvirus oder Kanarienspockenvirus ein ALVAC-Kanarienspockenvirus ist.

46. Rekombinantes Pockenvirus nach Anspruch 36, das vP913 ist.

47. Impfstoff nach Anspruch 38, wobei das NYVAC-Vacciniavirus vP913 ist.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 oder 42, wobei das NYVAC-Vacciniavirus vP913 ist.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

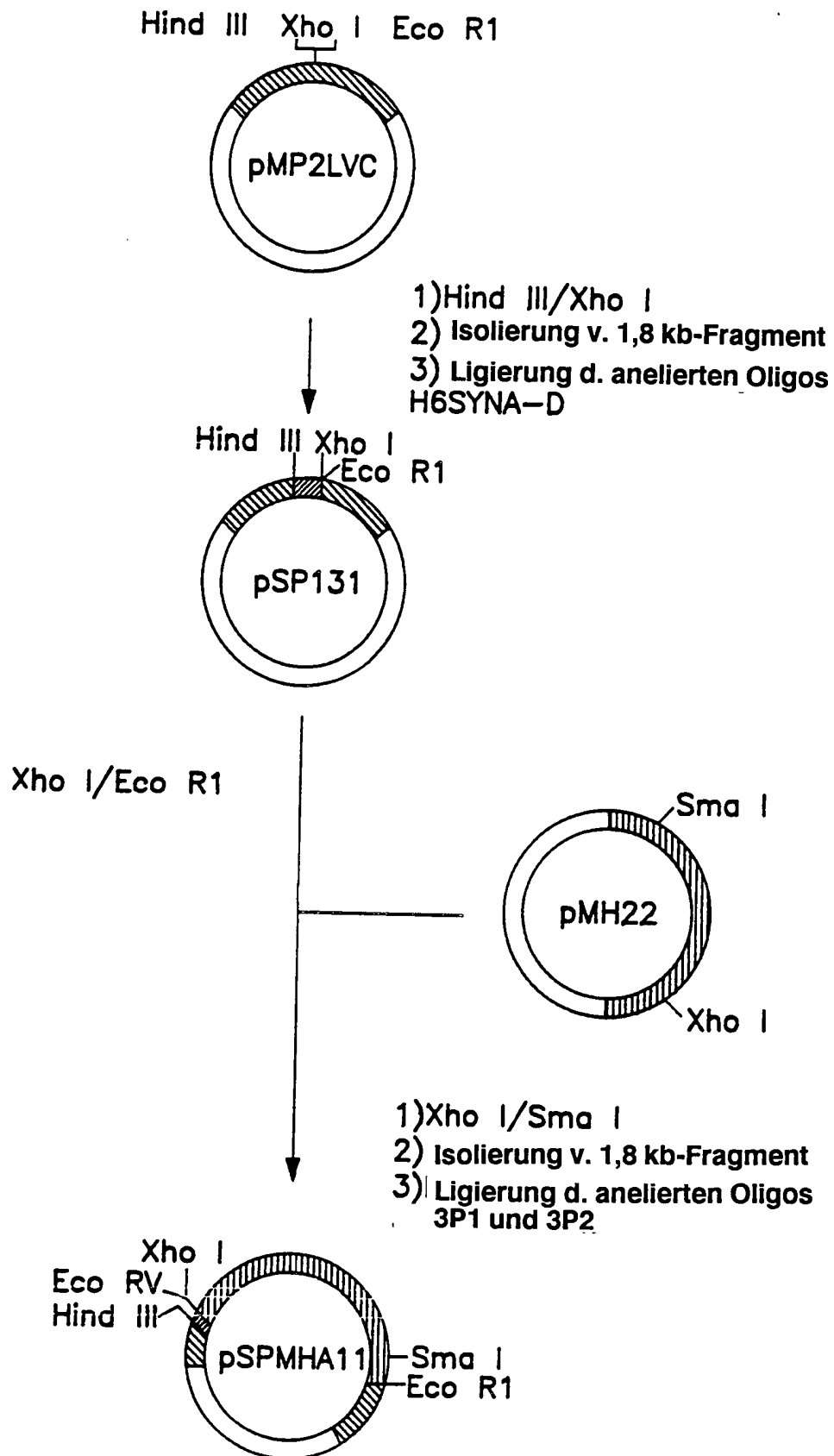
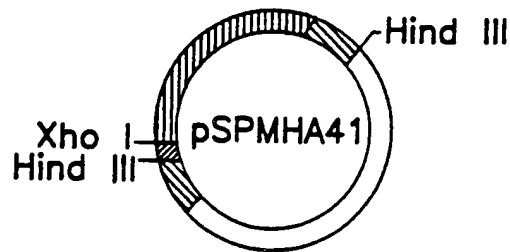
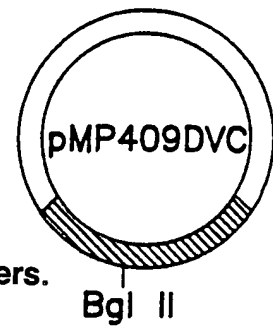


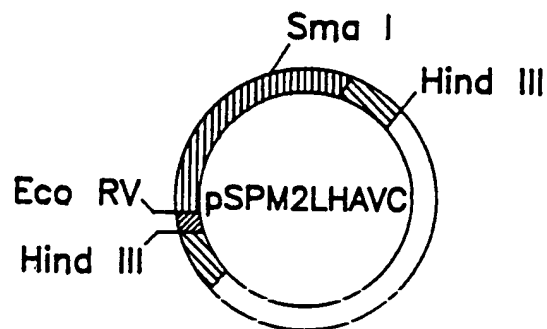
FIG. 1A

- 1) Hind III/Eco R1
- 2) Isolierung v. 1,9 kb-Fragment
- 3) mit glatten Enden versehen

- 1) Bgl II
- 2) m. glatt. End. vers.



Mutagenese
mit
Oligonucleotid
HAXHOD



vP557

FIG. 1B

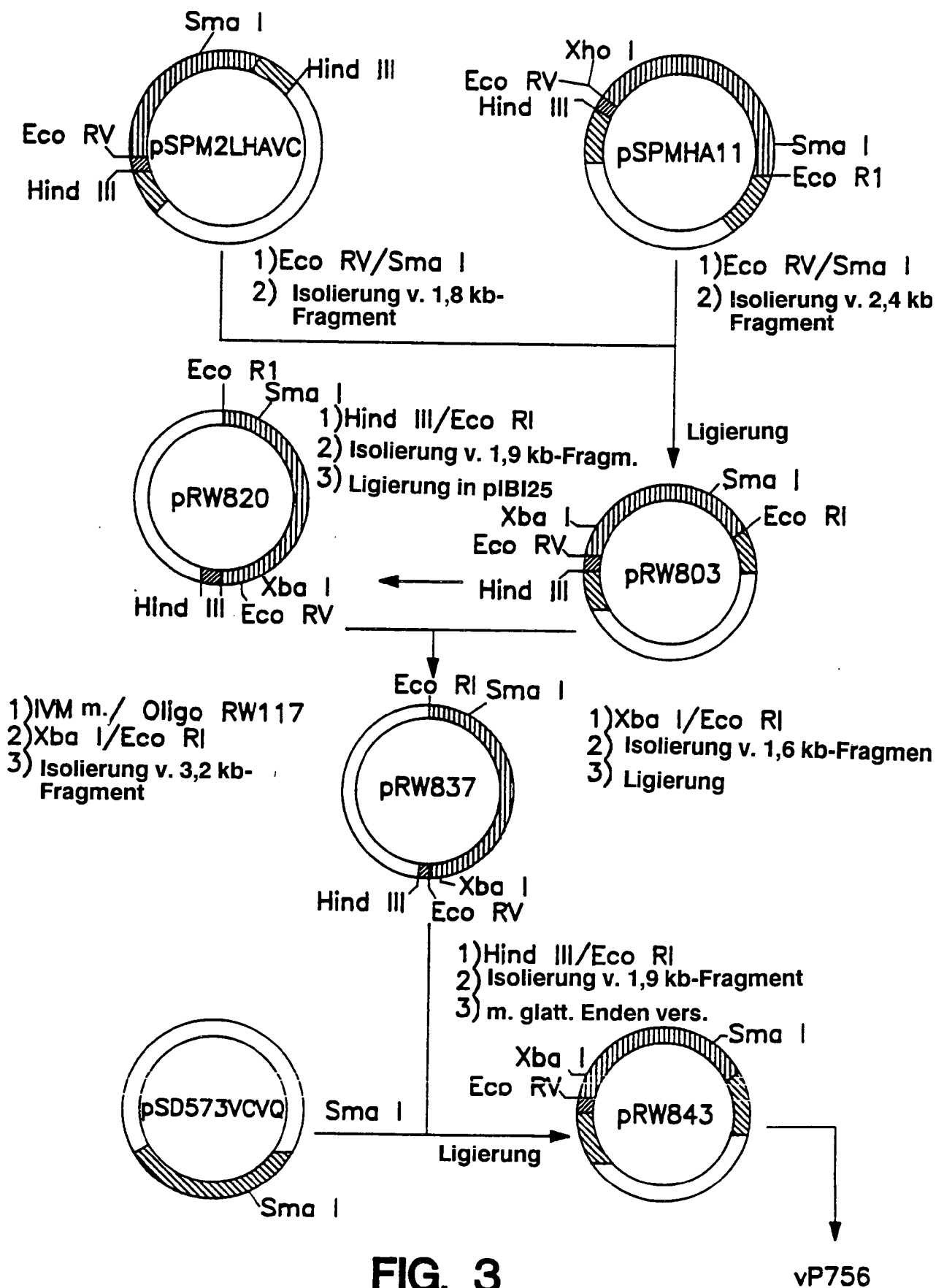


FIG. 3

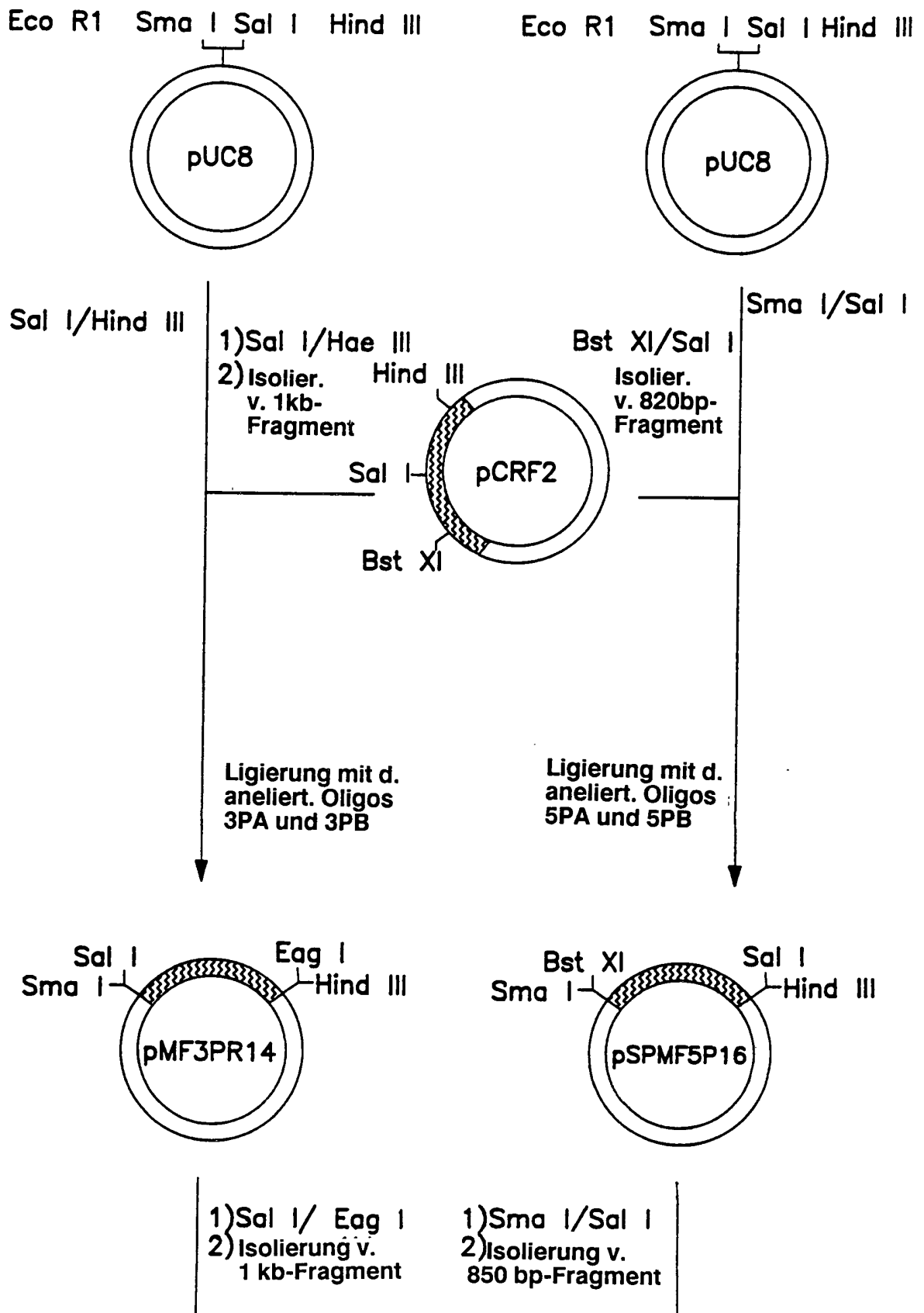


FIG. 2A

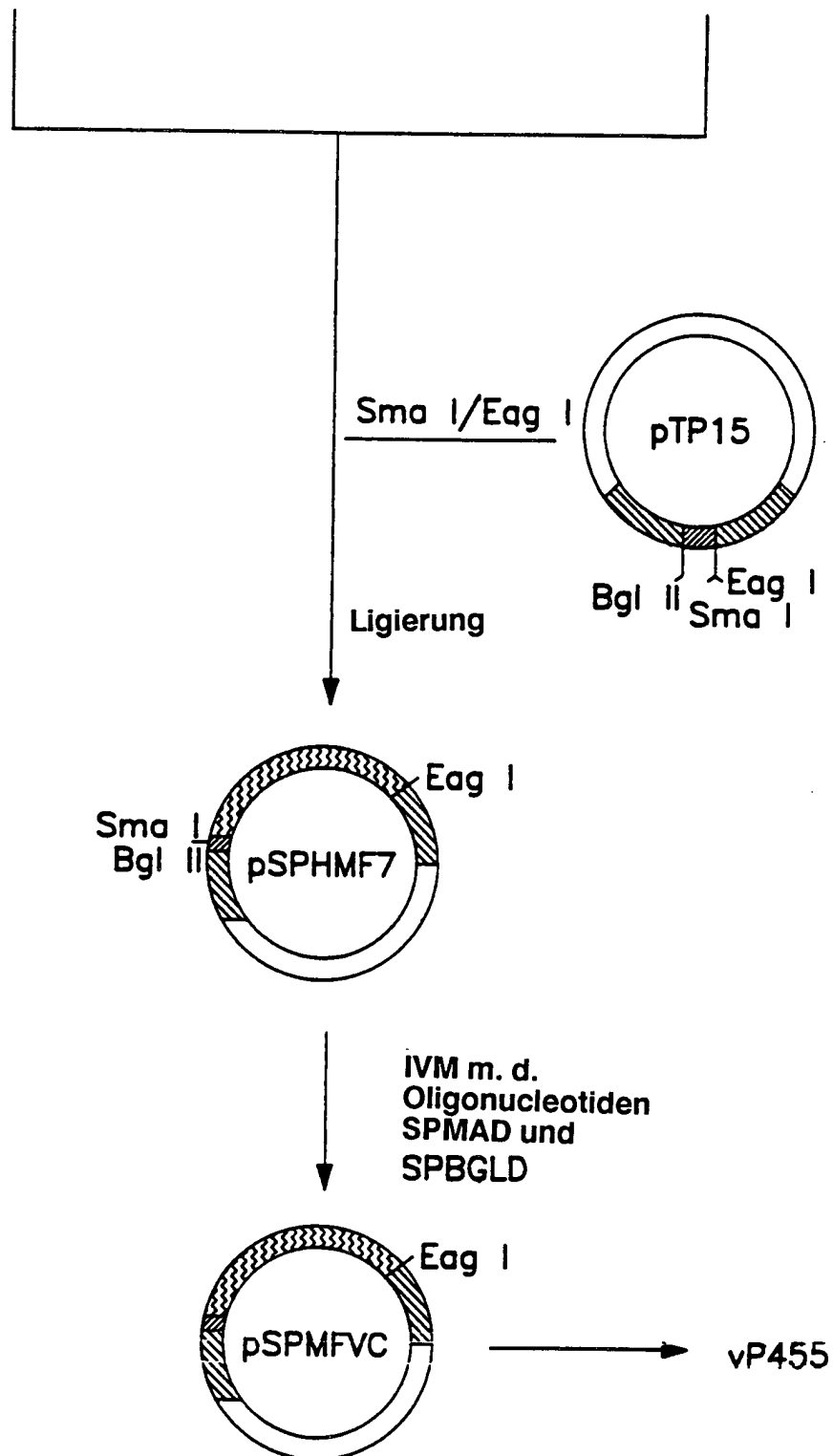


FIG. 2B

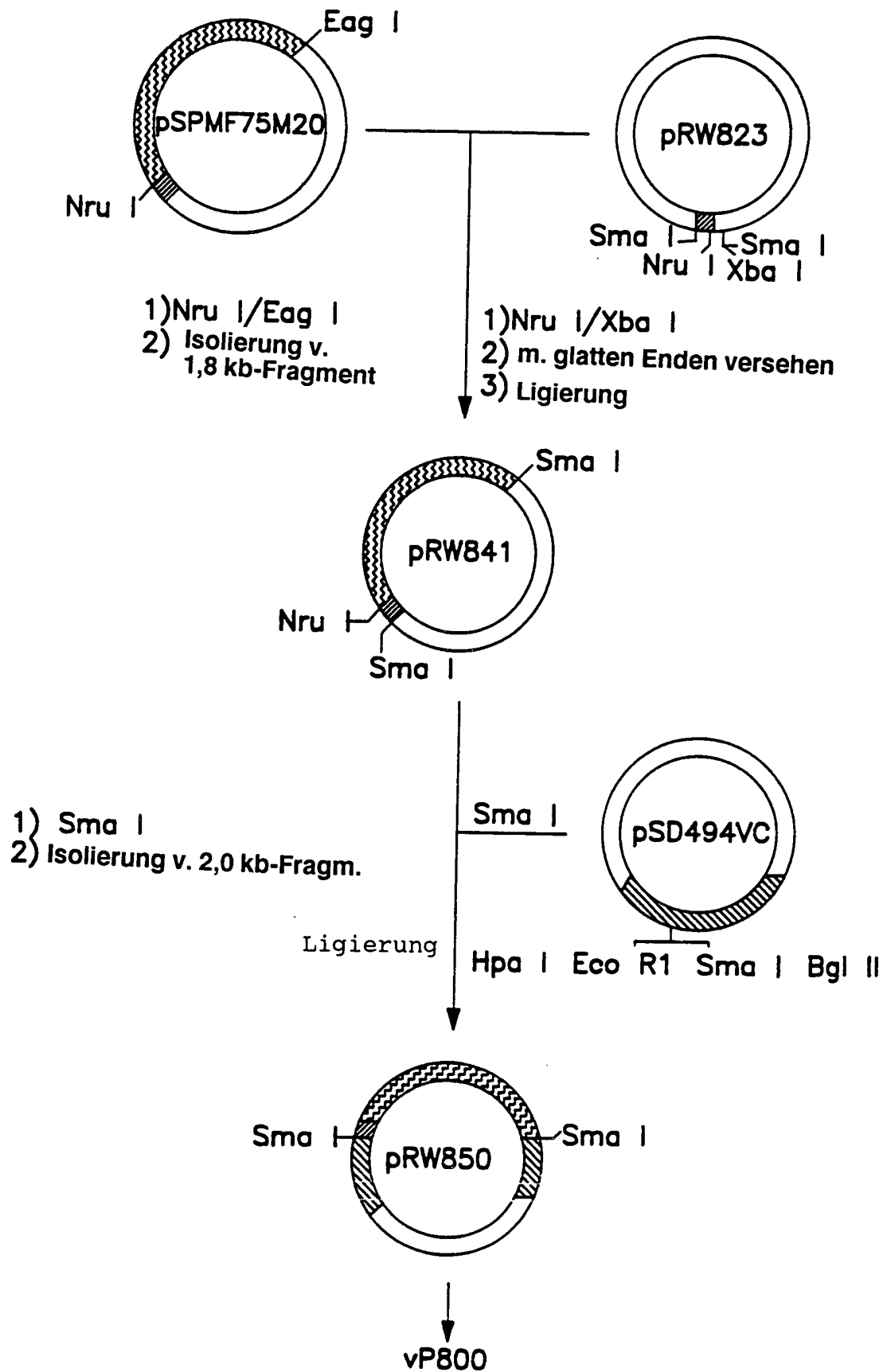


FIG. 4

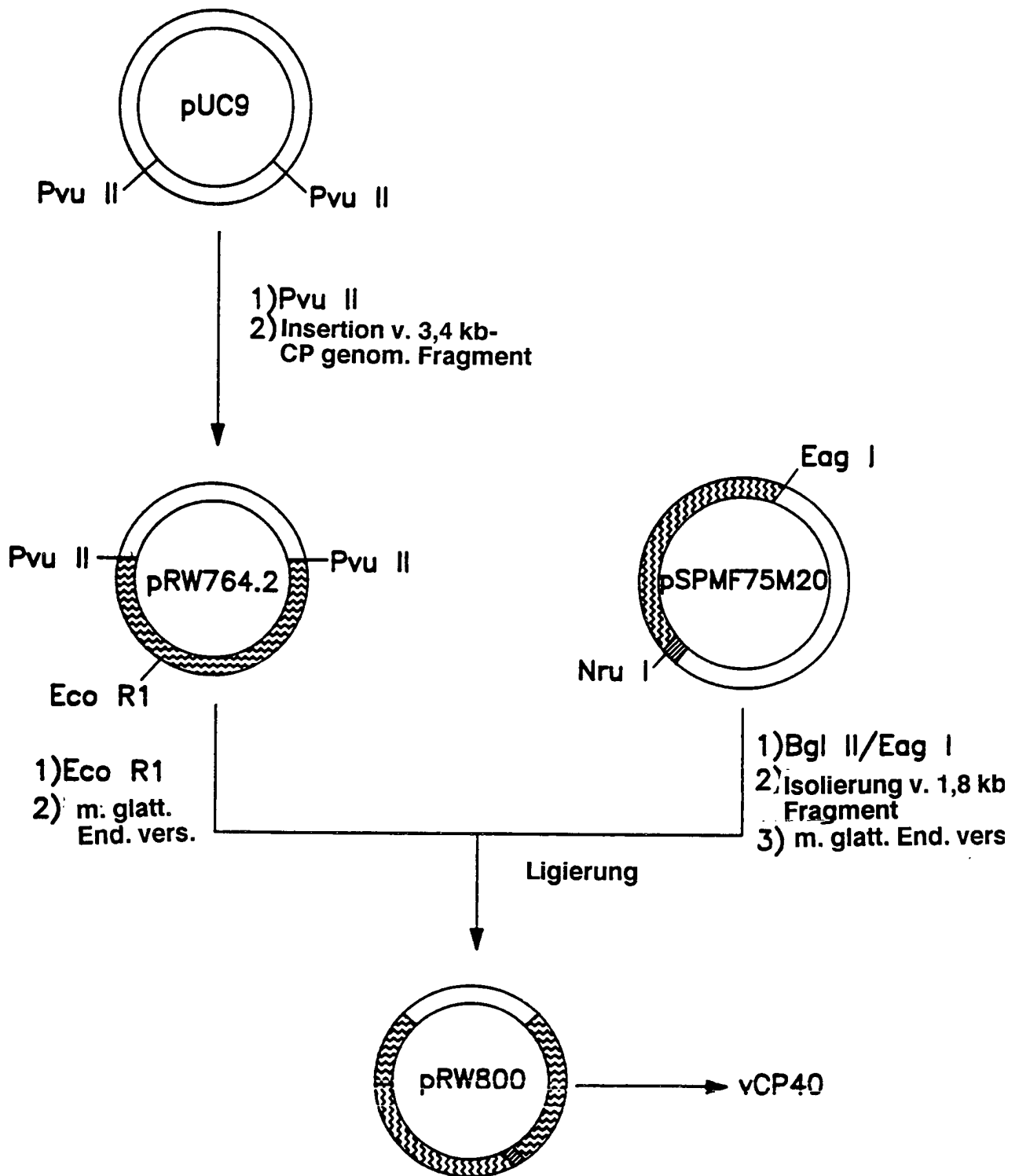


FIG. 5

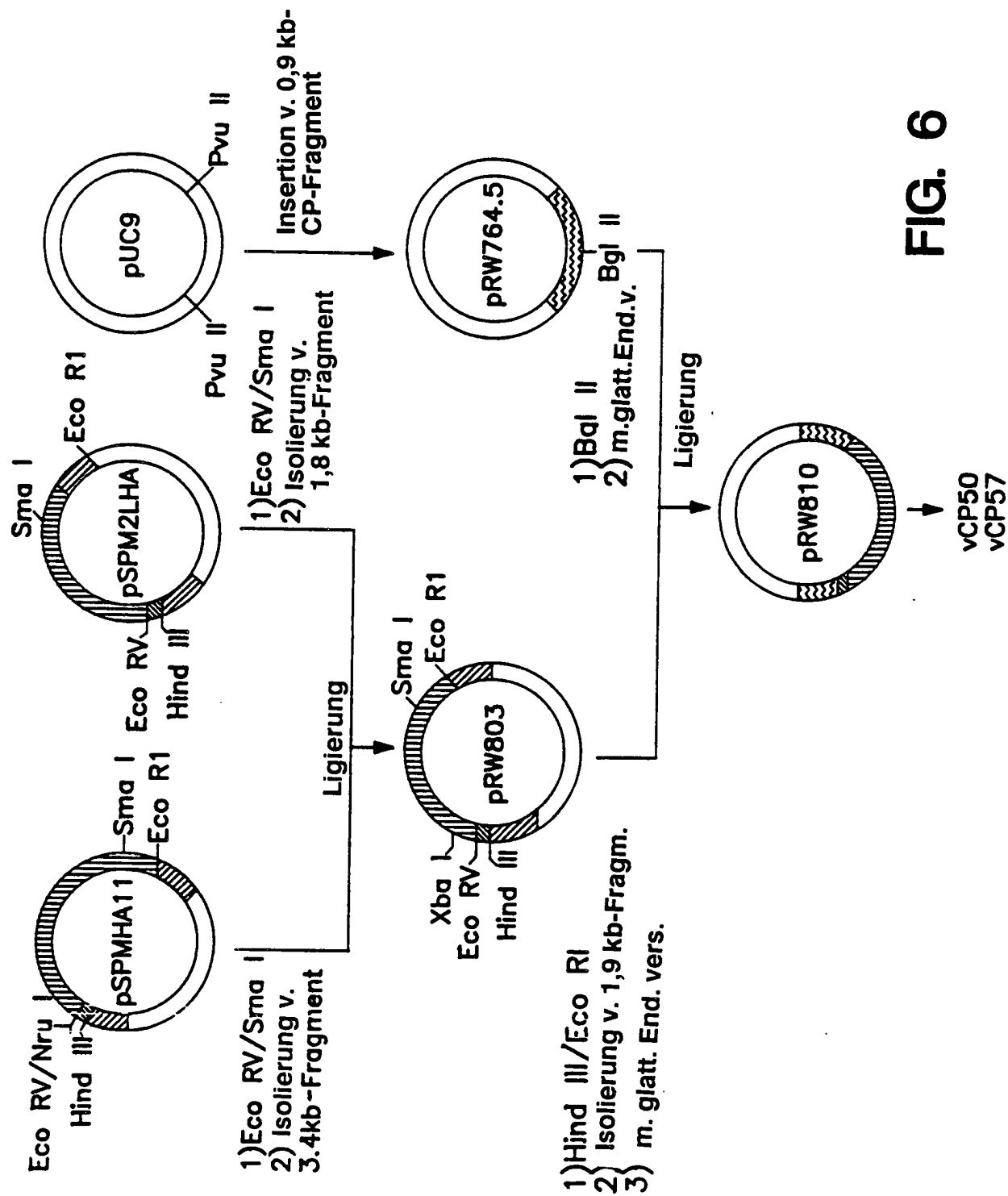


FIG. 6

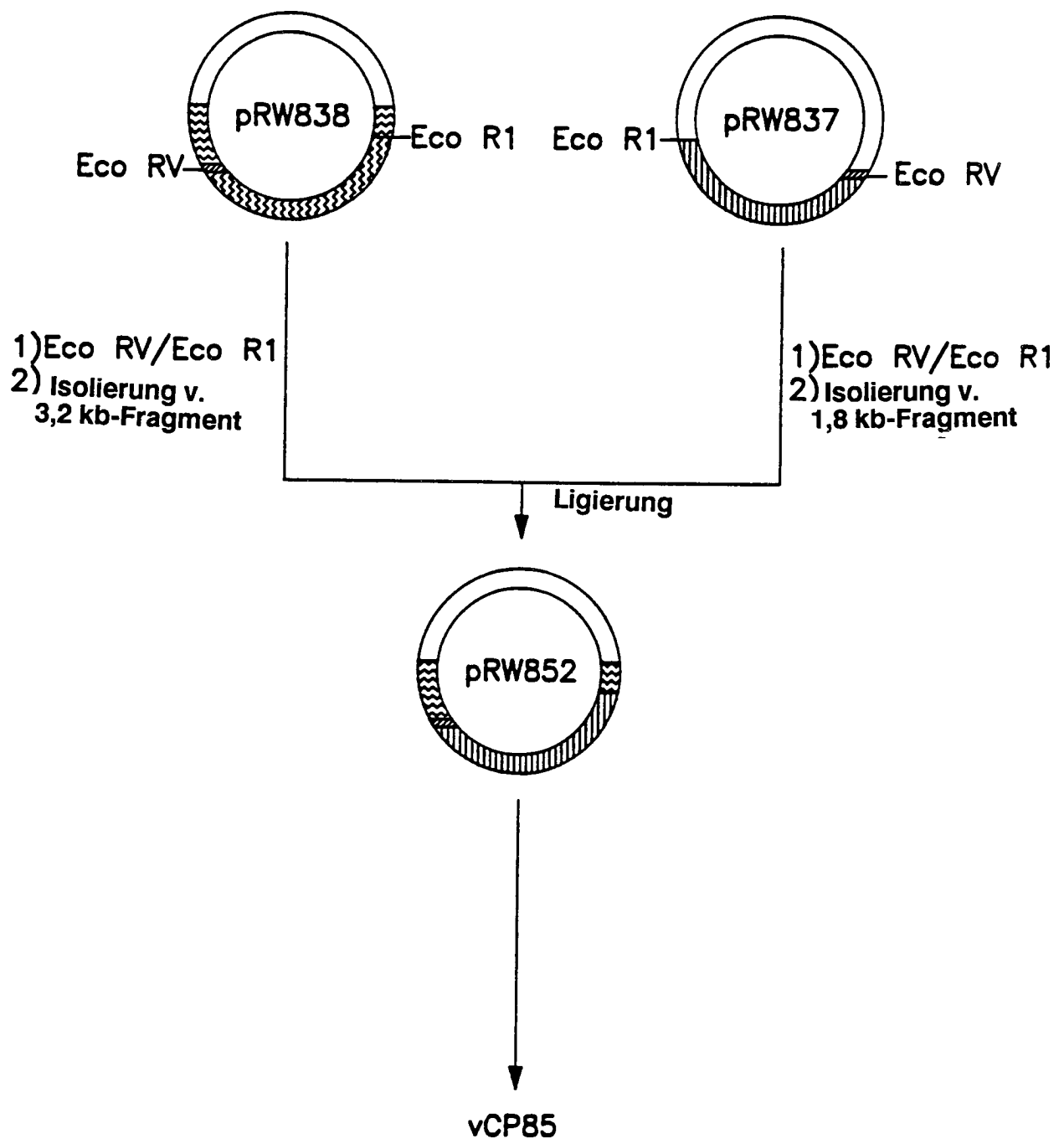


FIG. 7

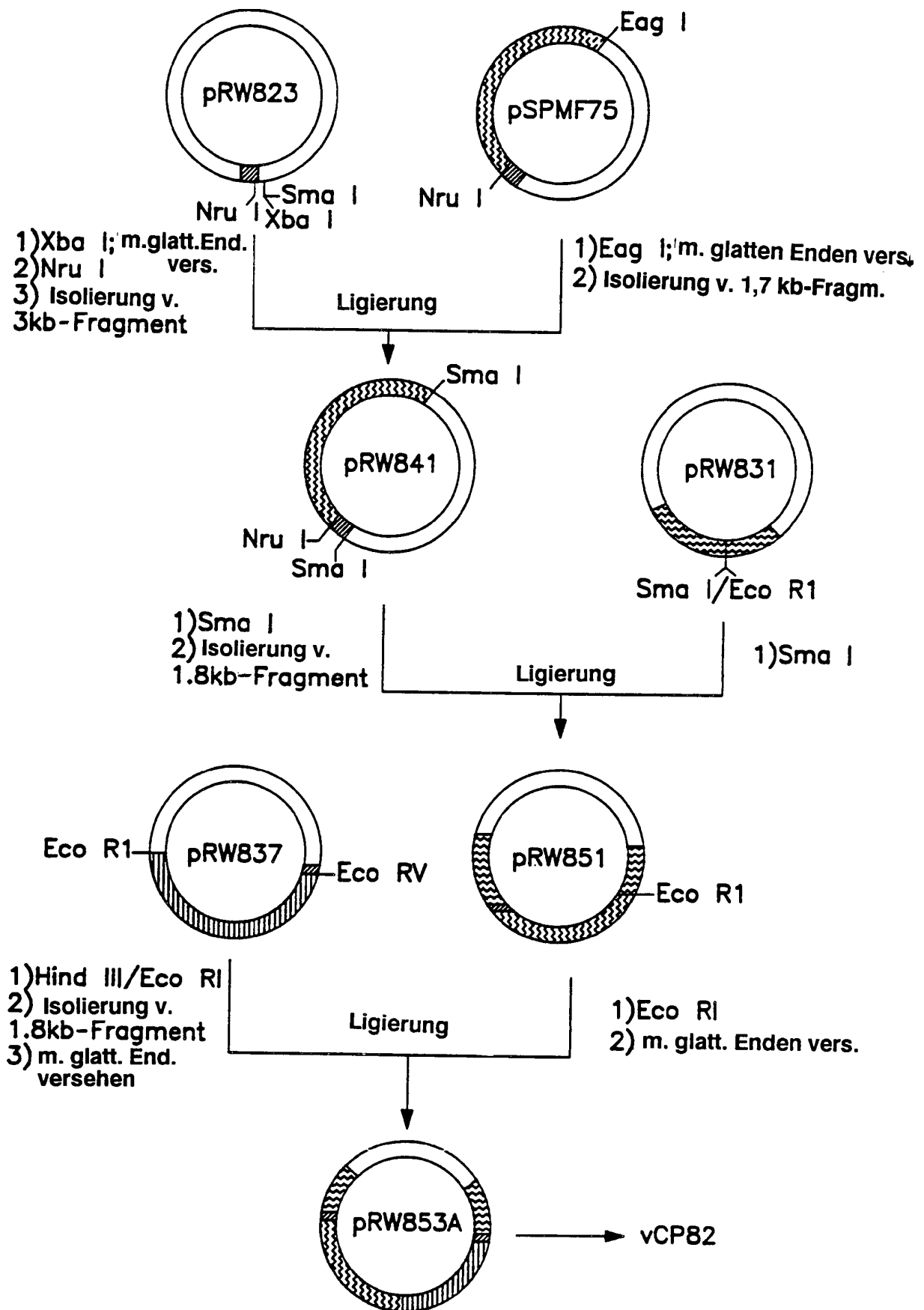


FIG. 8

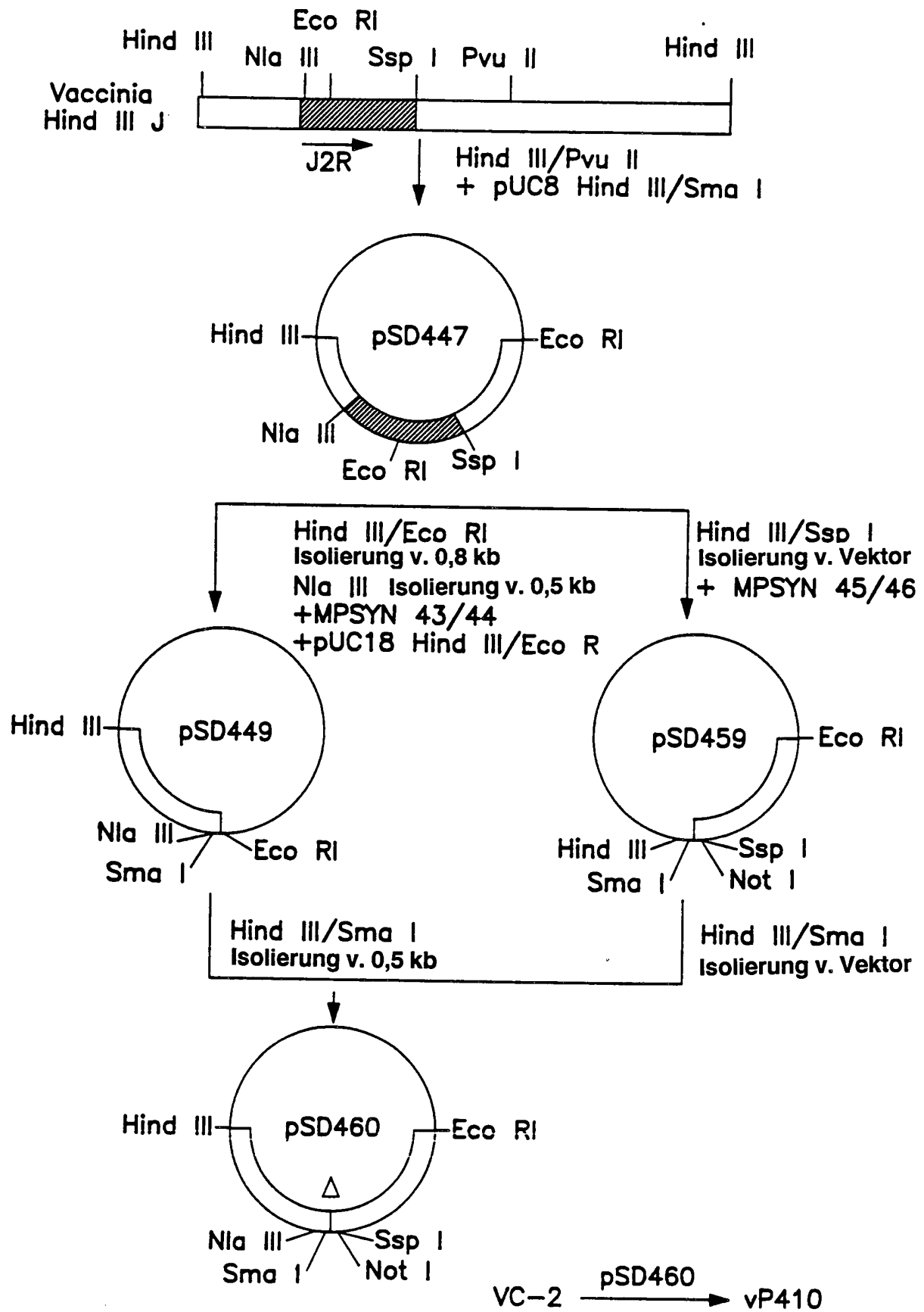


FIG. 9

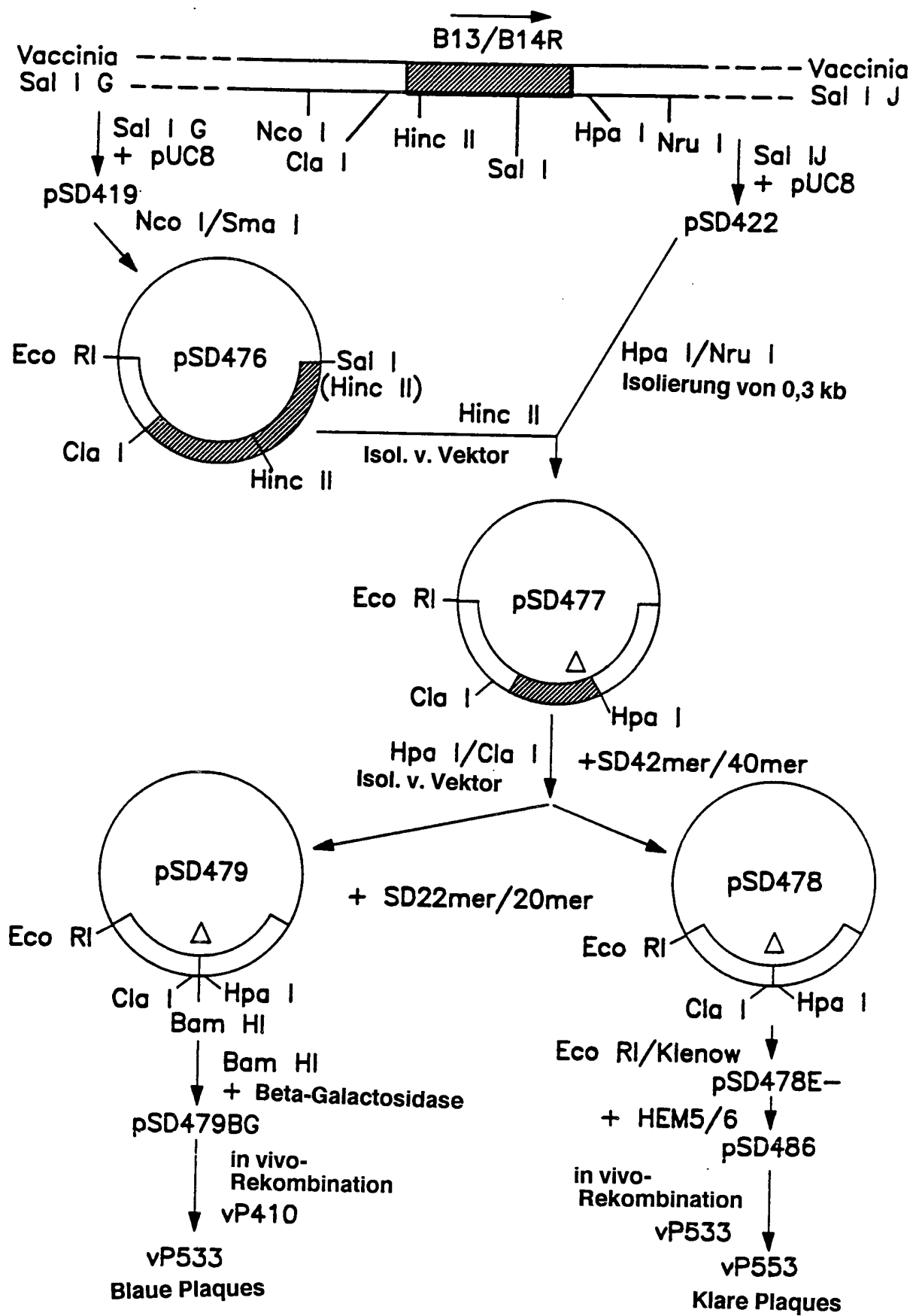
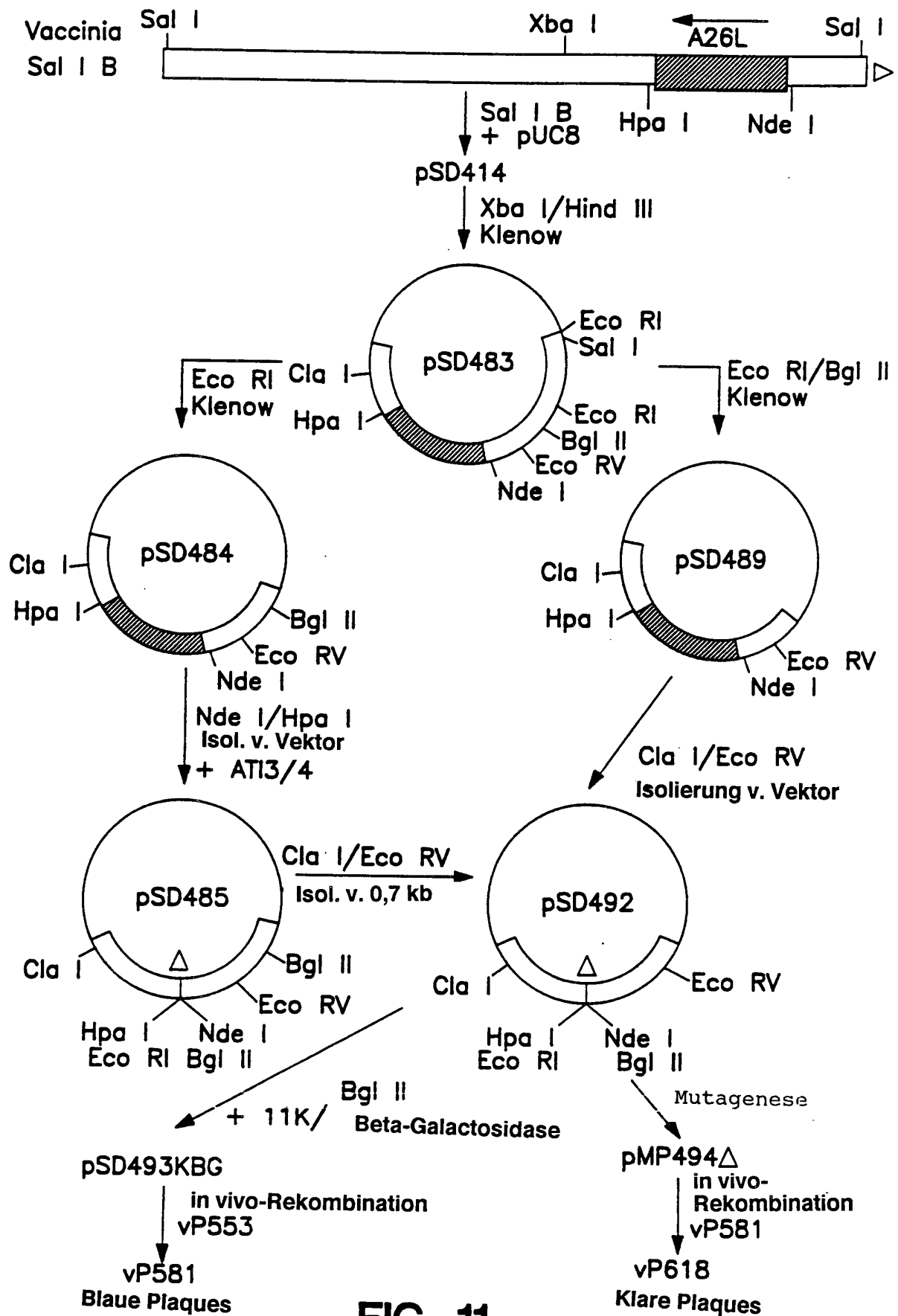


FIG. 10

**FIG. 11**

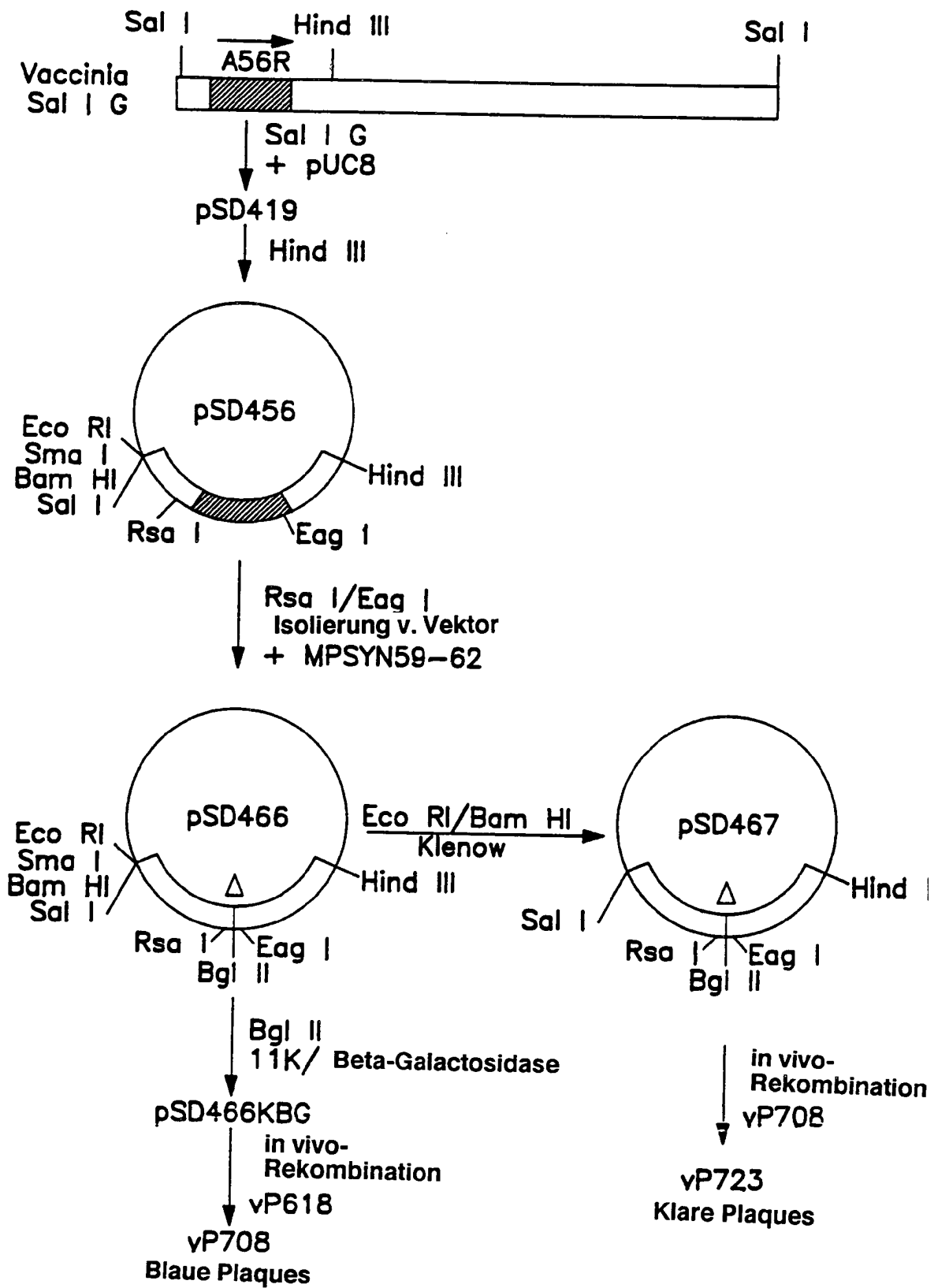


FIG. 12

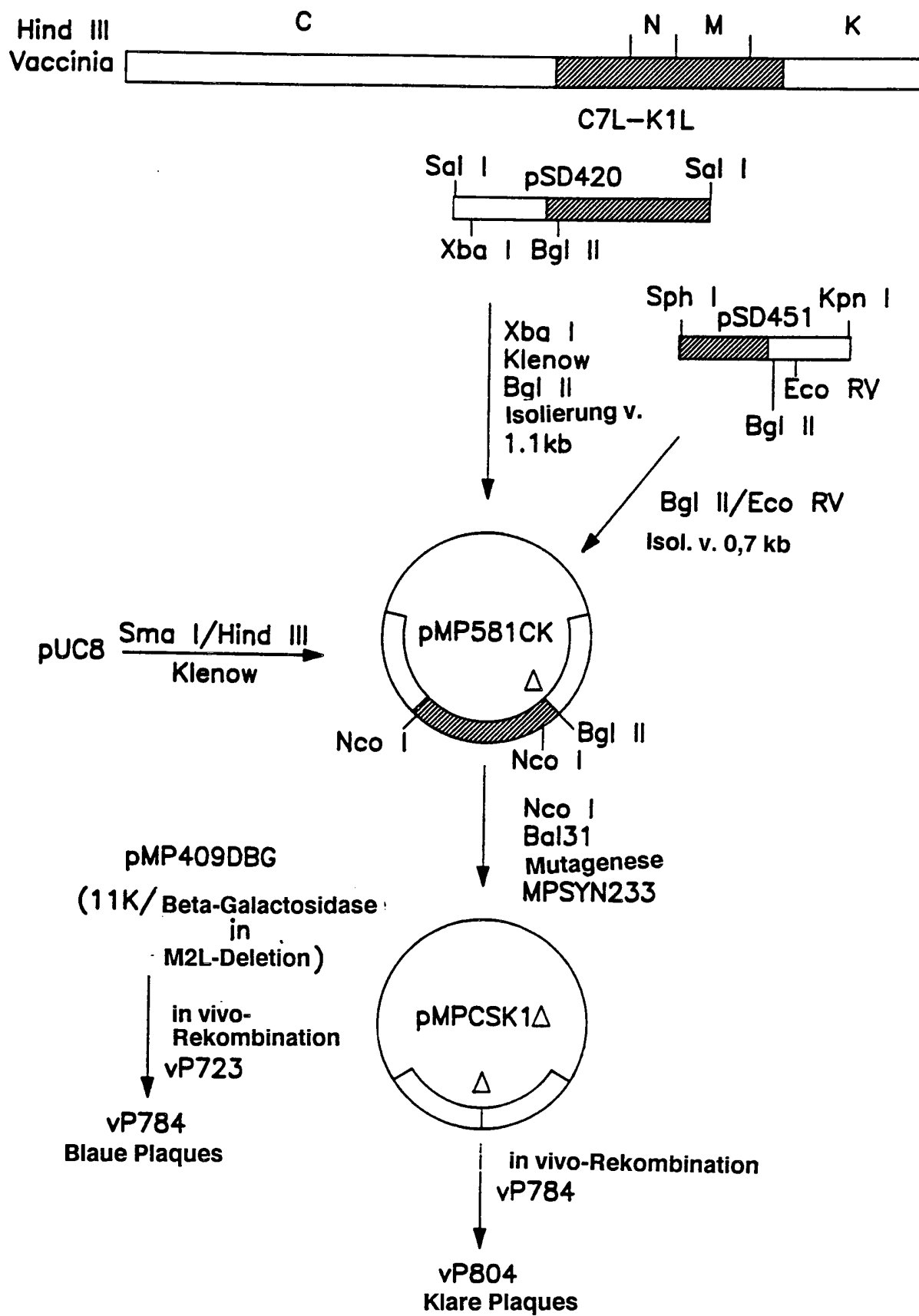


FIG. 13

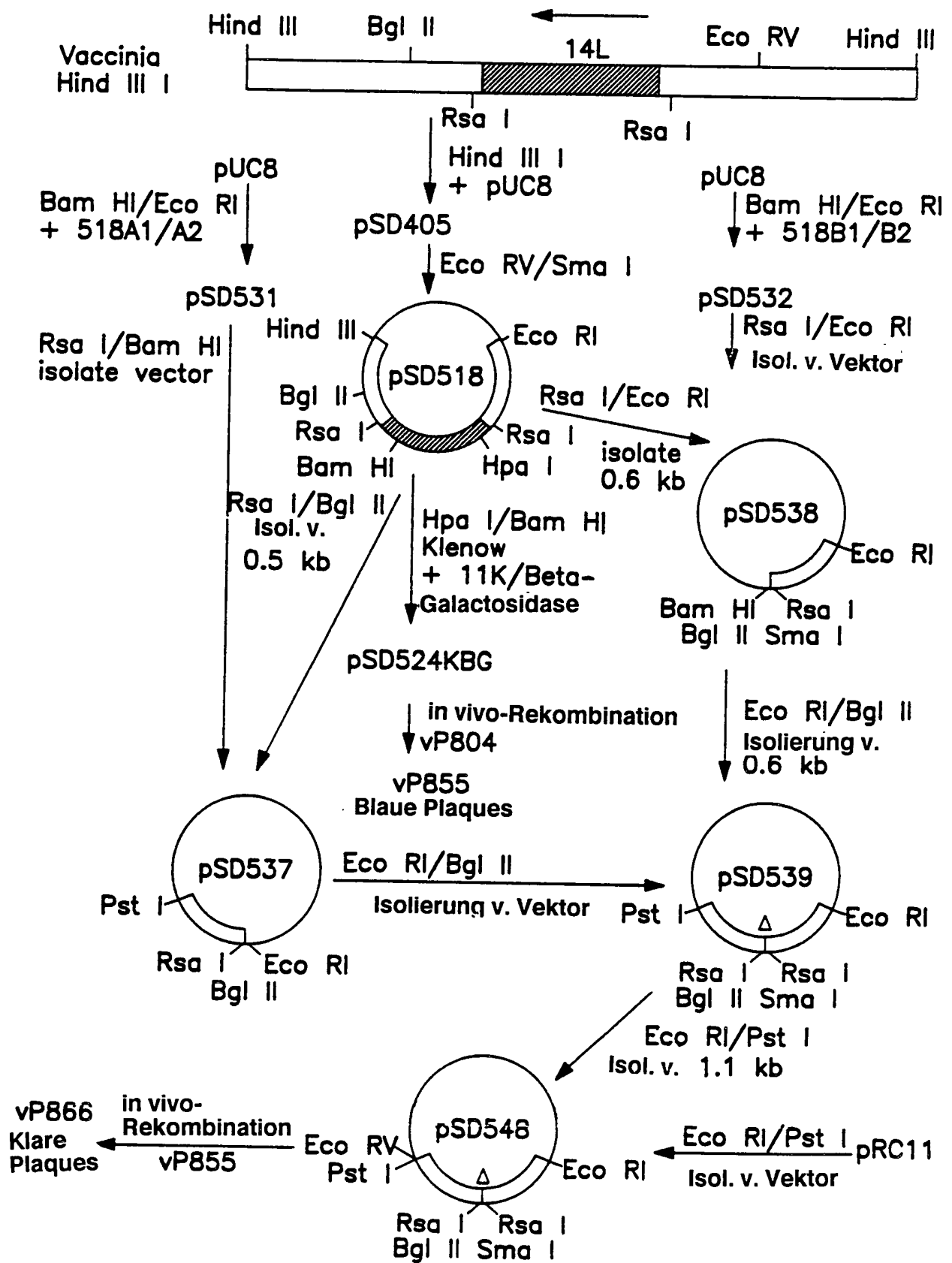


FIG. 14

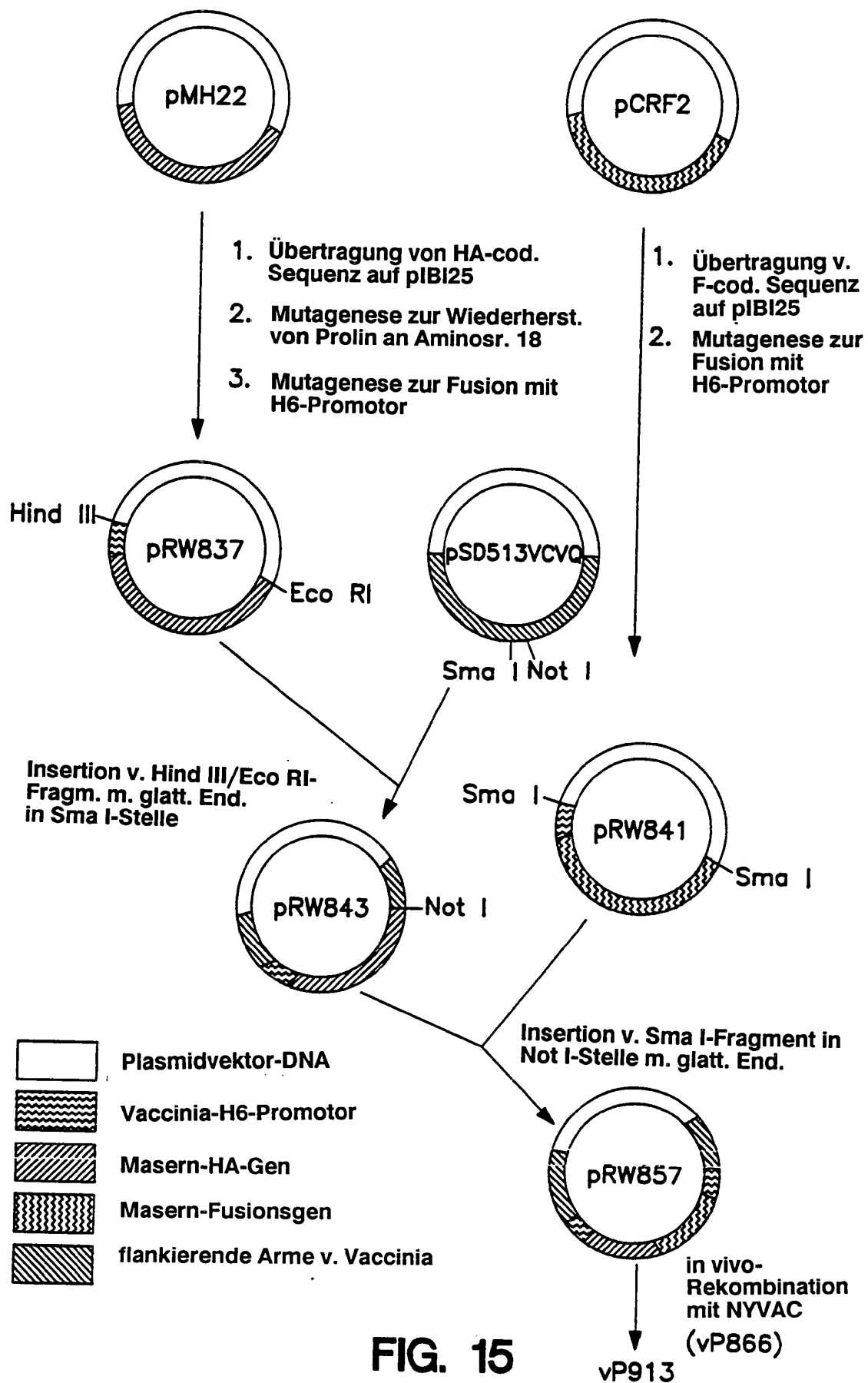


FIG. 15