

19



Octrooiraad
Nederland

11 195058

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 9120026

51 Int.Cl.7
C12N15/86, C07K14/12, C07K14/13

22 Ingediend: 20.11.1991

86 Oorspronkelijke internationale aanvraag:
PCT/US91/08703

87 Publicatienummer en -datum oorspronkelijke
internationale aanvraag: WO 92/08789 29.05.1992

30 Voorrang:
20.11.1990 US 0000621614
22.10.1991 US 0000776867

43 Ter inzage gelegd:
01.09.1993 I.E. 1993/17

47 Dagtekening:
01.07.2003

45 Uitgegeven:
01.09.2003 I.E. 2003/09

73 Octrooihouder(s):
Virogenetics Corporation te Troy, New York,
Verenigde Staten van Amerika (US).

72 Uitvinder(s):
Enzo Paoletti te Delmar, New York (US)
Jill Taylor te Albany, New York (US)

74 Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

54 Recombinant vacciniavirus en vaccin dat dit recombinant vacciniavirus bevat.

NL C 195058

Dit octrooi is verleend onder toepassing van artikel 102b van de rijkswet van 19 december 2002 tot wijziging van de Rijksoctrooiwet 1995 in verband met de behandeling van octrooiaanvragen die zijn ingediend op grond van de Rijksoctrooiwet (Stb. 2003, 35)

Recombinant vacciniavirus en vaccin dat dit recombinant vacciniavirus bevat

De uitvinding heeft betrekking op een recombinant vacciniavirus en op een vaccin dat dit recombinant vacciniavirus bevat.

- 5 In deze aanvraag worden verschillende publicaties aangehaald met Arabische cijfers tussen haakjes. Een volledige vermelding van deze referenties is te vinden aan het eind van de beschrijving direct voorafgaande aan de conclusies. Deze referenties beschrijven de stand der techniek waarmee deze uitvinding verband houdt.

- 10 Vacciniavirus en meer recentelijk andere pokkenvirussen zijn gebruikt voor de insertie en expressie van vreemde genen. De basistechniek voor de insertie van vreemde genen in levend infectieus pokkenvirus houdt recombinatie in tussen pokken-DNA-sequenties die een vreemd genetisch element flankeren in een donorplasmide, en homologe sequenties die aanwezig zijn in het ontvangende pokkenvirus (Piccini et al., 1987).

- 15 Specifiek worden de recombinante pokkenvirussen geconstrueerd in twee stappen die bekend zijn in het vakgebied en die analoog zijn aan de werkwijzen voor het creëren van synthetische recombinanten van het vacciniavirus, beschreven in Amerikaans octrooischrift 4.603.112, waarvan de beschrijving hier bij referentie wordt opgenomen.

- 20 Eerst wordt de DNA-gensequentie die in het virus geïnserteerd moet worden, in het bijzonder een open leesframe uit een niet-pokkenbron, gebracht in een plasmideconstruct van *E. coli* waarin DNA geïnserteerd is dat homoloog is met een stuk DNA van het pokkenvirus. De te inserteren DNA-gensequentie wordt afzonderlijk geligeerd aan een promotor. De promotor-genkoppeling wordt zo in het plasmideconstruct gepositioneerd dat de promotor-genkoppeling aan beide uiteinden wordt geflankeerd door DNA dat homoloog is aan een DNA-sequentie die een gebied van pokken-DNA flankiert dat een niet-essentiële locus bevat. Het resulterende plasmideconstruct wordt vervolgens geamplificeerd door kweken in *E. coli* bacteriën (Clewell, 1972) en geïsoleerd (Clewell et al., 1969; Maniatis et al.; 1982).

- 25 Vervolgens wordt het geïsoleerde plasmide met daarin de te inserteren DNA-gensequentie getransfected in een celcultuur, bijvoorbeeld kippe-embryo-fibroblasten, samen met het pokkenvirus. Recombinatie tussen homoloog pokken-DNA in respectievelijk het plasmide en het virale genoom geeft een pokkenvirus dat gemodificeerd is door de aanwezigheid, in een niet-essentieel gebied van zijn genoom, van vreemde DNA-sequenties. Met de uitdrukking "vreemd" DNA wordt exogeen DNA aangeduid, in het bijzonder DNA uit een niet-pokkenbron, dat codeert voor genproducten die normaliter niet geproduceerd worden door het genoom waarin het exogene DNA geplaatst is.

- 30 Genetische recombinatie is in het algemeen de uitwisseling van homologe stukken DNA tussen twee strengen DNA. In bepaalde virussen kan DNA vervangen zijn door RNA. Homologe stukken nucleïnezuur zijn stukken nucleïnezuur (DNA of RNA) die dezelfde volgorde van nucleotidebasen hebben.

- 35 Genetische recombinatie kan op natuurlijke wijze plaatsvinden tijdens de replicatie of vervaardiging van nieuwe virale genomen binnen de geïnfecteerde gastheercel. Zo kan genetische recombinatie tussen virale genen optreden tijdens de virale replicatiecyclus die plaatsvindt in een gastheercel die gecoïnfecteerd is met twee of meer verschillende virussen of andere genetische constructen. Een stuk DNA van een eerste 40 genoom wordt uitwisselbaar gebruikt bij het construeren van het stuk van het genoom van een tweede coïnfecterend virus waarvan het DNA homoloog is met dat van het eerste virale genoom.

- 45 Recombinatie kan echter ook plaatsvinden tussen stukken DNA in verschillende genomen die niet volmaakt homoloog zijn. Als één dergelijk stuk van een eerste genoom homoloog is met een stuk van een ander genoom, met uitzondering van de aanwezigheid in het eerste stuk van bijvoorbeeld een genetische merker of een gen dat codeert voor een antigene determinant dat geïnserteerd is in een deel van het homologe DNA, kan toch recombinatie plaatsvinden en de producten van die recombinatie zijn dan te detecteren door de aanwezigheid van die genetische merker of dat gen in het recombinante virale genoom.

- 50 Voor succesvolle expressie van de geïnserteerde DNA-gensequentie door het gemodificeerde infectieuze virus moet aan twee voorwaarden voldaan worden. Ten eerste moet de insertie in een niet-essentieel gebied van het virus plaatsvinden om het gemodificeerde virus levensvatbaar te doen blijven. De tweede voorwaarde voor expressie van geïnserteerd DNA is de aanwezigheid van een promotor met de juiste betrekking tot het geïnserteerde DNA. De promotor moet zo geplaatst zijn dat die stroomopwaarts van de tot expressie te brengen DNA-sequentie gelokaliseerd is.

- 55 Hondenziektevirus (CDV) en mazelenvirus (MV) zijn leden van de Morbillivirus subgroep van de familie van het geslacht Paramyxovirus (Diallo, 1990; Kingsbury et al., 1978). De virussen bevatten een niet-gesegmenteerd enkelstrengs RNA-genoom met negatieve polariteit. Hondenziekte is een zeer infectieuze met koorts gepaard gaande ziekte van honden en andere carnivoren. De mortaliteit is hoog; variërend

tussen 30 en 80%. Overlevende honden hebben vaak een permanente schade aan het centraal zenuwstelsel (Fenner et al., 1987). Evenzo veroorzaakt het mazelenvirus een acute infectieuze met koorts gepaard gaande ziekte, die gekenmerkt wordt door een gegeneraliseerde huiduitslag met papels. De ziekte treft voornamelijk kinderen.

- 5 Van de eigenschappen van Morbillivirussen is onlangs een overzicht verschenen van de hand van Norrby en Oxman (1990) en Diallo (1990). Zoals vermeld voor andere Paramyxovirussen (Avery en Niven, 1979; Merz et al., 1980) zijn twee structurele eiwitten cruciaal voor de inductie van een beschermende immuunrespons. Dit zijn het membraanglycoproteïne hemagglutinine (HA), dat verantwoordelijk is voor de hemagglutinatie en de aanhechting van het virus aan de gastheercel, en het fusieglycoproteïne (F), dat
- 10 membraanfusie veroorzaakt tussen het virus en de geïnfecteerde cel of tussen de geïnfecteerde en de aangrenzende niet-geïnfecteerde cellen (Graves et al., 1978). De volgorde van de genen in het MV-genoom is afgeleid door Richardson et al. (1985) en Dowling et al. (1986). De nucleotidensequentie van het MVHA-gen en het MVF-gen is bepaald door respectievelijk Alkhatib en Briedis (1986) en Richardson et al. (1986).

- 15 CDV en MV vertonen een structurele gelijkenis en zijn serologisch nauw verwant. Immunoprecipitatie studies hebben aangetoond dat antiserum tegen MV alle eiwitten van CDV (P, NP, F, HA en M) zal precipiteren. Daarentegen zal antiserum tegen CDV alle MV-eiwitten precipiteren behalve het HA glycoproteïne (Hall et al., 1980; Orvell et al., 1980; Stephenson et al., 1979). In het licht van deze nauwe serologische verwantschap is eerder aangetoond dat vaccinatie met MV bescherming tegen een provocatie met CDV in
- 20 honden zal uitlokken (Gillespie et al., 1960; Moura et al., 1961; Warren et al., 1960). Neutraliserende antilichamen tegen CDV zijn vermeld in menselijke anti-MV sera (Adams et al., 1957; Imagawa et al., 1960; Karzon, 1955; Karzon, 1962) maar neutraliserende antilichamen tegen MV zijn niet gevonden in anti-CDV sera van honden (Delay et al., 1965; Karzon, 1962; Roberts, 1965).

- HA- en F-genen van MV zijn tot expressie gebracht in verschillende virale vectoren waaronder vacciniavirus (Drillien et al., 1988; Wild et al., 1991), vogelpokkenvirus (Spehner et al., 1990; Wild et al., 1990), adenovirus (Alkhatib et al., 1990) en baculovirus (Vialard et al., 1990). In deze studies werden authentieke MV-eiwitten tot expressie gebracht die werkzaam waren in hemagglutinatie (Vialard et al., 1990), hemolyse (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al., 1990) of celfusie (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al., 1990; Wild et al., 1991) bepalingen. Bij insertie in een vacciniavirusvector was de expressie van ofwel het HA ofwel het
- 30 F-eiwit in staat tot het uitlokken van een beschermende immuunrespons in muizen tegen MV-encefalitis (Drillien et al., 1988). Evenzo lokte de expressie van het F-eiwit in een vogelpokkenvirusvector beschermende immuniteit uit tegen MV-encefalitis in muizen (Wild et al., 1990). Er werden geen studies naar bescherming vermeld met andere vectoren.

- Europese octrooiaanvraag 0.314.569 heeft betrekking op de expressie van een MV-gen in vogelpokken.
- 35 Perkus et al. (1990) beschreef onlangs de definitie van twee unieke genen voor het gastheerbereik in vacciniavirus. Deze genen coderen voor gastheerbereikfuncties die de replicatie van vacciniavirus mogelijk maken op verschillende celsubstraten in vitro. De genen coderen voor gastheerbereikfuncties voor replicatie van vacciniavirus in menselijke cellen alsook cellen die afkomstig zijn van het konijn en het varken. Definitie van deze genen maakt de ontwikkeling mogelijk van een vacciniavirusvector die, terwijl hij
- 40 nog steeds belangrijke vreemde genen tot expressie brengt, ernstig beperkt zou zijn in zijn vermogen te repliceren in bepaalde cellen. Dit zou de veiligheidskenmerken van vacciniavirusrecombinanten in hoge mate verbeteren.

- Er is een verzwakte vector ontwikkeld door de achtereenvolgende deletie van zes niet-essentiële gebieden uit de Copenhagenstam van vacciniavirus. Van deze gebieden is bekend dat ze coderen door
- 45 eiwitten die een rol kunnen spelen in de virale virulentie. De verwijderde gebieden zijn het tk-gen, het hemorrhagische gen, het A-type inclusiegen, het hemagglutinine-gen en het gen dat codeert voor de grote subunit van het ribonucleotidereductase alsook de eerder gedefinieerde sequenties van C7L tot en met K1L (Perkus et al., 1990). De sequenties en locaties op het genoom van deze genen in de Copenhagenstam van het vacciniavirus zijn eerder gedefinieerd (Goebel et al., 1990 a, b). De resulterende verzwakte vaccinia
- 50 stam wordt aangeduid als NYVAC.

- De technologie van het genereren van vacciniavirusrecombinanten is onlangs uitgebreid tot andere leden van de familie van pokkenvirussen die een beperkter gastheerbereik hebben. Het vogelpokkenvirus is gemanipuleerd tot een recombinantvirus dat het rabies G-gen tot expressie brengt (Taylor et al., 1988b). Dit recombinante virus wordt ook beschreven in PCT publicatie nummer WO89/03429. Bij inoculatie van de
- 55 recombinant in een aantal niet-vogel-species wordt een immuunrespons tegen rabies uitgelokt die in muizen, katten en honden bescherming biedt tegen een dodelijke provocatie met rabies.

Zowel hondenziekte als mazelen worden op het moment bestreden met behulp van levende verzwakte

vaccins (Fenner et al., 1987; Preblud et al., 1988). Voor de bestrijding van CDV wordt immunisering aanbevolen met behulp van een levend verzwakt vaccin op een leeftijd van 8 weken en nogmaals op een leeftijd van 12-16 weken. Hoewel de immuniteit tegen CDV levenslang is, wordt, vanwege de in hoge mate infectieuze aard van de verwekker en de ernst van de ziekte, een jaarlijkse revaccinatie gewoonlijk

5 aanbevolen.

Eén probleem met het huidige beleid van continue revaccinatie is dat CDV-immune moeders neutraliserend antilichaam doorgeven aan hun nakomelingen in het colostrum. Het is moeilijk vast te stellen wanneer het gehalte aan deze antilichamen zover is afgenomen dat de jongen gevaccineerd kunnen worden.

Hierdoor blijft een periode over waarin de jongen vatbaar kunnen zijn voor CDV-infectie. Gebruik van een recombinaant vaccin dat alleen de glycoproteïnen van het mazelenvirus tot expressie brengt, kan voorzien in een manier om de remmende effecten van het van de moeder afkomstige antilichaam teniet te doen en vaccinatie van pasgeborenen mogelijk te maken. In feite is aangetoond dat CDV-specifieke antilichamen in jongen die werden gezoogd door CDV-immune moeders, de ontwikkeling van MV-specifieke antilichamen niet verhinderden bij inoculatie met een MV-vaccin (Baker et al., 1966).

Andere beperkingen van de gewoonlijk gebruikte gemodificeerde levende CDV-vaccins zijn eerder beschreven (Tizard, 1990) en zijn gekoppeld aan het vermogen van deze vaccinstammen te repliceren in de gevaccineerde dieren. Deze schadelijke effecten zijn het meest opmerkelijk wanneer de CDV-vaccinstam gelijktijdig geïnoculeerd wordt met honden-adenovirus 1 en 2 in honden, wat resulteert in immunosuppressie, trombocytopenie en encefalitis (Bestetti et al., 1978; Hartley, 1974; Phillips et al., 1989). Het is ook gebleken dat de gemodificeerde levende CDV-vaccins distemper induceren in andere diersoorten waaronder vossen, rolstaartberen, fretten en de panda (Bush et al., 1976; Carpenter et al., 1976; Kazacos et al., 1981). Daarom zou bij gebruik van een recombinaant CDV-vaccin de voortdurende introductie van gemodificeerd CDV in de omgeving en potentiële met het vaccin verbonden en door het vaccin geïnduceerde complicaties die opgetreden zijn bij gebruik van de gebruikelijke CDV-vaccins, geëlimineerd worden.

Het gebruik van pokkenvirusvectoren kan ook voorzien in een wijze voor het ondervangen van het beschreven remmende effect dat antilichaam van de moeder heeft op vaccinatie met momenteel gebruikte levende verzwakte CDV-stammen in honden. Bij jongen die geboren zijn uit moeders die eerder op jonge leeftijd geïmmuniseerd zijn met een pokkenvirusrecombinant, kan de interferentie van CDV-specifiek antilichaam van de moeder voorkomen worden. Bovendien biedt het vermogen van zowel vacciniavirus- als kanariepokkenvirusvectoren met daarin HA- en F-genen van MV tot het opwekken van deze respons en het ontbreken van serologische kruisreactiviteit tussen de twee pokkenvirussen een volgend voordeel, in die zin, dat de ene vector vroeg in het leven van het jong gebruikt zou kunnen worden en de andere later, om CDV-specifieke immuniteit te verhogen. Hierdoor wordt het vrijkomen van levende verzwakte CDV-stammen in de omgeving voorkomen, een gebeurtenis die gekoppeld is aan het optreden van door vaccin geïnduceerde en met vaccin verbonden complicaties (Tizard, 1990).

Het is dus duidelijk dat de beschikbaarheid van een Morbillivirus-recombinant pokkenvirus, en van vaccins die beschermende immuniteit bieden tegen Morbillivirusinfecties, een zeer wenselijke vooruitgang zou betekenen ten opzichte van de huidige stand der techniek.

De uitvinding heeft betrekking op een recombinaant vacciniavirus, dat DNA uit mazelenvirus bevat dat codeert voor ten minste één van mazelenvirus hemagglutinine-glycoproteïne en mazelenvirus fusieglycoproteïne in een niet-essentieel gebied van het vacciniavirusgenoom. Een dergelijk recombinaant vacciniavirus wordt beschreven in de Europese octrooiaanvraag EP 0.305.229 A1.

Een doelstelling van de uitvinding is het verschaffen van een recombinaant vacciniavirus, zoals omschreven in de voorgaande alinea, dat bijzonder sterk verzwakt is en daardoor slechts een lage pathogeniteit heeft, hetgeen van belang is voor de praktische toepasbaarheid van een dergelijk virus.

Gevonden is dat de bovengenoemde doelstelling kan worden bereikt met een recombinaant vacciniavirus, zoals omschreven in de alinea voorafgaande aan de voorgaande alinea, doordoor gekenmerkt dat de open leesframes voor het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gebied, het A type inclusiegebied, het hemagglutinine-gen, het gastheerbereikgenengebied en de grote subeenheid van ribonucleotidereductase uit het vacciniavirus verwijderd zijn.

Dienovereenkomstig heeft de uitvinding betrekking op een recombinaant vacciniavirus, dat DNA uit mazelenvirus bevat dat codeert voor ten minste één van mazelenvirus hemagglutinine-glycoproteïne en mazelenvirus fusieglycoproteïne in een niet-essentieel gebied van het vacciniavirusgenoom, daardoor gekenmerkt dat de open leesframes voor het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gebied, het A type inclusiegebied, het hemagglutinine-gen, het gastheerbereikgenengebied en de grote subeenheid van ribonucleotidereductase uit het vacciniavirus verwijderd zijn.

Er wordt nog op gewezen dat volgens het artikel van Drillien et al. uit 1988, dat reeds hiervoor is

aangehaald en besproken, gebruik wordt gemaakt van een TK vacciniavirus, dat wil zeggen van een vacciniavirus waarin uitsluitend het thymidinekinase-gen geïnactiveerd is.

Het heeft de voorkeur dat in het recombinante vacciniavirus volgens de uitvinding de open leesframes voor het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gebied, het A type inclusiegebied, het hemagglutinine-
5 gen, het gastheerbereikgenengebied respectievelijk de grote subeenheid van ribonucleotidereductase, de open leesframes aangeduid met J2R, B13R+B14R, A26L, A56R, C7L-K1L respectievelijk I4L zijn.

Verder heeft het de voorkeur dat in het recombinante vacciniavirus volgens de uitvinding het DNA uit mazelenvirus DNA uit de Edmonston stam uit mazelenvirus is en onder de transcriptionele controle van een H6 promotor staat.

- 10 Ook heeft het de voorkeur dat het recombinante vacciniavirus volgens de uitvinding het vacciniavirus NYVAC-MV (vP913) is, en dat het DNA uit mazelenvirus uit het recombinante vacciniavirus volgens de uitvinding codeert voor zowel mazelenvirus hemagglutinine-glycoproteïne als mazelenvirus fusieglycoproteïne.

Verder is het een doelstelling van de uitvinding een vaccin te verschaffen dat in staat is tot het opwekken
15 van mazelenvirus neutraliserende antilichamen, hemagglutinatieremmende antilichamen en beschermende immuniteit tegen mazelenvirusinfectie en een lethale provocatie met mazelenvirus, waarbij in het bijzonder voorzien wordt in kruisbescherming van honden tegen hondenziekte met behulp van een mazelenvirus-recombinant vacciniavirusvaccin. In de onderhavige beschrijving wordt in plaats van de term "hondenziekte" ook wel de term "honden-distemper" gebruikt.

- 20 Een vaccin voor het induceren van een immunologische respons in een gastheerdier, welk vaccin een drager en een recombinant vacciniavirus bevat, wordt beschreven in de Europese octrooiaanvraag EP 0.305.229 A1.

Dienovereenkomstig heeft de uitvinding eveneens betrekking op een vaccin voor het induceren van een immunologische respons in een gastheerdier, welk vaccin een drager en een recombinant vacciniavirus
25 bevat, daardoor gekenmerkt dat het recombinante vacciniavirus het recombinante vacciniavirus volgens de uitvinding, zoals hiervoor omschreven, is. Het is gunstig als meerdere glycoproteïnen van mazelenvirus tegelijkertijd tot expressie komen in het gastheerdier.

- Het recombinante virus respectievelijk het vaccin volgens de uitvinding kunnen op voordelige wijze in het bijzonder worden toegepast als profylactisch middel of geneesmiddel ter bescherming van honden tegen
30 hondeziekte door inoculering van de honden met dat recombinante vacciniavirus respectievelijk vaccin.

De onderhavige uitvinding zal beter begrepen worden aan de hand van de begeleidende tekeningen waarin:

- figuur 1 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSPM2LHAVC dat gebruikt is voor het verkrijgen van recombinant vacciniavirus vP557 dat het MV-hemagglutinine-gen tot
35 expressie brengt;

figuur 2 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSPMFVC dat gebruikt is voor het verkrijgen van recombinant vacciniavirus vP455 dat het MV-fusie-gen tot expressie brengt;

- figuur 3 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pRW843 dat gebruikt is voor het verkrijgen van recombinant vacciniavirus vP756 dat het MV-hemagglutinine-gen tot expressie
40 brengt;

figuur 4 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pRW850 dat gebruikt is voor het verkrijgen van recombinant vacciniavirus vP800 dat het MV-fusie-gen tot expressie brengt;

figuur 5 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSD460 voor de deletie van het thymidinekinase-gen en de vorming van recombinant vacciniavirus vP410;

- 45 figuur 6 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSD486 voor de deletie van het hemorrhagische gebied en de vorming van recombinant vacciniavirus vP553;

figuur 7 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pMP494 voor de deletie van het ATI-gebied en de vorming van recombinant vacciniavirus vP618;

- figuur 8 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSD467 voor de deletie
50 van het hemagglutinine-gen en de vorming van recombinant vacciniavirus vP723;

figuur 9 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pMPCSK1 voor de deletie van genencluster [C7L K1L] en de vorming van recombinant vacciniavirus vP804;

figuur 10 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pSD548 voor de deletie van de grote subunit van ribonucleotidereductase en de vorming van recombinant vacciniavirus vP866

- 55 (NYVAC); en

figuur 11 schematisch een werkwijze laat zien voor de constructie van plasmide pRW857 dat gebruikt is voor het verkrijgen van recombinant NYVAC virus vP913 dat de MV-hemagglutinine- en -fusiegenen

tegelijktijd tot expressie brengt.

De onderhavige uitvinding en de vele voordelen ervan zullen beter begrepen worden aan de hand van de volgende ter illustratie gegeven voorbeelden.

5

Voorbeeld 1 – VORMING VAN VACCINIAVIRUSRECOMBINANTEN MET HET MAZELEN-HEMAGGLUTININE-GEN

Het bij de productie van beide recombinanten gebruikte ontvangende virus was de Copenhagenstam van vacciniavirus, waaruit het thymidinekinase-gen was verwijderd. Het kweken van alle virussen en het

10 bepalen van de titer geschiedde op monolagen van Vero cellen.

De vroege late vacciniavirus H6 promotor (Rosel et al., 1986; Taylor et al., 1988a,b) werd geconstrueerd door annealing van vier overlappende oligonucleotiden, H6SYN A-D. De resulterende H6 sequentie is als volgt:

Vacciniavirus H6 Promotor (SEO ID NO:1/SEO ID NO:2) :

15

HindIII

5'AGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGG
GTTGT

AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACA

GTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTT

20

AAGTT

CAATTTAACTTTGCTCTTTATTAGTATTTAATAAAGTA.ATAGCGCTATAGGCAA

TTCAA

TGTATCGTAC-3'

ACATAGCATGAGCT-5'

25

XhoI

Met verwijzing nu naar figuur 1 werden de "annealed" H6SYN oligonucleotiden geligeerd in pMP2LVC dat geknipt was met XhoI/HindIII, wat het plasmide pSP131 opleverde. Het plasmide pMP2LVC bevat de meest linkse 0,4 kbp van het HindIII K gebied van het vacciniavirus (Copenhagenstam) in pUC18. De constructie van pMP2LVC werd als volgt uitgevoerd: een HindIII/Sall-fragment van 0,4 kbp van het HindIII K gebied werd geïsoleerd en van stompe uiteinden voorzien met het Klenow fragment van het E. coli DNA-polymerase in aanwezigheid van 2 mM dNTPs. Dit fragment werd geïntereerd in pUC18 dat geknipt was met PvuII. Het resulterende plasmide werd pMP2VC genoemd. Het plasmide pMP2VC werd gelineari- seerd met SspI. Synthetische oligonucleotiden

30

MPSYN52 (SEO ID NO:3) (5'-ATTATTTTATAAGCTTGGA-

35

TCCCTCGAGGGTACCCCGGGGAGCTCGAAT TCT-3') en MPSYN53 (SEQ ID
NO:4) (5'-

AGAATTCGAGCTCCCGGGGGTACCCTCGAGGGATCCAAGCTTATAAAAATAAT-3')

werden "annealed" en geïntereerd in de meest links gelegen van de twee SspI-plaatsen die gelokaliseerd zijn in de vacciniavirussequenties. Het resulterende plasmide pMP2LVC bevat een meervoudig klonerings- gebied in het intergene gebied tussen de K1L en K2L open leesframes.

40

"Annealed" oligonucleotiden 3P1 (SEQ ID NO:5) (5'-GGGAAG-ATGGAACCAATCGCAGATAG-3') en 3P2 (SEQ ID NO:6) (5'-AATTCTATCTG-CGATTGGGGTTCATCTTCCC-3') die de uiterste 3'sequenties van het HA-gen en een plakkend EcoRI-uiteinde bevatten, werden geligeerd aan een XhoI/SmaI-fragment van pMH22 van 1,8 kbp dat de rest van het HA-gen bevat, en pSP131 dat geknipt was met XhoI en EcoRI.

45

Het resulterende plasmide werd pSPMHA11 genoemd. Het plasmide pMH22 werd afgeleid van een cDNA-kloon van volledige lengte van het mazelen-HA-gen door vorming van een XhoI-plaats bij het ATG initiatiecodon (Alkhatib et al., 1986).

Een HindIII/EcoRI-fragment van 1,9 kbp van pSPMHA11 met daarop het mazelen-HA-gen werd geïsoleerd en van stompe uiteinden voorzien met het Klenow fragment van het E. coli DNA-polymerase in aanwezigheid van 2 mM dNTPs. Het geïsoleerde fragment werd geïntereerd in pMP409DVC (Guo et al., 1989) dat geknipt was met BglII en van stompe uiteinden voorzien door behandeling met "mung bean" nucleas. Insertie in deze vector leverde het plasmide pSPMHA41 op. De XhoI-plaats tussen de H6 promotor en het initiatiecodon van het HA-gen werd verwijderd met behulp van oligonucleotide-gestuurde mutagenese door het breken van de dubbele streng (Mandecki, 1982) met behulp van oligonucleotide

55

HAXHOD (SEQ ID NO:7) (5'-ATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCACCACAACGAGACCGGAT-3'). Met deze werkwijze werd plasmide pSPM2LHAVC gevormd. Insertieplasmide pSPM2LHAVC werd gebruikt in in vitro recombinatieexperimenten met vacciniavirus vP458 als het ontvangende virus voor de vorming van

recombinant vP557. vP458 bevat het E. coli lac Z gen in de M2L insertieplaats van vP410. Deze vacciniavirusrecombinant bevat het mazelen-HA-gen in de M2L locus van het genoom, waar het lac Z gen vervangt.

5 Voorbeeld 2 – VORMING VAN VACCINIAVIRUSRECOMBINANTEN MET HET MAZELEN-FUSIE-GEN

- Met verwijzing nu naar figuur 2 werden "annealed" oligonucleotiden 3PA (SEQ ID NO:8) (5' CCTAAAGCCTGATCTTACGGGAACATCAAATCCTAT-GTAAGGTCGCTCTGATTTTTATCG GCCGA-3') en 3PB (SEQ ID NO:9) (5'-AGCTTCGGCCGATAAAAAATCAGAGCGACCTTACATAGGATTTTGATGTTCCC GTAAG-ATCAGGCTTTAGG-3') met daarop het 3'-uiteinde van het mazelen-fusiegen, een vroeg transcriptieterminatiesignaal van vacciniavirus (Yuen et al., 1987) en EagI- en HindIII-uiteinden geligeerd aan een Sall/HaeIII-fragment van 1 kbp van pCRF2 (verkregen van C. Richardson, National Research Council of Canada (Biotechnology Institute), Montreal, Canada H3A 1A1) en pUC8 dat geknipt was met Sall en HindIII. Het resulterende plasmide pMF3PR14 bevat het 3'-uiteinde van het fragment van 1 kbp van het mazelen-fusie-gen.
- 15 "Annealed" oligonucleotiden 5PA (SEQ ID NO:10) (5' GGGATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTC-3' en 5PB (SEQ ID NO:11) (5' -ATGGCAGAGACGTTACCTTGAGACCCATCCC-3') met een 5'-SmaI-plaats en een 3'-BstXI-plaats werden geligeerd aan een BstXI/Sall-fragment van 820 bp van pCRF2 en pUC8 dat geknipt was met SmaI en Sall. Het resulterende plasmide pSPMF5P16 bevat het 5' -deel van het mazelen-fusiegen. Het SmaI/Sall-fragment van 820 bp van pSPMF5P16 en het Sall/EagI-fragment van 1 kbp van pMF3PR14 werden geligeerd in pTP15 dat geknipt was met SmaI en EagI. Het plasmide pTP15 (Guo et al., 1989) bevat de vroege/late H6 promotor van vacciniavirus, geflankeerd door sequenties van de HA-locus van het genoom van vacciniavirus (Copenhagenstam). Het resulterende plasmide met het mazelen-fusiegen aan de 3'-kant geplaatst naast de H6 promotor binnen het HA-insertieplasmide werd pSPHMF7 genoemd.
- 25 Oligonucleotide-gestuurde mutagenese werd uitgevoerd op pSPHMF7. Eerst werd een in vitro mutagenesereactie (Mandecki, 1982) uitgevoerd voor het vormen van een precieze ATG:ATG koppeling van de H6 promotor met het mazelenfusiegen door de SmaI-plaats te verwijderen met behulp van het oligonucleotide SPMAD (SEQ ID NO:12) (5'-TATCCGTTAAGT-TTGTATGGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3'). Dit resulteerde in de vorming van pSPMF75M20. Vervolgens werd de BglII-plaats aan het 5'-uiteinde van de H6
- 30 promotor verwijderd met behulp van oligonucleotide SPBGLD (SEQ ID NO:13) (5'-AATAAAT-CACTTTTATACTAATTCTTTATTCTATACTTAAAAAGT-3') volgens een bekende werkwijze (Mandecki, 1982). Het resulterende plasmide werd pSPMFVC genoemd. Dit plasmide werd gebruikt in in vitro recombinatie-experimenten met vacciniavirus vP410 als ontvangend virus om vP455 te vormen.

35 Voorbeeld 3 – IMMUNOPRECIPITATIEANALYSE

- Teneinde vast te stellen dat recombinanten vP455 en vP557 authentieke eiwitten tot expressie brachten, werden immunoprecipitatie-experimenten uitgevoerd in wezen zoals beschreven (Taylor et al., 1990). In het kort werden monolagen van Vero cellen geïnfecteerd met 10 pfu per cel met ofwel oudervirus ofwel recombinantvirus in aanwezigheid van ³⁵S-methionine. Het fusie-eiwit werd specifiek geprecipiteerd uit het
- 40 lysaat van geïnfecteerde cellen met behulp van een konijne-antiserum dat gericht was tegen een carboxy-eindstandig fusiepeptide. Het hemagglutinine-eiwit werd specifiek geprecipiteerd uit het lysaat van geïnfecteerde cellen met behulp van een polykonaal monospecifiek anti-hemagglutinineserum.

- Met betrekking tot de immunoprecipitatie met behulp van een fusiespecifiek serum werden geen radioactief gemerkte producten gedetecteerd in niet-geïnfecteerde Vero cellen, met oudervirus geïnfecteerde
- 45 Vero cellen, of cellen die geïnfecteerd waren met de HA-recombinant vP557. In cellen die geïnfecteerd waren met de fusiorecombinant vP455 werden de fusieprecursor F₀ met een molecuulgewicht van ongeveer 60 kd en de twee splitsingsproducten F₁ en F₂ met molecuulgewichten van 44 kd en 23 kd gedetecteerd. Evenzo werden, met betrekking tot de immunoprecipitatie van de geglycosyleerde vorm van het HA-eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 75-77 kd, geen producten gedetecteerd in niet-
- 50 geïnfecteerde Vero cellen, met oudervirus geïnfecteerde cellen, of met vP455 geïnfecteerde Vero cellen. Bovendien gaven immunofluorescentiestudies aan dat beide eiwitten tot expressie kwamen op het oppervlak van de geïnfecteerde cel.

Voorbeeld 4 – CELFUSIE-EXPERIMENTEN

- 55 Een kenmerk van de cytopathogeniteit van Morbillivirus is de vorming van syncytia die ontstaan door fusie van geïnfecteerde cellen met omringende niet-geïnfecteerde cellen, gevolgd door migratie van de nuclei naar het centrum van het syncytium (Norrbj et al., 1982). Het is gebleken dat dit een belangrijke

methode van virale verspreiding is, die voor Paramyxovirussen kan optreden in aanwezigheid van hemagglutinine-specifiek antilichaam (Merz et al., 1980). Dit vermogen is in analogie met andere Paramyxovirussen toegeschreven aan het amino-uiteinde van het F1 peptide (Choppin et al., 1981; Novick et al., 1988; Paterson et al., 1987).

- 5 Teneinde vast te stellen dat de mazelen-eiwitten die tot expressie werden gebracht in vacciniavirus functioneel actief waren, werden monolagen van Vero cellen geïnoculeerd met respectievelijk oudervirus of recombinante virussen vP455 en vP557 met 1 pfu per cel. Na 1 uur absorptie bij 37°C werd het inoculum verwijderd, het bovenstaande medium vervangen, en werden de schaaltes overnacht geïncubeerd bij 37°C. 18 Uur na infectie werden de platen onderzocht met een microscoop en gefotografeerd. Er was geen
- 10 celfusie-activiteit zichtbaar in Vero cellen die geïnoculeerd waren met oudervirus, vP455 of vP557. Wanneer echter vP455 en vP557 tegelijkertijd werden geïnoculeerd, werd efficiënte celfusie-activiteit waargenomen.

- Dit resultaat is onlangs bevestigd door Wild et al. (1991) die vaststelden dat voor syncytiumvorming in een verscheidenheid aan cellijnen die geïnfecteerd waren met mazelen/vacciniavirusrecombinanten expressie van zowel het fusieals het hemagglutinine-gen nodig was. Het resultaat is echter in tegenstelling met een eerdere vermelding (Alkhatib, 1990) waarin celfusie beschreven wordt in 293 cellen die geïnfecteerd waren met hoge multipliciteiten van een adenovirus recombinant die het mazelen-fusie-eiwit tot expressie brengt. Evenzo is vermeld (Vialard et al., 1990) dat celfusie werd waargenomen in insectencellen die geïnfecteerd waren met een baculovirus recombinant die het mazelen-fusie-eiwit tot expressie bracht, maar alleen bij incubatie bij pH 5,8. In geen van deze gevallen werd de fusie-activiteit verhoogd door
- 20 co-infectie met de betreffende recombinant met expressie van het mazelen-hemagglutinine-eiwit. Variabelen die betrokken kunnen zijn bij het fusieproces zijn het celtype (Giraudon et al., 1984), pH van het medium (Vialard et al., 1990) en expressieniveau van het fusie-eiwit (Norrby et al., 1982).

Voorbeeld 5 – SEROLOGISCHE TESTS

- 25 De techniek voor het testen van virus neutraliserend (VN) antilichaam werd eerder in detail beschreven (Appel et al., 1973). Het testen op CDV-VN antilichaamtiter werd gedaan in Vero cellen met de aangepaste Onderstepoortstam van CDV. Het testen op MV-VN antilichaamtiter werd gedaan in Vero cellen met de aangepaste Edmonston stam van MV. De resultaten van de serologische tests worden getoond in tabel 1.
- Honden die geïmmuniseerd waren zoals beschreven in voorbeeld 6 met ofwel het vaccinia oudervirus of
- 30 vP455 met expressie van het mazelen-fusie-eiwit, ontwikkelden geen neutraliserend antilichaam tegen MV. Honden die geïmmuniseerd waren met ofwel vP557 met expressie van het HA-eiwit ofwel gelijktijdig geïnoculeerd waren met beide recombinanten vP455 en vP557, ontwikkelden neutraliserende antilichamen na 1 inoculatie. Antilichaamgehalten waren equivalent aan die welke geïnduceerd worden door inoculatie met de verzwakte Edmonston stam van MV.

35

TABEL 1
Mazelenvirus neutraliserende antilichaamtiter in respons op vaccinatie

		Dagen na vaccinatie						
	Immunisatie	Hond No.	0 ^a	7	14	21 ^b	28	35 ^c
40	Vacc.	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
45	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
50	MV	4/14				<1,0		2,9
		4/15				<1,0		3,2

a) Tijdstip van de eerste immunisatie

- 55 b) Tijdstip van de tweede immunisatie (eerste immunisatie met MV)

c) Tijdstip van de provocatie

d) Titer, uitgedrukt als log₁₀ van de laatste antilichaamverduunning die volledige neutralisatie van de infectiviteit laat zien in een microtiter

neutralisatietest zoals beschreven door Appel et al. (1973).

Voorbeeld 6 – BESCHERMINGSSTUDIES BIJ DIEREN

- Teneinde vast te stellen of expressie van de mazelenvirus-eiwitten in honden die geïnoculeerd waren met de recombinanten voldoende was om een beschermende immuunrespons te induceren tegen CDV-provocatie, werden 14 10 weken oude specifiek pathogeen-vrije beagles bestudeerd. Bloedmonsters werden genomen bij aanvang van het experiment en herhaaldelijk daarna. Vier groepen met twee honden per groep werden geïmmuniseerd met twee injecties met een tussentijd van drie weken. De eerste groep kreeg alleen vacciniavirus. De tweede groep kreeg vacciniavirus met een insertie voor het F-eiwit van mazelenvirus (vP455). De derde groep kreeg vacciniavirus met een insertie voor het HA-antigeen van MV (vP557) en de vierde groep kreeg een combinatie van twee en drie. Elke hond werd geïnoculeerd met ongeveer 4×10^8 pfu vacciniavirus in hoeveelheden van 1 ml (0,6 ml subcutaan en 0,4 ml intramusculair). Twee controlehonden kregen intramusculair 10^5 50% weefselkweek infectieuze doses (TCID₅₀) van de verzwakte Edmonston stam van MV (1 ml) en twee controlehonden kregen subcutaan 10^4 TCID₅₀ van de verzwakte Rockborn stam van CDV twee weken voor provocatie met virulent CDV. Twee controlehonden bleven niet-geïnoculeerd vóór provocatie.

- Alle honden werden twee weken na de laatste inoculatie geprovoceerd door intranasale inoculatie met 1 ml weefselkweekvloeistof met daarin 10^4 TCID₅₀ van de Snyder Hill stam van virulent CDV. De klinische reacties van de honden werden gevolgd door dagelijkse observatie en door registratie van de lichaamstemperatuur en door tweewekelijkse registratie van gewichtstoename of -verlies. Circulerende bloedlymfocyten werden geteld vóór provocatie en op de dagen 3, 5, 7 en 10 na provocatie (dpc). Isolatie van virus uit cellen van de "buffy coat" door samen te kweken met longmacrofagen van de hond (Appel et al., 1967) werd ondernomen op dpc 3, 5, 7 en 10. Bloedmonsters vóór serologisch tests werden afgenomen voor vaccinatie en met tussenpozen van een week tot het tijdstip van provocatie, en op dpc 7, 10 en 20. De resultaten van de provocatie worden getoond in tabel 2.

TABEL 2
Effecten van immunisatie op klinische symptomen na blootstelling van honden aan virulent CDV

Immunisatie	Hond No.	Depressie	Gewichts-verlies	Aantal dagen na inoculatie met virulent CDV			
				Verhoogde lichaams-temp.	Lymfopenia ^b	Virus-isolatie	dood
Vacc.	4/1	4-10 ^d	3-10	4, 5, 7, 10	7-10	3-7	10
	4/2	4-10 ^d	3-10	4, 5, 8-10	3-10	3-7	10
vP455	4/3	4-8	7-10	4, 5, 7-10	5, 7	5-7	—
	4/4	4-6	7-10	4-6	7	5-7	—
vP557	4/5	ND ^e	ND	6, 7	10	7	—
	4/6	ND	ND	ND	ND	ND	—
vP455 & vP557	4/7	ND	ND	7	7	7	—
	4/8	ND	7	6	ND	7	—
MV	4/14	ND	ND	ND	7	ND	—
CDV-Ro	4/15	ND	7	5	5	ND	—
	4/16	ND	ND	ND	ND	ND	—
	4/17	ND	ND	ND	ND	ND	—
Geen	4/18	6, 14-17 ^d	7-17	5, 7	13-17	10	17
	4/19	4-10 ^d	3-10	4, 5, 7	3, 7, 10	3-10	10

a) Hoger dan 39,5°C

b) Minder dan 2×10^3 lymfocyten per mm³

c) Geïsoleerd uit cellen van de "buffy coat" samen gekweekt met longmacrofagen van de hond

d) Hond raakte gedehydrateerd en werd uit zijn lijden verlost

e) Niet gedetecteerd

Niet-geïmmuniseerde controlehonden en met vaccinia oudervirus gevaccineerde honden ontwikkelden

klinische symptomen van ernstige ziekte en werden uit hun lijden verlost wanneer dehydratie evident was. Beide met vP455 geïmmuniseerde honden vertoonden enige symptomen van infectie met CDV waaronder gewichtsverlies, verhoogde lichaamstemperatuur en lymfopenie hoewel deze symptomen van kortere duur waren dan bij controlehonden. Desalniettemin overleefden beide honden een letale provocatie met CDV.

- 5 Honden die geïnoculeerd waren met vP557 of gelijktijdig geïnoculeerd met beide recombinanten vertoonden minimale symptomen van infectie en overleefden de provocatie. Honden die geïnoculeerd waren met ofwel de verzwakte Edmonston stam van MV ofwel de verzwakte Rockborn stam van CDV overleefden ook de provocatie met minimale ziekteverschijnselen.

10 Voorbeeld 7 – AANVULLENDE VACCINIA/MAZELNCONSTRUCTEN

Met verwijzing nu naar figuur 3 werd een tweede vacciniavirusrecombinant gevormd (vP756) die het mazelen HA-gen bevat in de tk-locus, met behulp van insertieplasmide pRW843. pRW843 werd geconstrueerd op de volgende manier. Uit pSPM2LHVC werd een EcoRV/SmaI-fragment van 1,8 kbp geïsoleerd dat de het meest aan de 3'-kant gelegen 24 bp van de H6 promotor bevat, gefuseerd in een precieze ATG:ATG

- 15 configuratie met het HA-gen dat de het meest aan de 3'-kant gelegen 26 bp mist. Dit fragment werd gebruikt om het EcoRV/SmaI-fragment van 1,8 kbp van pSPMHA11 te vervangen om zo pRW803 te vormen. Plasmide pRW803 bevat de complete H6 promotor, op exacte wijze gekoppeld aan het complete mazelen-HA-gen.

- 20 Bij de bevestiging van eerdere constructen met het mazelen-HA-gen was opgemerkt dat de sequentie voor codon 18 (CCC) verdwenen was bij vergelijking met de gepubliceerde sequentie (Alkhatib et al., 1986). De CCC-sequentie werd weer op zijn plaats gezet met oligonucleotide-mutagenese via de methode van Kunkel (Kunkel, 1985) met behulp van oligonucleotide RW117 (SEQ ID NO:14) (5'-GACTATCCTACTT-CCCTTGGGATGGGGTTATCTTTGTA-3').

Pro 18

- 25 Enkelstrengs-template werd afgeleid van plasmide pRW819 dat de H6/HA-cassette uit pRW803 bevat in pIB125 (IBI, New Haven, CT.). Het gemutageniseerde plasmide met daarin het ingevoegde (CCC) dat codeert voor een prolinerest bij codon 18, werd pRW820 genoemd. De sequentie tussen de HindIII- en XbaI-plaatsen van pRW820 werd bevestigd met nucleotidensequentie-analyse. De HindIII -plaats is gelegen aan de 5'-grens van de H6 promotor, terwijl de XbaI-plaats 230 bp stroomafwaarts van het initiatiecodon
- 30 van het HA-gen gelegen is. Een XbaI/EcoRI-fragment van 1,6 kbp van pRW803 met daarop de voor HA coderende sequenties stroomafwaarts van de XbaI-plaats en met het terminatiecodon werd gebruikt om het equivalente fragment van pRW820 te vervangen, wat resulteerde in de vorming van pRW837. De gemutageniseerde expressiecassette die zich bevindt in pRW837 werd verkregen door digestie met HindIII en EcoRI, van stompe uiteinden voorzien met behulp van het Klenow fragment van E.coli DNA-polymerase in
- 35 aanwezigheid van 2mM dNTPs, en geïnserteerd in de SmaI-plaats van pSD573VCVQ, wat pRW843 opleverde. Het plasmide pRW843 werd gebruikt in in vitro recombinatie experimenten met vP618 als het ontvangende virus en men verkreeg zo vP756. Oudervirus vP618 is een virus van de Copenhagen stam waaruit het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gen en het A-type inclusiegen verwijderd zijn. Met immunoprecipitatie-analyse is gebleken dat recombinant vP756 correcte expressie vertoont van een
- 40 hemagglutinine-glycoproteïne van ongeveer 75 kd.

- Met verwijzing naar figuur 4 werd een tweede vacciniavirus recombinant (vP800) die het mazelen-fusiegen herbergt in de ATI locus van het genoom, gevormd met behulp van insertieplasmide pRW850. Voor de constructie van pRW850 werden de volgende manipulaties uitgevoerd. Het plasmide pSPMF75M20 met daarop het mazelen-fusiegen in een precieze ATG:ATG configuratie gekoppeld aan de H6 promotor,
- 45 werd geknipt met NruI en EagI. Het fragment van 1,7 kbp met stompe uiteinden met daarop de 28 bp die het meest aan de 3'-kant van de H6 promotor liggen en het complete fusiegen werd geïsoleerd en geïnserteerd in pRW823 dat geknipt was met NruI en XbaI en van stompe uiteinden was voorzien. Het resulterende plasmide pRW841 bevat de H6 promotor gekoppeld aan het mazelen-fusiegen in de pIB125 plasmidevector (IBI, New Haven, CT.). De H6/mazelen-fusie-expressiecassette werd verkregen uit pRW841
- 50 door digestie met SmaI en het resulterende fragment van 1,8 kbp werd geïnserteerd in pSD494VC dat geknipt was met SmaI en zo verkreeg men pRW850. Het plasmide pRW850 werd in in vitro recombinatie experimenten gebruikt met vP618 als het ontvangende virus om zo vP800 te verkrijgen. Met immunoprecipitatie-analyse is gebleken dat recombinant vP800 een authentiek bewerkte fusie-glycoproteïne tot expressie brengt.

Voorbeeld 8 – BEPALING VAN MAZELEN NEUTRALISEREND ANTILI-CHAAM IN MET vP455 GEINOCULEERDE CAVIA'S EN KONIJNEN

Twee konijnen werden intradermaal geïnoculeerd op 5 plaatsen met een totaal van 1×10^8 pfu recombinant vP455 die het mazelen-fusie-eiwit tot expressie brengt. Beide konijnen kregen in week 12 een boosters met een identieke inoculatie. Seriele bloedmonsters werden verzameld en in week 14, twee weken na de booster, werden de konijnen getest op de aanwezigheid van neutraliserende antilichamen in het serum.

Vier cavia's werden subcutaan geïnoculeerd met elk 1×10^8 pfu recombinant vP455. Een identieke boosterinoculatie werd gegeven na 21 dagen. Seriele bloedmonsters werden verzameld.

De aanwezigheid van mazelenvirus neutraliserend antilichaam in serum werd bepaald met een microtiter-test (Appel et al., 1973) met 10 TCID₅₀ virus per microtiterputje. De resultaten worden getoond in tabel 3.

TABEL 3

Resultaten van mazelenvirus neutraliserende antilichamen in serum van met vP455 geïnoculeerde cavia's en konijnen

		Weken na inoculatie						
		0	2	3	4	5	7	14
20	Dier							
	Cavia							
	1	N.D. ^a	N.D.	N.D.-0,8 ^b	1,3-1, 3	1,3-1,5	1,3	N.T. ^c
	2	N.D.	N.D.	0,8-1,0	0,8-1,3	1,3-1,5	N.D.	N.T.
	3	N.D.	N.D.	N.D.-0,8	0,8-1,5	1,0-1,3	1,0	N.T.
25	6	N.D.	N.D.	0,8-0,8	0,8-0,8	1,0-1,3	1,0	N.T.
	Konijn							
	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

- 30 a) Niet detecteerbaar
b) Resultaten van twee bepalingen
c) Niet getest

Voorbeeld 9 – SEROLOGISCHE TESTS

35 Honden die geïnoculeerd waren zoals beschreven in voorbeeld 13 met de vaccinia/HA recombinant vP557, of die gelijktijdig geïnoculeerd waren met vP455 en vP557 ontwikkelden een significante hoeveelheid neutraliserend antilichaam in het serum tegen mazelenvirus na 1 inoculatie. De resultaten van de serologische tests worden getoond in tabel 4.

TABEL 4

Mazelenvirus neutraliserende antilichaamtitters (in log¹⁰)

		Dagen na vaccinatie						
45	Immunisatie	Hond No.	0 ^a	7	14	21 ^b	28	35 ^c
	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
50	Controle	9/13						<1,0
		9/14						<1,0
	CDV-Ro	9/15				<1,0	<1,0	<1,0

- a) Tijdstip van de eerste immunisatie
b) Tijdstip van de tweede immunisatie (eerste immunisatie met MV en CDV-Ro)
c) Tijdstip van provocatie
d) Bepaling van serum-neutralisatietiters bepaald op bekende wijze (Appel et al., 1973)

Voorbeeld 10 – BESCHERMINGSSTUDIES BIJ DIEREN

- Teneinde vast te stellen of vectoren met expressie van mazelenvirus eiwitten een beschermende immuunrespons tegen CDV-provocatie zouden induceren, werden 10 weken oude specifiek pathogeen-vrije beagles geïnoculeerd met recombinante virussen. Honden werden tegelijkertijd geïnoculeerd met twee subcutane injecties van 1×10^8 pfu van elke recombinant met tussenpozen van drie weken. Eén hond werd volgens hetzelfde schema geïnoculeerd met elk van de enkelvoudige vacciniavirusrecombinanten vP455 en vP557 en een combinatie van beide. Eén hond werd ook intramusculair geïnoculeerd met 1 dosis van 10^5 TCID₅₀ van de verzwakte Edmonston stam van MV. Eén hond werd subcutaan geïnoculeerd met 1 dosis van 10^4 TCID₅₀ van de verzwakte Rockborn stam van CDV. De honden werden twee weken na de laatste inoculatie geprovoceerd via intranasale inoculatie met een letale dosis van 10^4 TCID₅₀ van de virulente Snyder Hill stam van CDV. Klinische reacties van de honden werden dagelijks gevolgd. De resultaten worden getoond in tabel 5.

TABEL 5

Effecten van immunisatie op klinische symptomen na blootstelling van honden aan virulent CDV

Immunisatie	Hond No.	Depressie	Aantal dagen na inoculatie met virulent CDV			
			Gewichts-verlies	Verhoogde lichaams-temp.	Lymfopenie ^b	Virusisolatie
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 & vP 557	9/11	ND	3-10	ND	5-7	ND
MV	9/12	ND	7-10	ND	5	5
Geen	9/13	4-10 ^d	3-10	4-6	5-10	5-10
	9/14	4-10 ^d	3-10	4-5	3-10	5-7
CDV-Ro	9/15	ND	ND	ND	ND	ND

a) Hoger dan 39,5°C

b) Minder dan 2×10^3 lymfocyten per mm³

c) Geïsoleerd uit cellen van de "buffy coat" samengekweekt met longmacrofagen van de hond op bekende wijze (Appel et al., 1967)

d) Hond raakte gedehydrateerd en werd uit zijn lijden verlost

e) niet gedetecteerd

- Bij geen van de honden werden ongunstige reacties op de vaccinatie opgemerkt tijdens het experiment. De twee niet-geïmmuniseerde controlehonden vertoonden ernstige ziekte na provocatie met virulent CDV. Deze honden raakten gedeprimeerd, vertoonden hoge lichaamstemperatuur, gewichtsverlies, lymfopenie en ernstige dehydratie. Met CDV-Rockborn geïmmuniseerde honden ontwikkelden in het serum neutraliserende antilichamen tegen CDV maar niet tegen MV vóór de provocatie en overleefden de provocatie zonder symptomen. Met verzwakt MV geïmmuniseerde honden ontwikkelden in het serum neutraliserende antilichamen tegen MV maar niet tegen CDV vóór de provocatie, en overleefden de provocatie met lichte verschijnselen van infectie. Honden die geïnoculeerd waren met vP557 of die gelijktijdig geïnoculeerd waren met vP455 en vP557 ontwikkelden in het serum significante hoeveelheden neutraliserend antilichaam tegen MV na 1 inoculatie en overleefden provocatie met slechts lichte verschijnselen van infectie.

Voorbeeld 11 – VERZWAKTE VACCINIA VACCINSTAM NYVAC

- Om een nieuwe vaccinia-vaccinstam te ontwikkelen werd de Copenhagen vaccinstam van vacciniavirus gemodificeerd door de deletie van zes niet-essentiële gebieden van het genoom die coderen voor bekende of potentiële virulentiefactoren. De achtereenvolgende deleties worden hieronder in detail beschreven. Alle aanduidingen van vaccinia restrictiefragmenten, open leesframes en nucleotideposities zijn gebaseerd op de door Goebel et al. (1990a,b) vermelde terminologie.

De deletie-loci werden ook geconstrueerd als ontvanger-loci voor de insertie van vreemde genen.

- De achtereenvolgens door deletie verwijderde gebieden in NYVAC worden hieronder gegeven. Ook gegeven worden de afkortingen en aanduidingen van de open leesframes voor de verwijderde gebieden (Goebel et al., 1990a,b) en de aanduiding van de vacciniarecombinant (vP) die alle deleties tot en met de gespecificeerde deletie bevat:

- (1) thymidinekinase-gen (TK; J2R) vP410;
 (2) hemorrhagisch gebied (u; B13R+B14R) vP553;
 (3) A type "inclusion body" gebied (AT1; A26L) vP618;
 (4) hemagglutinine-gen (HA; A56R) vP723;
 5 (5) gastheerbereikgenengebied (C7L-K1L) vP804; en
 (6) grote subunit van ribonucleotidereductase (I4L) vP866 (NYVAC).

DNA-klonering en -synthese

- Plasmiden werden geconstrueerd, gescreend en gekweekt met standaardwerkwijzen (Maniatis et al., 1986; Perkus et al., 1985; Piccini et al., 1987). Restrictieendonucleasen werden verkregen van GIBCO/BRL, 10 Gaithersburg, MD, New England Biolabs, Beverly, MA; en Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN. Klenow fragment van E. coli polymerase werd verkregen van Boehringer Mannheim Biochemicals. BAL-31 exonuclease en faag T4 DNA-ligase werden verkregen van New England Biolabs. De reagentia werden gebruikt volgens de specificatie van de diverse leveranciers.

- Synthetische oligodeoxyribonucleotiden werden bereid op een Biosearch 8750 of Applied Biosystems 15 380B DNA synthesizer zoals eerder beschreven (Perkus et al., 1989). DNA-sequencing werd uitgevoerd met de dideoxy-ketenbeëindigingsmethode (Sanger et al., 1977) met behulp van Sequenase (Tabor et al., 1987) zoals eerder beschreven (Guo et al., 1989). DNA-amplificatie met de polymerase-kettingreactie (PCR) voor het verifiëren van de sequentie (Engelke et al., 1988) werd uitgevoerd met behulp van op maat gesynthe- 20 tiseerde oligonucleotideprimers en GeneAmp DNA amplification Reagent Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) in een geautomatiseerde Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler. Overtollige DNA-sequenties werden uit plasmiden verwijderd door digestie met restrictie-endonuclease, gevolgd door beperkte digestie met BAL-31 exonuclease en mutagenese (Mandecki, 1986) met behulp van synthetische oligonucleotiden.

Cellen, virus en transfectie

- De oorsprong en kweekomstandigheden van de Copenhagenstam van vacciniavirus zijn eerder 25 beschreven (Guo et al., 1989). Het genereren van recombinant virus door recombinatie, in situ hybridisatie van nitrocellulosefilters en het screenen op Beta-galactosidase-activiteit zijn zoals eerder beschreven (Panicali et al., 1982; Perkus et al., 1989).

Constructie van plasmide pSD460 voor deletie van thymidinekinase-gen (J2R)

- Met verwijzing nu naar figuur 5 bevat plasmide pSD406 vaccinia HindIII J (pos. 83359-88377) gekloneerd 30 in pUC8. pSD406 werd geknipt met HindIII en PvuII, en het fragment van 1,7kb van de linkerkant van HindIII J werd gekloneerd in pUC8 dat geknipt was met HindIII/SmaI, waarmee pSD447 werd gevormd. pSD447 bevat het complete gen voor J2R (pos. 83855-84385). Het initiatiecodon bevindt zich in een NlaIII-plaats en het terminatiecodon bevindt zich in een SspI-plaats. De richting van de transcriptie wordt aangegeven met een pijl in figuur 5.

- 35 Om een flankerende arm aan de linkerkant te verkrijgen werd een HindIII-EcoRI fragment van 0,8 kb geïsoleerd uit pSD447, daarna geknipt met NlaIII en werd een HindIII/NlaIII-fragment van 0,5 kb geïsoleerd. "Annealed" synthetische oligonucleotiden MPSYN43/MPSYN44 (SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:18)

- | | | | | |
|----|---------|----|------------------------------|--------------|
| | | | <u>SmaI</u> | |
| | MPSYN43 | 5' | TAATTAAGCTAGCTACCCGGG | 3' |
| 40 | MPSYN44 | 3' | GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA | 5' |
| | | | <u>NlaIII</u> | <u>EcoRI</u> |

werden met het HindIII/NlaIII-fragment van 0,5 kb geligeerd in pUC18 vectorplasmide dat geknipt was met HindIII-EcoRI, waarmee plasmide pSD449 werd gegenereerd.

- 45 Om een restrictiefragment te verkrijgen met een flankerende arm van vaccinia aan de rechterkant en vectorsequenties van pUC, werd pSD447 geknipt met SspI (gedeeltelijk) binnen vacciniasequenties en met HindIII bij de PUC/vaccinia-verbinding, en werd een vectorfragment van 2,9 kb geïsoleerd. Dit vector-fragment werd geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotide MPSYN45/MPSYN46 (SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20)

- | | | | | |
|----|---------|----|--|-------------|
| 50 | | | <u>HindIII</u> | <u>SmaI</u> |
| | MPSYN45 | 5' | AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA | |
| | MPSYN46 | 3' | AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT | |

- | | | | | | |
|----|--|--|-------------------------------------|----|-------------|
| | | | <u>Not I</u> | | <u>SspI</u> |
| 55 | | | ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCCTAATTAATAAT | 3' | MPSYN45 |
| | | | TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA | 5' | MPSYN46 |

waarmee pSD459 werd gegenereerd.

Om de linker en rechter flankerende armen te combineren tot één plasmide werd een HindIII/SmaI-fragment van 0,5 kb geïsoleerd uit pSD449 en geligeerd met pSD459 vector plasmide dat geknipt was met HindIII/SmaI, waarmee plasmide pSD460 werd gegenereerd. pSD460 werd gebruikt als donorplasmide voor recombinate met wild type vaccinia oudervirus Copenhagen stam VC-2. 32P-geïmerkte probe werd gesynthetiseerd door ketenverlenging van de primer met behulp van MPSYN45 (SEQ ID NO:19) als template en het complementaire 20-meer oligonucleotide MPSYN47 (SEQ ID NO:21) (5'-TTAGTTAATTAGGCGGCCGC-3') als primer. Recombinant virus vP410 werd geïdentificeerd met plaque-hybridisatie.

10 Constructie van plasmide pSD486 voor deletie van het hemorhagische gebied (B13R +B14R)

Met verwijzing nu naar figuur 6 bevat plasmide pSD419 vaccinia Sall G (pos. 160.744-173.351) gekloneerd in pUC8. pSD422 bevat het aangrenzende vaccinia Sall-fragment aan de rechterkant, Sall J (pos. 173.351-182.746) gekloneerd in pUC8. Om een plasmide te construeren met deletie van het hemorhagische gebied, u, B13R-B14R (pos. 172.549-173.552), werd pSD419 gebruikt als de bron voor de linker flankerende arm en werd pSD422 gebruikt als de bron voor de rechter flankerende arm. De richting van transcriptie voor het u gebied wordt aangegeven met een pijl in figuur 6.

Om ongewenste sequenties uit pSD419 te verwijderen werden sequenties links van de NcoI-plaats (pos. 172.-253) verwijderd door digestie van pSD419 met NcoI/SmaI gevolgd door stompmaken van de uiteinden met Klenow fragment van E. coli polymerase en ligatie, waarmee plasmide pSD476 werd gegenereerd. Een rechter flankerende arm van vaccinia werd verkregen door digestie van pSD422 met HpaI bij het terminatie-codon van B14R en door digestie met NruI 0,3 kb rechts daarvan. Dit fragment van 0,3 kb werd geïsoleerd en geligeerd met een HincII-vectorfragment van 3,4 kb, geïsoleerd uit pSD476, waarmee plasmide pSD477 werd gegenereerd. De plaats van de gedeeltelijke deletie van het vaccinia u gebied in pSD477 wordt aangegeven met een driehoek. De resterende B13R coderende sequenties in pSD477 werden verwijderd door digestie met ClaI/HpaI en het resulterende vectorfragment werd geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden SD22mer/SD20mer (SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:23)

	<u>ClaI</u>	<u>BamHI</u>	<u>HpaI</u>
SD22mer	5'	CGATTACTATGAAGGATCCGTT	3'
SD20mer	3'	TAATGATACTTCCTAGGCAA	5'

30

waarmee pSD479 werd gegenereerd. pSD479 bevat een initiatiecodon (onderstreept) gevolgd door een BamHI-plaats. Om Beta-galactosidase van E. coli te plaatsen in de B13-B14 (u) deletielocus onder controle van de u promotor werd een BamHI-fragment van 3,2 kb met daarop het Beta-galactosidase-gen (Shapira et al., 1983) geïntereerd in de BamHI-plaats van pSD479, waarmee pSD479BG werd gegenereerd. pSD 479BG werd gebruikt als donorplasmide voor recombinate met vacciniavirus vP410. Recombinant vacciniavirus vP533 werd geïsoleerd als een blauwe plaque in aanwezigheid van chromogeen substraat X-gal. In vP533 is het B13R-B14R gebied verwijderd en vervangen door Beta-galactosidase. Om Beta-galactosidase-sequenties uit vP533 te verwijderen werd plasmide pSD486 gebruikt, en derivaat van pSD477 met een polylinkergebied maar geen initiatiecodon bij de verbinding met de u deletie. Eerst werd het bovengenoemde ClaI/HpaI-vectorfragment uit pSD477 geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden SD42mer/SD40mer (SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:25)

	<u>ClaI</u>	<u>SacI</u>	<u>XhoI</u>	<u>HpaI</u>
SD42mer	5'	CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT	3'	
SD40mer	3'	TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCGAGCTCCCTAGGCAA	5'	

45

	<u>BglII</u>	<u>SmaI</u>	<u>BamHI</u>
--	--------------	-------------	--------------

waarmee plasmide pSD478 werd gegenereerd. Vervolgens werd de EcoRI-plaats bij de pUC/vaccinia-verbinding vernietigd door digestie van pSD478 met EcoRI, gevolgd door het voorzien van stompe uiteinden met Klenow fragment van E. coli polymerase en ligatie, waarmee plasmide pSD478E- werd gegenereerd. pSD478E werd geknipt met BamHI en HpaI en geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden. HEM5/HEM6 (SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:27)

	<u>BamHI</u>	<u>EcoRI</u>	<u>HpaI</u>
HEM5	5'	GATCCGAATTCTAGCT	3'
HEM6	3'	GCTTAAGATCGA	5'

55

waarmee plasmide pSD486 werd gegenereerd. pSD486 werd gebruikt als donorplasmide voor recombinate met recombinant vacciniavirus vP533, onder vorming van vP553, dat geïsoleerd werd als een kleurloze

plaque in aanwezigheid van X-gal.

Constructie van plasmide pMP494 voor deletie van het ATI gebied (A26L)

- Met verwijzing nu naar figuur 7 bevat pSD414 Sall B, gekloneerd in pUC8. Om ongewenste DNA-sequenties links van het A26L gebied te verwijderen werd pSD414 geknipt met XbaI in vacciniasequenties
 5 (pos. 137.079) en met HindIII bij de pUC/vaccinia verbinding, vervolgens van stompe uiteinden voorzien met Klenow fragment van *E. coli* polymerase en geligeerd, wat resulteerde in plasmide pSD483. Om ongewenste vaccinia DNA-sequenties rechts van het A26L gebied te verwijderen werd pSD483 geknipt met EcoRI (pos. 140.665 en bij de pCU/vaccinia verbinding) en geligeerd, onder vorming van plasmide pSD484. Om het coderende gebied van A26L te verwijderen werd pSD484 geknipt met NdeI (gedeeltelijk) enigszins
 10 stroomopwaarts van het A26L ORF (pos. 139.004) en met HpaI (pos. 137.889) enigszins stroomafwaarts van het A26L ORF. Het vectorfragment van 5,2 kb werd geïsoleerd en geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden AT13/AT14 (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:29)

NdeI

- AT13 5' TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTTAATTAAGTATATTCAAAAAATAAGT
 15 AT14 3' ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA

BglII EcoRI HpaI

- TATATAAATAGATCTGAATTCGTT 3' AT13
 ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA 5' AT14

20

- waardoor het gebied stroomopwaarts van A26L werd gereconstrueerd en het A26L ORF werd vervangen door een kort polylinkergebied met de restrictieplaatsen BglII, EcoRI en HpaI, zoals boven aangegeven. Het resulterende plasmide werd pSD485 genoemd. Omdat de BglII- en EcoRI-plaatsen in het polylinkergebied van pSD485 niet uniek zijn, werden ongewenste BglII- en EcoRI-plaatsen uit plasmide pSD483 (boven-
 25 beschreven) verwijderd door digestie met BglII (pos. 140.136) en met EcoRI bij de pUC/vaccinia verbinding, gevolgd door voorzien van stompe uiteinden met Klenow fragment van *E. coli* polymerase en ligatie. Het resulterende plasmide werd pSD489 genoemd. Het ClaI (pos. 137.198)/*E. coli* RV (pos. 139.048)-fragment van 1,8 kb van pSD489 met het A26L ORF werd vervangen door het overeenkomstige polylinker bevattende ClaI/*EcoRV*-fragment van 0,7 kb van pSD485, waarmee pSD492 werd gegenereerd. De BglII- en EcoRV-
 30 plaatsen in het polylinkergebied van pSD492 zijn uniek.

- Een B III-cassette van 3,3 kb met daarop het *E. coli* Beta-galactosidase-gen (Shapira et al., 1983) onder controle van de vaccinia 11 kDa promotor (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990) werd geïnserteerd in de BglII-plaats van pSD492, waardoor pSD493KBG werd gevormd. Plasmide pSD493KBG werd gebruikt bij recombinatie met ontvangend virus vP553. Recombinant vacciniavirus, vP581, met Betagalactosidase in het
 35 A26L deletiegebied, werd geïsoleerd als een blauwe plaque in aanwezigheid van X-gal.

- Voor het genereren van een plasmide voor de verwijdering van Beta-galactosidasesequenties uit vaccinia recombinant virus vP581 werd het polylinkergebied van plasmide pSD492 verwijderd door mutagenese (Mandecki, 1986) met behulp van synthetisch oligonucleotide MPSYN177 (SEQ ID NO:30) (5'-
 40 AAAATGGGCGTGGATTGTTAACTTTATATA-ACTTATTTTTTTGAAT-ATAC- 3'). In het resulterende plasmide, pMP494, is het vaccinia DNA dat posities [137.889-183.937] omvat, waarop het complete A26L ORF, verwijderd. Recombinatie tussen het pMP494 en de Beta-galactosidasebevattende vacciniarecombinant vP581, resulteerde in vaccinia deletiemutant vP618, die geïsoleerd werd als een kleurloze plaque in aanwezigheid van X-gal.

Constructie van plasmide pSD467 voor deletie van het hemagglutinine-gen (A56R)

- Met verwijzing nu naar figuur 8 loopt het vaccinia Sall G restrictiefragment (pos. 160.744-173.351) tot voorbij de HindIII A/B verbinding (pos. 162.539). pSD419 bevat vaccinia Sall G gekloneerd in pUC8. De richting van de transcriptie voor het hemagglutinine (HA) gen wordt aangegeven met een pijl in figuur 8. Van HindIII B afkomstige vacciniasequenties werden verwijderd door digestie van pSD419 met HindIII in vacciniasequenties en bij de pUC/vaccinia verbinding, gevolgd door ligatie. Het resulterende plasmide,
 50 pSD456, bevat het HA-gen, A56R, geflankeerd door een vacciniasequentie van 0,4 kb aan de linkerkant en een vacciniasequentie van 0,4 kb aan de rechterkant. Coderende sequenties van A56R werden verwijderd door pSD456 te knippen met RsaI (gedeeltelijk; pos. 161.090) stroomopwaarts van de coderende sequenties van A56R, en met EagI (pos. 162.054) dicht bij het eind van het gen. Het RsaI/EagI-vectorfragment van 3,6 kb van pSD456 werd geïsoleerd en geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden
 55 MPSYN59 (SEQ ID NO:31), MPSYN62 (SEQ ID NO:32), MPSYN60 (SEQ ID NO:33), en MPSYN 61 (SEQ ID NO:34)

RsaI

MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGA
 MGSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTTCATAAACCTTTCAAAATATCCATCAACTATCT 5'

5 MPSYN59 -ACAAAATACATAATTT 3'

BglII

MPSYN60 5' TGTAATAAATAAATCACTTTTTATACTAAGATCT-
 MPSYN61 3' TGTTTTATGTATTAACATTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTAGA-

10

SmaI PstI EagI

MPSYN60 -CCCGGGCTGCAGC 3'
 MPSYN61 -GGGCCCACGTCGCCGG 5'

15 waarmee de DNA-sequenties stroomopwaarts van het A56R ORF werden gereconstrueerd en het A56R ORF werden vervangen door een polylinkergebied zoals boven aangegeven. Het resulterende plasmide is pSD466. De vacciniadeletie in pSD466 omvat posities [161.185-162.053]. De plaats van de deletie in pSD466 wordt aangegeven met een driehoek in figuur 8.

Een BglII/BamHI (gedeeltelijk)-cassette met daarop het E. Coli Beta-galactosidase-gen (Shapira et al., 1983) onder controle van de vaccinia 11 kDa promotor (Bertholet et al., 1985; Guo et al., 1989) werd geïnserteerd in de BglII-plaats van pSD466, waarmee pSD466KBG werd gevormd. Plasmide pSD466KBG werd gebruikt in recombinatie met ontvangend virus vP618. Recombinant vacciniavirus, vP708, dat Beta-galactosidase in de A56R deletie bevat, werd geïsoleerd als een blauwe plaque in aanwezigheid van X-gal.

25 Beta-galactosidasesequenties werden uit vP708 verwijderd met behulp van donorplasmide pSD467. pSD467 is identiek aan pSD466, behalve dat EcoRI-, SmaI- en BamHI-plaatsen verwijderd waren uit de pUC/vaccinia verbinding door digestie van pSD466 met EcoRI/BamHI, gevolgd door stompmaken van de uiteinden met Klenow fragment van E. coli polymerase en ligatie. Recombinatie tussen vP708 en pSD467 resulteerde in de recombinante vaccinia deletiemutant, vP723, die geïsoleerd werd als een kleurloze plaque

30 in aanwezigheid van X-gal.

Constructie van plasmide pMPCSK1Δ voor deletie van open leesframes [C7L-K1L]

Met verwijzing nu naar figuur 9 werden de volgende vacciniaklonen gebruikt bij de constructie van pMPCSK1Δ. pSD420 is Sall H gekloneerd in pUC8. pSD435 is KpnI F gekloneerd in pUC18. pSD435 werd geknipt met SphI en weer geligeerd, waardoor pSD451 werd gevormd. In pSD451 zijn DNA-
 35 sequenties links van de SphI-plaats (pos. 27.416) in HindIII M verwijderd (Perkus et al., 1990). pSD409 is HindIII M gecloneerd in pUC8.

Om te voorzien in een substraat voor de deletie van de [C7L-K1L] -genencluster uit vaccinia, werd E. coli Beta-galactosidase eerst als volgt geïnserteerd in de vaccinia M2L deletielocus (Guo et al., 1990). Om de BglII-plaats in pSD409 te elimineren werd het plasmide geknipt met BglI in vacciniasequenties (pos.
 40 28.212) en met BamHI bij de pUC/vaccinia verbinding en daarna geligeerd om zo plasmide pMP409B te vormen. pMP409B werd geknipt op de unieke SphI-plaats (pos. 27.416). coderende sequenties van M2L werden verwijderd door mutagenese (Guo et al., 1990; Mandecki, 1986) met behulp van het synthetische oligonucleotide

BglII

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

Het resulterende plasmide, pMP409D, bevat een unieke BglII-plaats, geïnserteerd in de M2L deletielocus
 50 zoals boven aangegeven. Een BamHI (gedeeltelijk)/BglII-cassette van 3,2 kb met daarop het E. coli Beta-galactosidase-gen (Shapira et al., 1983) onder controle van de 11 kDa promotor (Bertholet et al., 1985) werd geïnserteerd in pMP409D dat geknipt was met BglII. Het resulterende plasmide, pMP409DBG (Guo et al., 1990) werd gebruikt als donorplasmide voor recombinatie met ontvangend vacciniavirus vP723. Recombinant vacciniavirus, vP784, dat β-galactosidase geïnserteerd in de M2L deletielocus bevat, werd
 55 geïsoleerd als een blauwe plaque in aanwezigheid van X-gal.

Een plasmide met deletie van vacciniagenen [C7L - K1L] werd opgebouwd in pUC8 dat geknipt was met SmaI, HindIII en van stompe uiteinden voorzien met Klenow fragment van E. coli polymerase. De linker

flankerende arm bestaande uit vaccinia HindIII C-sequenties werd verkregen door digestie van pSD420 met XbaI (pos. 18.628), gevolgd door stomp maken van de uiteinden met Klenow fragment van *E. coli* polymerase en digestie met BglII (pos. 19.706). De rechter flankerende arm bestaande uit vaccinia HindIII K-sequenties werd verkregen door digestie van pSD451 met BglII (pos. 29.062) en EcoRV (pos. 29.778).

- 5 Het resulterende plasmide, pMP581CK, heeft een deletie van de vacciniasequenties tussen de BglII-plaats (pos. 19.706) in HindIII C en de BglII-plaats (pos. 29.062) in HindIII K. De plaats van de deletie van de vacciniasequenties in plasmide pMP581CK wordt aangegeven met een driehoek in figuur 9.

- Om overtollig DNA bij de vacciniadeletieverbinding te verwijderen werd plasmide pMP581CK geknipt bij de NcoI-plaatsen binnen vacciniasequenties (pos. 18.811; 19.655), behandeld met Bal-31 exonuclease en
10 onderworpen aan mutagenese (Mandecki, 1986) met behulp van het synthetische oligonucleotide MPSYN233 (SEQ ID NO:36) 5'-TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAATA.ATATTTATT-3'. Het resulterende plasmide, pMPCSK1, heeft een deletie van vacciniasequenties posities 18.805-29.108, omvattende 12 open leesframes van vaccinia [C7L - K1L]. Recombinatie tussen pMPCSK1 en de β -galactosidase bevattende vacciniarecombinant vP784 resulteerde in vaccinia deletiemutant vP804, die
15 geïsoleerd werd als een kleurloze plaque in aanwezigheid van X-gal.

Constructie van plasmide pSD548 voor deletie van de grote subunit van ribonucleotidereductase (I4L).

- Met verwijzing nu naar figuur 10 bevat plasmide pSD405 vaccinia HindIII I (pos. 63.875-70.367), gekloneerd in pUC8. pSD405 werd geknipt met EcoRV binnen vacciniasequenties (pos. 67.933) en met SmaI bij de pUC/vaccinia verbinding en geligeerd, waarmee plasmide pSD518 werd gevormd. pSD518 werd
20 gebruikt als de bron van alle vaccinia restrictiefragmenten die gebruikt werden bij de constructie van pSD548.

- Het vaccinia I4L-gen loopt van positie 67.371-65.059. De richting van de transcriptie voor I4L wordt aangegeven met een pijl in figuur 10. Om een vectorplasmidefragment te verkrijgen met een deletie van een deel van de coderende sequenties van I4L werd pSD518 geknipt met BamHI (pos. 65.381) en HpaI (pos.
25 67.001) en van stompe uiteinden voorzien met behulp van Klenow fragment van *E. coli* polymerase. Dit vectorfragment van 4,8 kb werd geligeerd met een SmaI-cassette van 3,2 kb met daarop het *E. coli* β -galactosidase-gen (Shapira et al., 1983) onder controle van de vaccinia 11 kDa promotor (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990), wat resulteerde in plasmide pSD524KBG. pSD524KBG werd gebruikt als donorplasmide voor recombinatie met vacciniavirus vP804. Recombinant vacciniavirus, vP855, dat
30 β -galactosidase bevat in een gedeeltelijke deletie van het I4L-gen, werd geïsoleerd als een blauwe plaque in aanwezigheid van X-gal.

Om β -galactosidase en de rest van het I4L ORF uit vP855 te verwijderen werd deletieplasmide pSD548 geconstrueerd. De linker en rechter flankerende armen van vaccinia werden afzonderlijk ingebouwd in pUC8 zoals hieronder gedetailleerd beschreven en zoals schematisch weergegeven in figuur 10.

- 35 Om een vectorplasmide te construeren voor het opnemen van de linker flankerende arm van vaccinia werd pUC8 geknipt met BamHI/EcoRI en geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden 518A1/518A2 (SEQ ID NO:37/SEQ ID NO:38)

	<u>BamHI</u>	<u>RsaI</u>	
518A1	5'	GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT	
40	518A2	3'	GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA
		<u>BglII</u>	<u>EcoRI</u>
		TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG	3' 518A1
		AACTCTATTTTCTAGAATCCTTAA	5' 518A2

- 45 waarmee plasmide pSD531 werd gevormd. pSD531 werd geknipt met RsaI (gedeeltelijk) en BamHI en er werd een vectorfragment van 2,7 kb geïsoleerd. pSD518 werd geknipt met BglII (pos. 64.459)/RsaI (pos. 64.994) en er werd een fragment van 0,5 kb geïsoleerd. De twee fragmenten werden aan elkaar geligeerd, waarmee pSD537 werd gevormd dat de complete flankerende arm van vaccinia links van de coderende sequenties van I4L bevat.

- 50 Om een vectorplasmide te construeren voor het opnemen van de rechter flankerende arm van vaccinia werd pUC8 geknipt met BamHI/EcoRI en geligeerd met "annealed" synthetische oligonucleotiden 518B1/518B2 (SEQ ID NO:39/SEQ ID NO:40)

	<u>BamHI</u>	<u>BglII</u>	<u>SmaI</u>
518B1	5'		
55	GATCCAGATCTCCCGGAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAGGGATT		
	518B2	3'	
	GTCTAGAGGGCCCTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATCCCTAAA		

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

- 5 waarmee plasmide pSD532 werd gevormd. pSD532 werd geknipt met RsaI (gedeeltelijk)/EcoRI en er werd een vectorfragment van 2,7 kb geïsoleerd. pSD518 werd geknipt met RsaI binnen vacciniasequenties (pos. 67.436) en EcoRI bij de vaccinia/pUC verbinding en er werd een fragment van 0,6 kb geïsoleerd. De twee fragmenten werden aan elkaar geligeerd, waarmee pSD538 werd gevormd dat de complete flankerende arm van vaccinia rechts van de coderende sequenties van I4L bevat.
- 10 De rechter flankerende arm van vaccinia werd geïsoleerd als een EcoRI/BglII-fragment van 0,6 kb uit pSD538 en geligeerd in pSD537 vectorplasmide dat geknipt was met EcoRI/BglII. In het resulterende plasmide, pSD539, is het I4L ORF (pos. 65. 047-67.386) vervangen door een polylinkergebied dat geflankeerd wordt door 0,6 kb vaccinia DNA aan de linkerkant en 0,6 kb vaccinia DNA aan de rechterkant, dit alles op een pUC achtergrond. De plaats van de deletie in de vacciniasequenties wordt aangegeven met
- 15 een driehoek in figuur 10. Om mogelijke recombinatie van β galactosidasesequenties in het van pUC afkomstige deel van pSD539 met β -galactosidasesequenties in recombinant vacciniavirus vP855 te vermijden werd de vaccinia I4L-deletiecassette uit pSD539 overgebracht in pRC11, een pUC-derivaat waaruit alle β -galactosidasesequenties verwijderd zijn en vervangen zijn door een polylinkergebied (Colinas et al., 1990). pSD539 werd geknipt met EcoRI/PstI en het fragment van 1,2 kb werd geïsoleerd. Dit
- 20 fragment werd geligeerd in pRC11 dat geknipt was met EcoRI/PstI (2,35 kb), waardoor pSD548 werd gevormd. Recombinatie tussen pSD548 en de β -galactosidase bevattende vacciniarecombinant vP855 resulteerde in vaccinia deletiemutant vP866 die geïsoleerd werd als een kleurloze plaque in aanwezigheid van X-gal.
- DNA van recombinant vacciniavirus vP866 werd geanalyseerd met behulp van restrictiedigestie, gevolgd
- 25 door elektroforese op een agarosegel. De restrictiepatronen waren zoals verwacht. Polymerase-kettingreacties (PCR) (Engelke et al., 1988) met behulp van vP866 als de template en met primers die de zes boven beschreven deletieloci flankeerden, leverde DNA-fragmenten op van de verwachte grootten. Sequentieanalyse van de met PCR gegenereerde fragmenten rond de gebieden van de deletieverbindingen bevestigde dat de verbindingen waren zoals verwacht werd. Recombinant vacciniavirus vP866, met de zes
- 30 als boven beschreven geconstrueerde deleties, werd vaccinia vaccinstam "NYVAC" genoemd.

Voorbeeld 12 – CONSTRUCTIE VAN NYVAC-MV RECOMBINANT MET EXPRESSIE VAN MAZELEN FUSIE- EN HEMAGGLUTININE-GLYCOPROTEÏNEN

- cDNA-kopieën van de sequenties die coderen voor de HA- en F-eiwitten van mazelenvirus MV (Edmonston
- 35 stam), werden geïntereerd in NYVAC om zo een dubbele recombinant te vormen die NYVAC-MV (vP913) werd genoemd. De recombinant vertoonde authentieke expressie van beide mazelenglycoproteïnen op het oppervlak van geïnfecteerde cellen. Met immunoprecipitatieanalyse werd aangetoond dat de F- en HA-glycoproteïnen beide op correcte wijze werden bewerkt. De recombinant bleek ook vorming van syncytia te induceren.
- 40 **Cellen en virussen**
- Het ontvangende virus dat gebruikt werd bij de productie van NYVAC-MV was de gemodificeerde Copenhagenstam van vacciniavirus met de aanduiding NYVAC. Het kweken en bepalen van de titers van alle virussen geschiedde op monolagen van Vero cellen.
- Plamideconstructie**
- 45 Met verwijzing nu naar figuur 11 en Taylor et al., (1991) bevat het plasmide pSPM2LHA het complete mazelen HA-gen, in een precieze ATG:ATG configuratie gekoppeld aan de vacciniavirus H6 promotor die eerder beschreven is (Taylor et al., 1988a,b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989). Een EcoRV/SmaI-fragment van 1,8 kbp met daarop de het meeste aan de 3'-kant gelegen 24 bp van de H6 promotor, in een precieze ATG:ATG configuratie gefuseerd met het HA-gen dat de het meeste aan de 3'-kant gelegen 26 bp
- 50 mist, werd geïsoleerd uit pSPM2LHA. Dit fragment werd gebruikt om het EcoRV/SmaI-fragment van 1,8 kbp van pSPMHA11 (Taylor et al., 1991) te vervangen om zo pRW803 te genereren. Plasmide pRW803 bevat de complete H6 promotor, op precieze wijze gekoppeld aan het complete mazelen HA-gen.
- Plasmide pSD513VCVQ werd afgeleid van plasmide pSD460 door toevoeging van polylinkersequenties. Plasmide pSD460 werd gemaakt om deletie van het thymidinekinase-gen uit vacciniavirus mogelijk te
- 55 maken (figuur 5).
- Om het mazelenvirus F-gen te inserteren in het HAinsertieplasmide werden manipulaties uitgevoerd op pSPHMF7. Plasmide pSPHMF7 (Taylor et al., 1991) bevat het mazelen F-gen aan de 3'-kant naast de

eerder beschreven vacciniavirus H6 promotor. Om een perfecte ATG:ATG configuratie te verkrijgen en om interveniërende sequenties tussen het 3'-uiteinde van de promotor en het ATG van het mazelen F-gen te verwijderen werd oligonucleotide-gestuurde mutagenese uitgevoerd met behulp van oligonucleotide SPMAD (SEQ ID NO:41).

5 SPMAD: 5'-TATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3'

Het resulterende plasmide werd pSPMF75M20 genoemd.

Het plasmide pSPMF75M20 dat het mazelen F-gen bevat dat nu in een precieze ATG:ATG configuratie gekoppeld is aan de H6 promotor, werd geknipt met NruI en EagI. Het resulterende fragment van 1,7 kbp met stompe uiteinden met daarop de het meest aan de 3'-kant gelegen 27 bp van de H6 promotor en het
10 complete fusiegen werd geïsoleerd en geïnserteerd in een intermediair plasmide pRW823 dat geknipt was met NruI en XbaI en van stompe uiteinden was voorzien. Het resulterende plasmide pRW841 bevat de H6 promotor gekoppeld aan het mazelen F-gen in de pIBI25 plasmidevector (IBI, New Haven, CT). De H6/mazelen F-cassette werd uit pRW841 geknipt door digestie met SmaI en het resulterende fragment van 1,8 kb werd geïnserteerd in pRW843 (dat het mazelen HA-gen bevat). Plasmide pRW843 werd eerst
15 geknipt met NotI en van stompe uiteinden voorzien met Klenow fragment van *E. coli* DNA-polymerase in aanwezigheid van 2mM dNTPs. Het resulterende plasmide, pRW857, bevat daardoor de mazelenvirus F- en HA-genen gekoppeld in een staart-staartconfiguratie. Beide genen zijn gekoppeld aan de vacciniavirus H6 promotor.

Ontwikkeling van NYVAC-MV

20 Plasmide pRW857 werd getransfecteerd in met NYVAC (vP866) geïnfekteerde Vero cellen met behulp van de eerder beschreven calciumfosfaatprecipitatie werkwijze (Panicali et al., 1982; Piccini et al., 1987). Positieve plaques werden geselecteerd op basis van in situ plaque-hybridisatie met specifieke radioactief gemerkte MV-, F- en HA-probes en onderworpen aan zes achtereenvolgende plaquezuiveringsronden totdat
25 een zuivere populatie was verkregen. Eén representatieve plaque werd vervolgens geamplificeerd en de resulterende recombinant werd NYVAC-MV (vP913) genoemd.

Immunofluorescentie

Indirecte immunofluorescentie werd uitgevoerd zoals eerder beschreven (Taylor et al., 1990). Gebruikte mono specifieke reagentia waren sera die gegenereerd waren door inoculatie van konijnen met kanariepokkenrecombinanten met expressie van ofwel het mazelen F-gen ofwel het mazelen HA-gen.

30 Immunoprecipitatie

Immunoprecipitatiereacties werden uitgevoerd zoals eerder beschreven (Taylor et al., 1990) met behulp van een cavia-anti-mazelen serum (Whittaker M.A. Bioproducts, Walkersville, MD).

Celfusie-experimenten

35 Monolagen van Vero cellen in schaaltes van 60 mm werden geïnoculeerd met een multiplicitet van 1 pfu per cel met oudervirus of recombinante virussen. Na 1 uur absorptie bij 37°C werd het inoculum verwijderd, het bovenstaande medium vervangen en werden de schaaltes overnacht geïncubeerd bij 37°C. 20 Uur na infectie werden de schaaltes onderzocht.

Teneinde vast te stellen dat de expressieproducten van de mazelenvirus F- en HA-genen beide aanwezig waren op het oppervlak van de geïnfekteerde cellen werd indirecte immunofluorescentieanalyse
40 uitgevoerd met behulp van monospecifieke sera die gegenereerd waren in konijnen tegen kanariepokkenrecombinanten met expressie van ofwel het F-ofwel het HA-gen van mazelenvirus. De resultaten gaven aan dat de F- en HA-genproducten beide tot expressie werden gebracht op het oppervlak van de geïnfekteerde cellen, zoals werd aangetoond met sterke oppervlakfluorescentie met beide monospecifieke sera. Er was geen duidelijke achtergrondkleuring met beide sera op cellen die geïnoculeerd waren met de NYVAC
45 ouderstam, noch was er kruisreactieve kleuring als monospecifieke sera werden getest tegen enkelvoudige vacciniarecombinanten met expressie van ofwel het HA- ofwel het F-gen.

Teneinde aan te tonen dat de door NYVAC-MV tot expressie gebrachte eiwitten immunoreactief waren met mazelenvirus-specifieke sera en op authentieke wijze bewerkt werden in de geïnfekteerde cel, werd immunoprecipitatieanalyse uitgevoerd. Monolagen van Vero cellen werden geïnoculeerd met een multipli-
50 citeit van 10 pfu/cel oudervirus of recombinantvirus in aanwezigheid van ³⁵S-methionine. Immunoprecipitatieanalyse toonde een HA-glycoproteïne aan van ongeveer 76 kDa en de gesplitste fusieproducten F₁ en F₂ met molecuulgewichten van respectievelijk 44 kDa en 23 kDa. Er werden geen mazelen-specifieke producten gedetecteerd in niet-geïnfekteerde Vero cellen of in Vero cellen die geïnfekteerd waren met het NYVAC oudervirus.

55 Een kenmerk van de cytopathologie van MV is de vorming van syncytia die ontstaan door fusie van geïnfekteerde cellen met omringende geïnfekteerde of niet-geïnfekteerde cellen, gevolgd door migratie van de nucleï naar het centrum van het syncytium (Norby et al., 1982). Gebleken is dat dit een belangrijke

methode voor verspreiding van het virus is, die voor paramyxovirussen kan optreden in aanwezigheid van HA-specifiek virusneutraliserend antilichaam (Merz et al., 1980). Teneinde vast te stellen dat de in de vacciniavirus tot expressie gebrachte MV-eiwitten functioneel actief waren, werden monolagen van Vero cellen geïnoculeerd met NYVAC en NYVAC-MV en onderzocht op cytopathische effecten. In met NYVAC-MV

5 geïnfecteerde Vero cellen werd ongeveer 18 uur na infectie een duidelijke sterke celfusie-activiteit waargenomen. Er was geen duidelijke celfusie-activiteit in cellen die geïnfecteerd waren met NYVAC

oudervirus.

Resultaten van serologische analyse van sera van met NYVAC-MV (vP913) geïnoculeerde konijnen

In deze studie werden twee konijnen geïnoculeerd met 1×10^8 pfu NYVAC-MV (vP913) langs subcutane

10 weg. Na 28 dagen kregen de dieren een booster met een equivalente dosis. Seriële bloedmonsters werden geanalyseerd op MV-neutraliserende activiteit met behulp van de plaque reductiemethode. De resultaten worden getoond in Tabel 6. De resultaten tonen aan dat geen van de konijnen een respons vertoonde op de aanvankelijke inoculatie met NYVAC-MV. De abrupt stijgende respons na de tweede inoculatie echter geeft aan dat de dieren gestimuleerd waren. Beide dieren bereikten neutraliserende antilichaamtiter in het

15 beschermende bereik.

TABEL 6

Anti-mazelen neutraliserend antilichaamtiter ($\log_{10}$) in sera van konijnen geïnoculeerd met NYVAC-MV (vP913)

Dier		Titer weken na inoculatie					
		W0	W2	W4 ^c	W5	W6	W7
25	Konijn A116	<1	<1	<1	2,8 ^b	2,2	2,2
	A117	<1	<1	<1	1,9	1,9	1,9

a) Konijnen kregen $8,0 \log_{10}$ pfu NYVAC-MV (vP913) s.c.

b) Titer uitgedrukt als $\log_{10}$ van de reciproke van de laatste verdunning die een vermindering van 50% van het aantal plaques geeft vergeleken met pre-inoculatie serum.

30 c) Dieren werden opnieuw geïnoculeerd na 28 dagen.

LITERATUUR

1. Adams, J.M., en D.T. Imagawa, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 96, 240-244 (1957).
- 35 2. Albrecht, P., K. Herrman, en G.R. Burns, J. Virol. Methods 3, 251-260 (1981).
3. Alkhatib, G., en D. Briedis, Virology 150, 479-490 (1986).
4. Alkhatib, G., C. Richardson, en S-H. Shen, Virology 175, 262-270 (1990).
5. Appel, M.J.G., en O.R. Jones, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 571-574 (1967).
6. Appel, M.J.G., en D.S. Robson, Am. J. Vet. Res. 34, 1459-1463 (1973).
- 40 7. Avery, R.J., en J. Niven, Infect. Immun. 26, 795-801 (1979).
8. Baker, J.A., B.E. Sheffy, D.S. Robson, J. Gilmartin, Cornell Vet (USA) 56, 588-594 (1966).
9. Bertholet, C., R. Drillien, en R. Wittek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096-2100 (1985).
10. Bestetti, G., R. Fatzer, en R. Frankhauser, Acta Neuropathol. 43, 69-75 (1978).
11. Black, F.L., L.L. Berman, M. Libel, C.A. Reichelt, F. de P. Pinheiro, A.T. da Rosa, F. Figuera, en E.S. Gonzales, Bull. W.H.O. 62, 315-319 (1984).
- 45 12. Bush, M., R.J. Montali, D. Brownstein, A.E. James, Jr., en M.J.G. Appel, J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 959-960 (1976).
13. Carpenter, J.W., M.J.G. Appel, R.C. Erickson, en M.N. Novilla, J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 961-964 (1976).
- 50 14. Choppin, P.W., C.D. Richardson, D.C. Merz, W.W. Hall, en A. Scheid, J. Infect. Dis. 143, 352-363 (1981).
15. Clewell, D.B., J. Bacteriol. 110, 667-676 (1972).
16. Clewell, D.B., en D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166 (1969).
17. Colinas, R.J., R.C. Condit, en E. Paoletti, Virus Research 18, 49-70 (1990).
- 55 18. DeLay, P.D., S.S. Stone, D.T. Karzon, S. Katz, en J. Enders, Am. J. Vet. Res. 26, 1359-1373 (1965).
19. Diallo, A., Vet. Micro. 23, 155-163 (1990).

20. Dowling, P.C., B.M. Blumberg, J. Menonna, J.E. Adamus, P. Cook, J.C. Crowley, D. Kolakofsky, en S.D. Cook, *J. Gen. Virol.* 67, 1987–1992 (1986).
21. Drillien, R., D. Spehner, A. Kirn, P. Giraudon, R. Buckland, F. Wild, en J.P. Lecocq, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1252–1256 (1988).
- 5 22. Engelke, D.R., P.A. Hoener, en F.S. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 544–548 (1988).
23. Fenner, F., P.A. Bachmann, E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, M.J. Studdert, en D.O. White, In *Veterinary Virology*, ed. F. Fenner, (Academic Press, Inc., New York) pp. 485–503 (1987).
24. Gillespie, J.H., en D.T. Karzon, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 105, 547–551 (1960).
- 10 25. Giraudon, P., Ch. Gerald, en T.F. Wild, *Intervirology* 21, 110–120 (1984).
26. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, en E. Paoletti, *Virology* 179, 247–266 (1990a).
27. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, en E. Paoletti, *Virology* 179, 517–563 (1990b).
- 15 28. Graves, M.C., S.M. Silver, en P.W. Choppin, *Virology* 86, 254–263 (1978).
29. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, en 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, en E. Paoletti, *J. Virol.* 64, 2399–2406 (1990).
- 20 31. Hall, W.W., R.A. Lamb, en P.W. Choppin, *Virology* 100, 433–449 (1980).
32. Hartley, W.J., *Vet. Path.* 11, 301–312 (1974).
33. Imagawa, D.T., P. Goret, en J.M. Adams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 1119–1123 (1960).
34. Karzon, D.T., *Pediatrics* 16, 809–818 (1955).
35. Karzon, D.T., *Annals of the N.Y. Academy of Sci.* 101, 527–539 (1962).
- 25 36. Kazacos, K.R., H.L. Thacker, H.L. Shivaprasad, en 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, en W.H. Wunner, *Intervirology* 10, 137–152 (1978).
38. Kunkel, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488–492 (1985).
- 30 39. Lennon, J.L., en 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, en J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pagina's (1982).
- 35 43. Maniatis, T., E.F. Fritsch, en J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pagina's (1986).
44. Merz, D.C., A. Schied, en P. Choppin, *J. Exp. Med.* 151, 275–288 (1980).
45. Moura, R.A., en J. Warren, *J. Bact.* 82, 702–705 (1961).
46. Norrby, E., en Y. Gollmar, *Infect. Immun.* 11, 231–239 (1975).
- 40 47. Norrby, E., G. Enders-Ruckle, en V. ter Meulen, *J. Infect. Dis.* 132, 262–269 (1975).
48. Norrby, E., S.N. Chen, T. Togashi, H. Shesberadaran, en K.P. Johnson, *Archives of Virology* 71, 1–11 (1982).
49. Norrby, E., en M.N. Oxman, In *Fields Virology 2nd Ed.*, B.N. Fields en D.M. Knipe, eds. (Raven Press, NY) pp. 1013–1044 (1990).
- 45 50. Novick, S.L. en D. Hoekstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7433–7437 (1988).
51. Orvell, C., en E. Norrby, *J. Gen. Virol.* 50, 231–245 (1980).
52. Panicali, D., en E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927–4931 (1982).
53. Peterson, R.G., en R.A. Lamb, *Cell* 48, 441–452 (1987).
54. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas, en E. Paoletti, *Science* 229, 981–984 (1985).
- 50 55. Perkus, M.E., K. Limbach, en 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, en E. Paoletti, *Virology* 179, 276–286 (1990).
57. Phillips, T.R., J.L. Jensen, M.J. Rubino, W.C. Yang, en R.D. Schultz, *Can. J. Vet. Res.* 53, 154–160 (1989).
- 55 58. Piccini, A., M.E. Perkus, en E. Paoletti, In *Methods in Enzymology*, Vol. 153, eds. Wu, R., en Grossman, L., (Academic Press) pp. 545–563 (1987).

59. Preblud, S.R., en S.L. Katz, In *Vaccines*, eds. S.A. Plotkin en E.A. Mortimer, (W.B. Saunders Co.) pp. 182–222 (1988).
60. Richardson, C.D., A. Berkovich, S. Rozenblatt, en W. Bellini, *J. Virol.* 54, 186–193 (1985).
- 5 61. Richardson, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima, en 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, en B. Moss, *J. Virol.* 60, 436–449 (1986).
64. Sanger, F., S. Nicklen, en A.R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 (1977).
- 10 65. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, en M.J. Casadaban, *Gene* 25, 71–82 (1983).
66. Spehner, D., R. Drillien, en J.P. Lecocq, *J. Virol.* 64, 527–533 (1990).
67. Stephenson, J.R. en V. ter Meulen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 6601–6605 (1979).
68. Tabor, S., en C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767–4771 (1987).
69. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R.G. Webster, en E. Paoletti, *Vaccine* 6, 504–508 (1988a).
- 15 70. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmettre en E. Paoletti, *Vaccine* 6, 497–503 (1988b).
71. Taylor, J., C. Edbauer, A. Rey-Senelongue, J.F. Bouquet, E. Norton, S. Goebel, P. Desmettre, en 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, en E. Paoletti, *J. Virol.* 65, 4263–4272 (1991).
- 20 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, en C. Richardson, *J. Virol.* 64, 37–50 (1990).
75. Warren, J., M.K. Nadel, E. Slater, en S.J. Millian, *Amer. J. Vet. Res.* 21, 111–119 (1960).
76. Wild, T.F., E. Malvoisin, en R. Buckland, *J. Gen. Virol.* 72, 439–442 (1991).
- 25 77. Wild, F., P. Giraudon, D. Spehner, R. Drillien, en J-P. Lecocq, *Vaccine* 8, 441–442 (1990).
78. Yuen, L., en B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6417–6421 (1987).

Conclusies

- 30 1. Recombinant vacciniavirus, dat DNA uit mazelenvirus bevat dat codeert voor ten minste één van mazelenvirus hemagglutinine-glycoproteïne en mazelenvirus fusieglycoproteïne in een niet-essentieel gebied van het vacciniavirusgenoom, met het kenmerk, dat de open leesframes voor het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gebied, het A type inclusiegebied, het hemagglutinine-gen, het gastheerbereikgenengebied
- 35 en de grote subeenheid van ribonucleotidereductase uit het vacciniavirus verwijderd zijn.
2. Recombinant vacciniavirus volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de open leesframes voor het thymidinekinase-gen, het hemorrhagische gebied, het A type inclusiegebied, het hemagglutinine-gen, het gastheerbereikgenengebied respectievelijk de grote subeenheid van ribonucleotidereductase, de open leesframes aangeduid met J2R, B13R+B14R, A26L, A56R, C7L-K1L respectievelijk I4L zijn.
- 40 3. Recombinant vacciniavirus volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het DNA uit mazelenvirus DNA uit de Edmonston stam uit mazelenvirus is en onder de transcriptionele controle van een H6 promotor staat.
4. Recombinant vacciniavirus volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het vacciniavirus NYVAC-MV (vP913) is.
- 45 5. Vaccin voor het induceren van een immunologische respons in een gastheerdier, welk vaccin een drager en een recombinant vacciniavirus bevat, met het kenmerk, dat het recombinant vacciniavirus een recombinant vacciniavirus volgens één van de conclusies 1–4 is.

Hierbij 13 bladen tekening

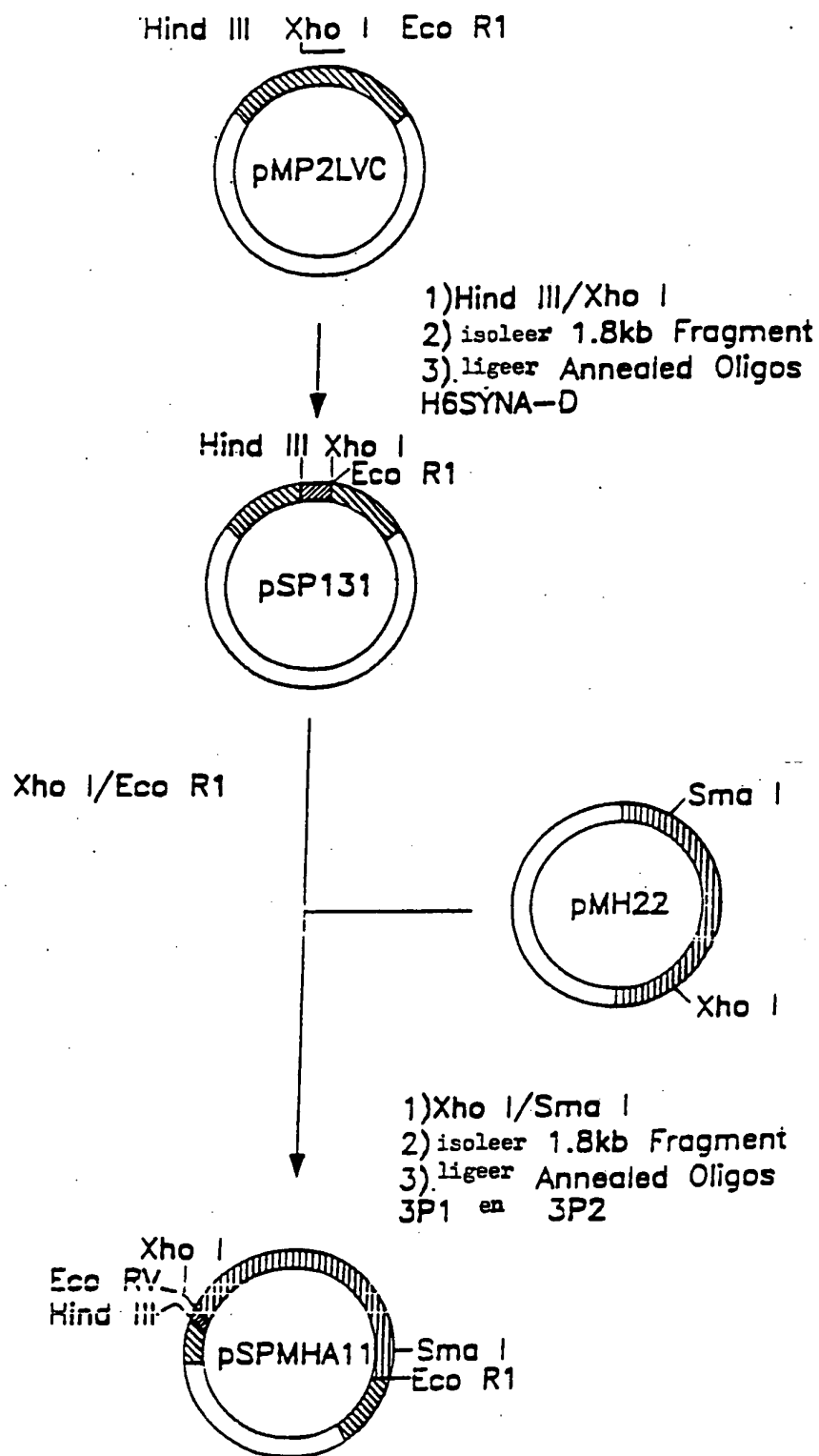
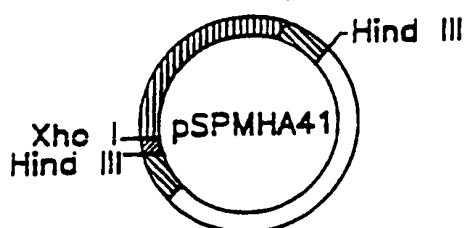
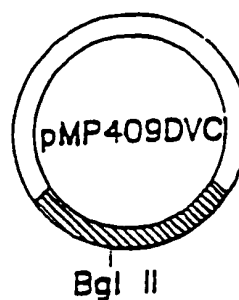


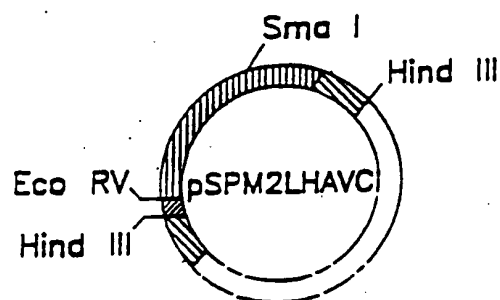
FIG. 1A

- 1)Hind III/Eco R1
- 2) ispleer 1.9kb Fragment
- 3)Blunt-end

- 1)Bgl II.
- 2)Blunt-end



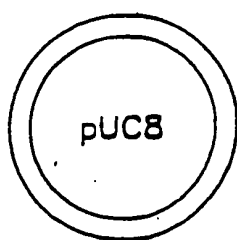
mutagenese
met
oligonucleotide
HAXHOD



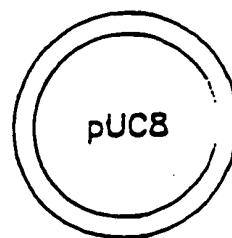
vP557

FIG. 1B

Eco R1 Sma I Sal I Hind III



Eco R1 Sma I Sal I Hind III



Sal I/Hind III

1) Sal I/Hae III

2) isoleer Hind III
1kb
Fragment

Bst XI/Sal I

isoleer
820bp
Fragment

Sal I

pCRF2

Bst XI

Sma I/Sal I

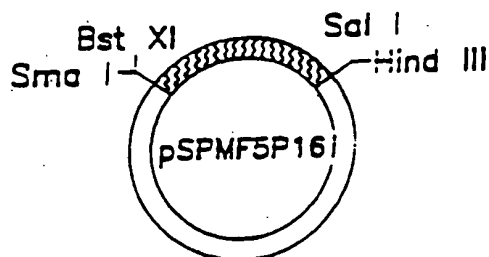
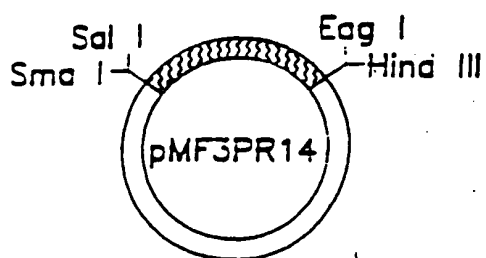
ligeer met
Annealed Oligos
3PA en 3PBligeer met
Annealed Oligos
5PA en 5PB1) Sal I/ Eag I
2) isoleer 1kb
Fragment1) Sma I/Sal I
2) isoleer 850bp
Fragment

FIG. 2A

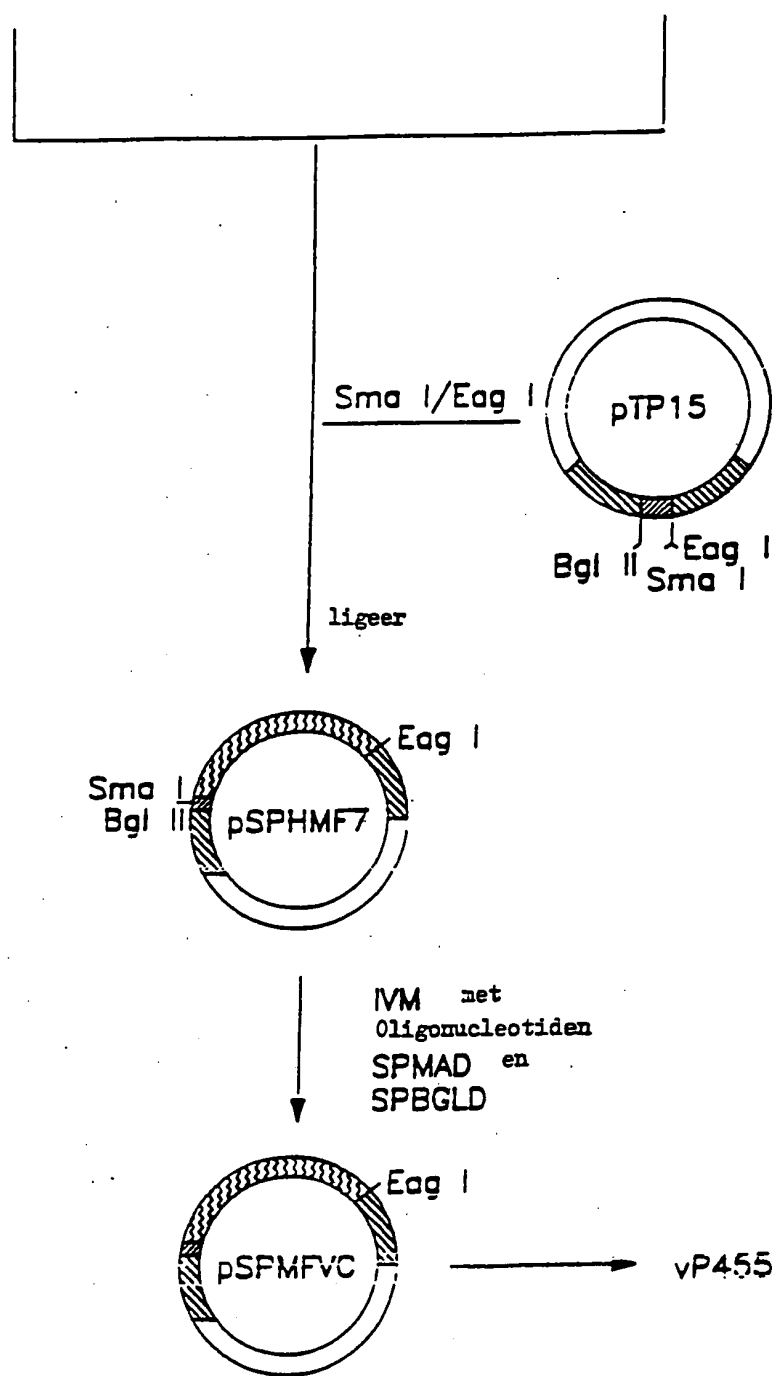


FIG. 2B

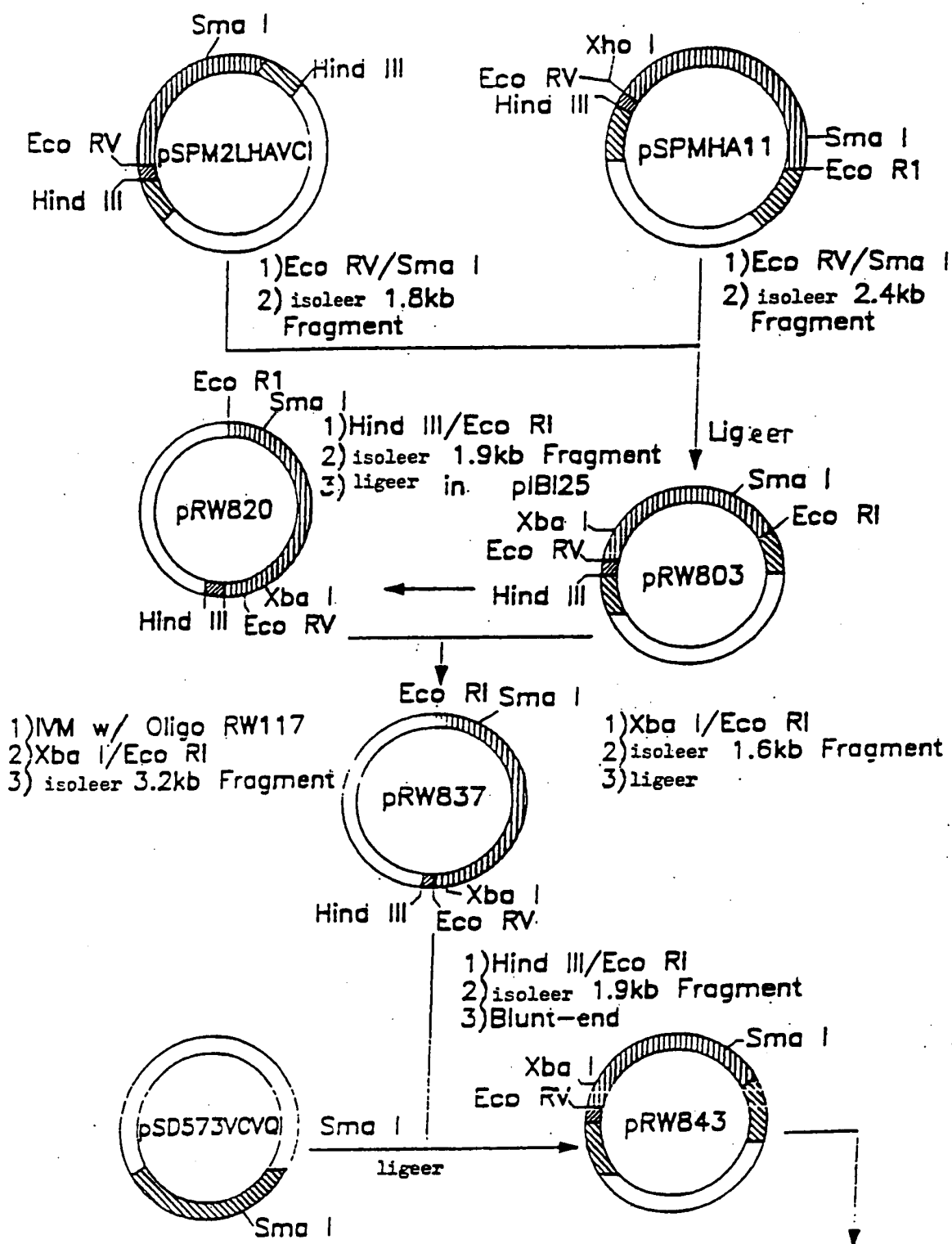


FIG. 3

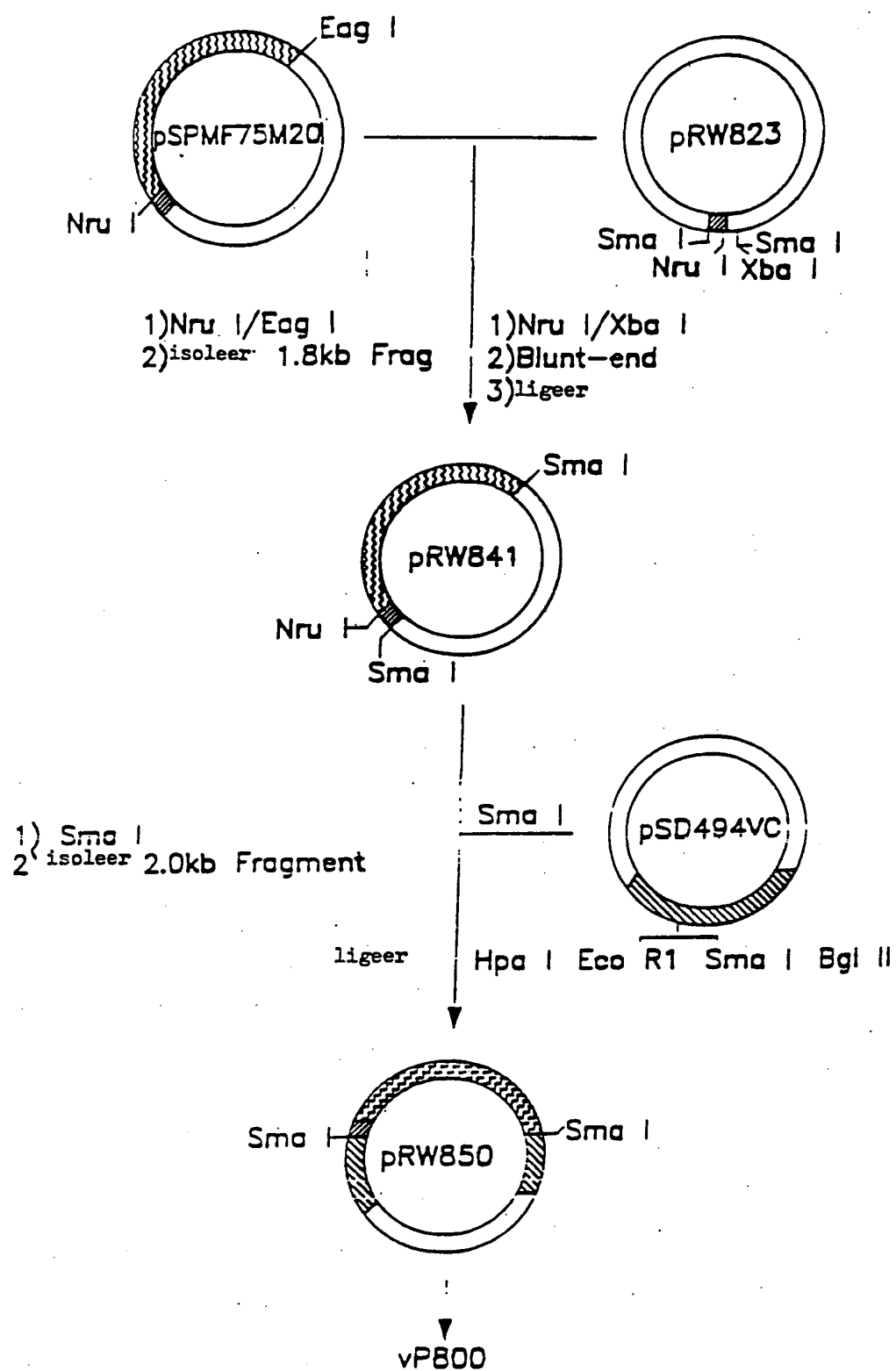


FIG. 4

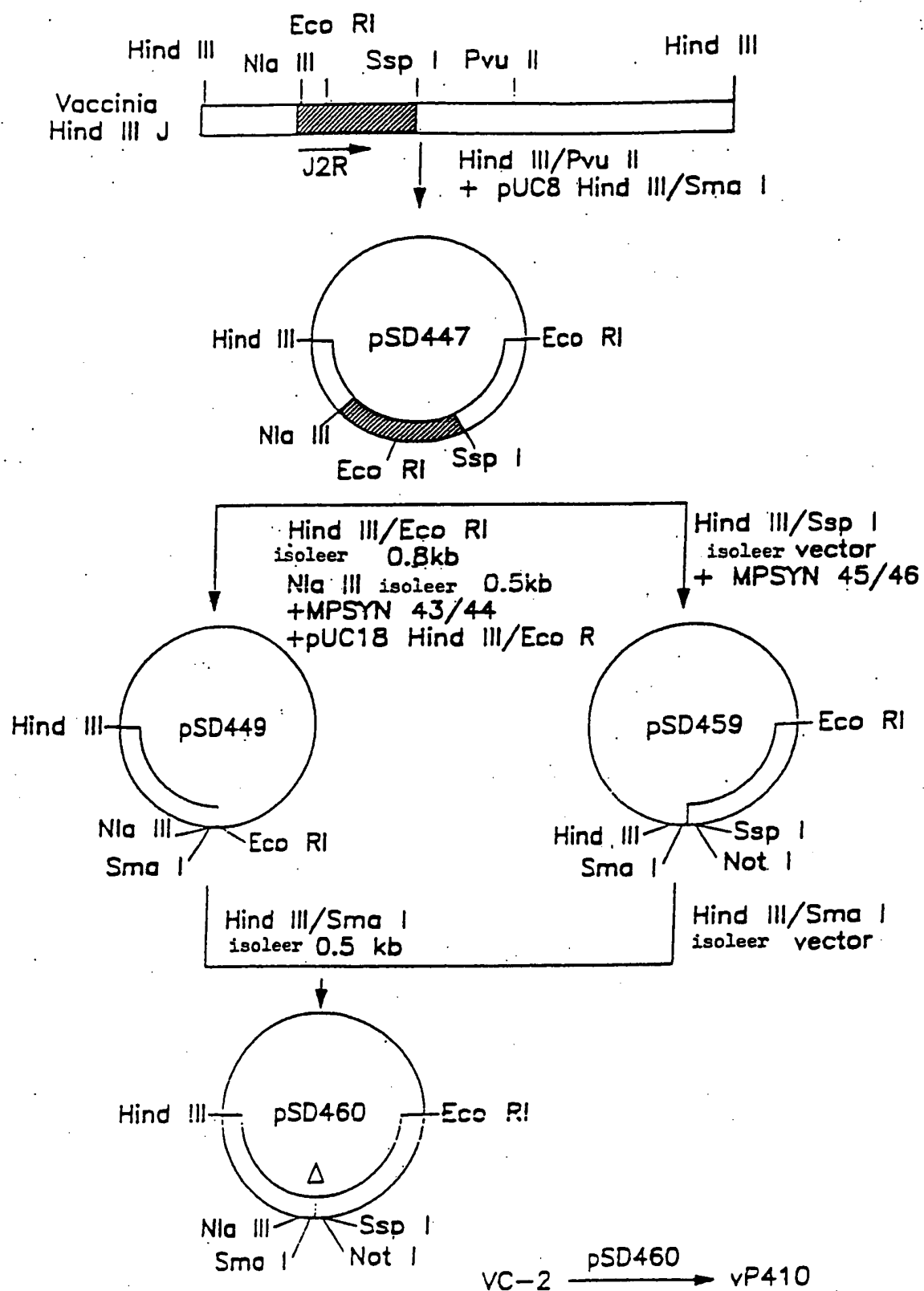


FIG. 5

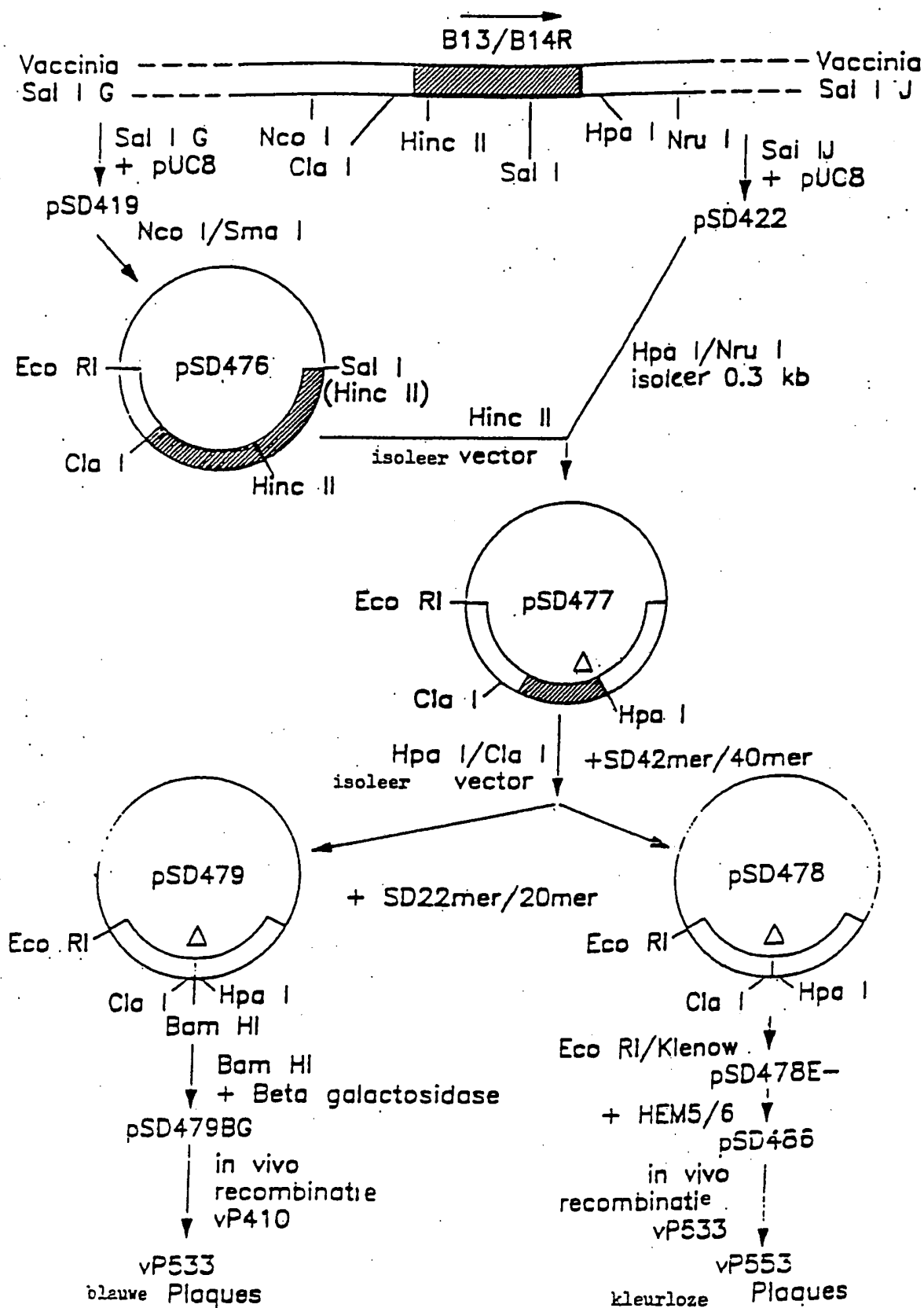
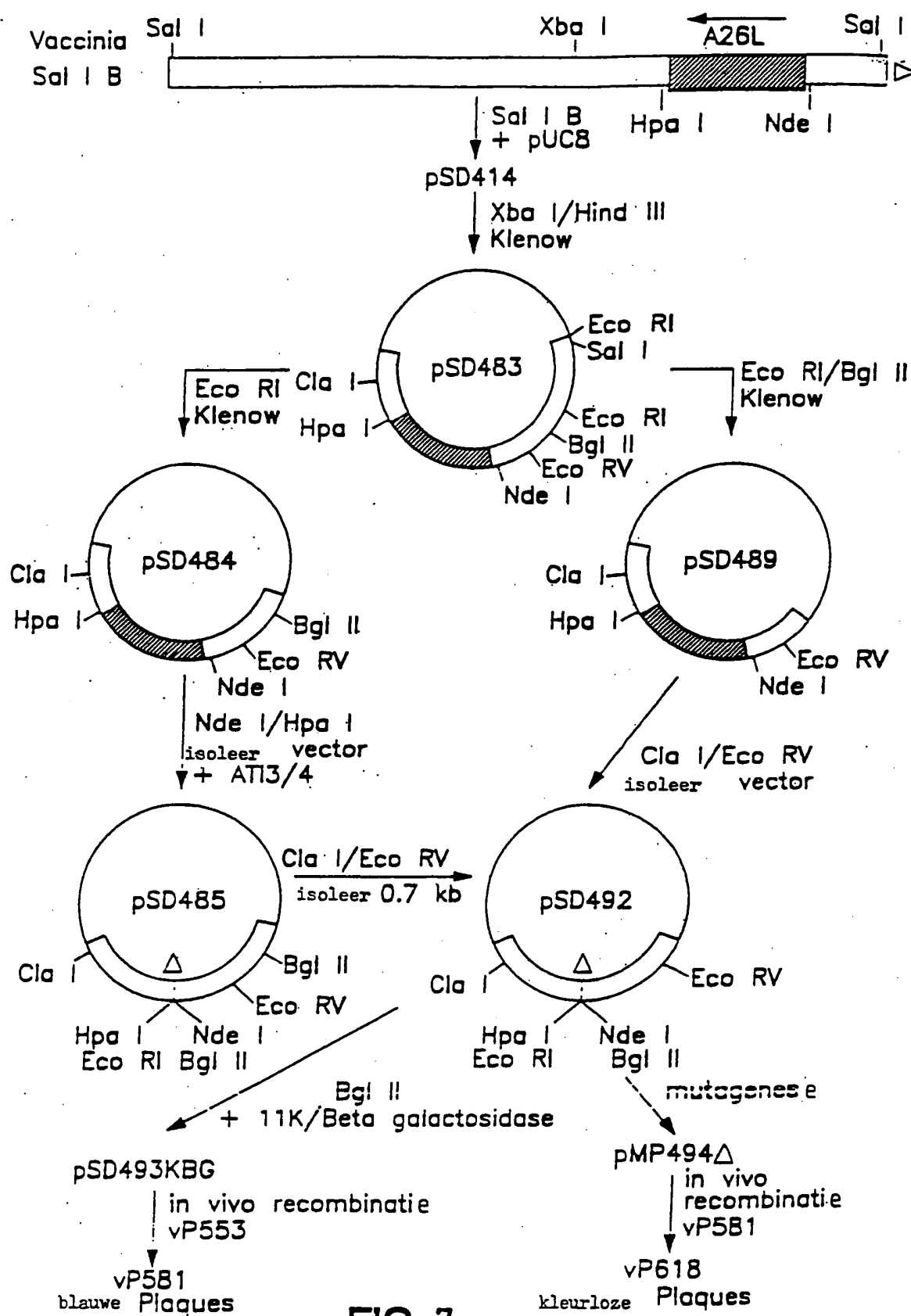


FIG. 6



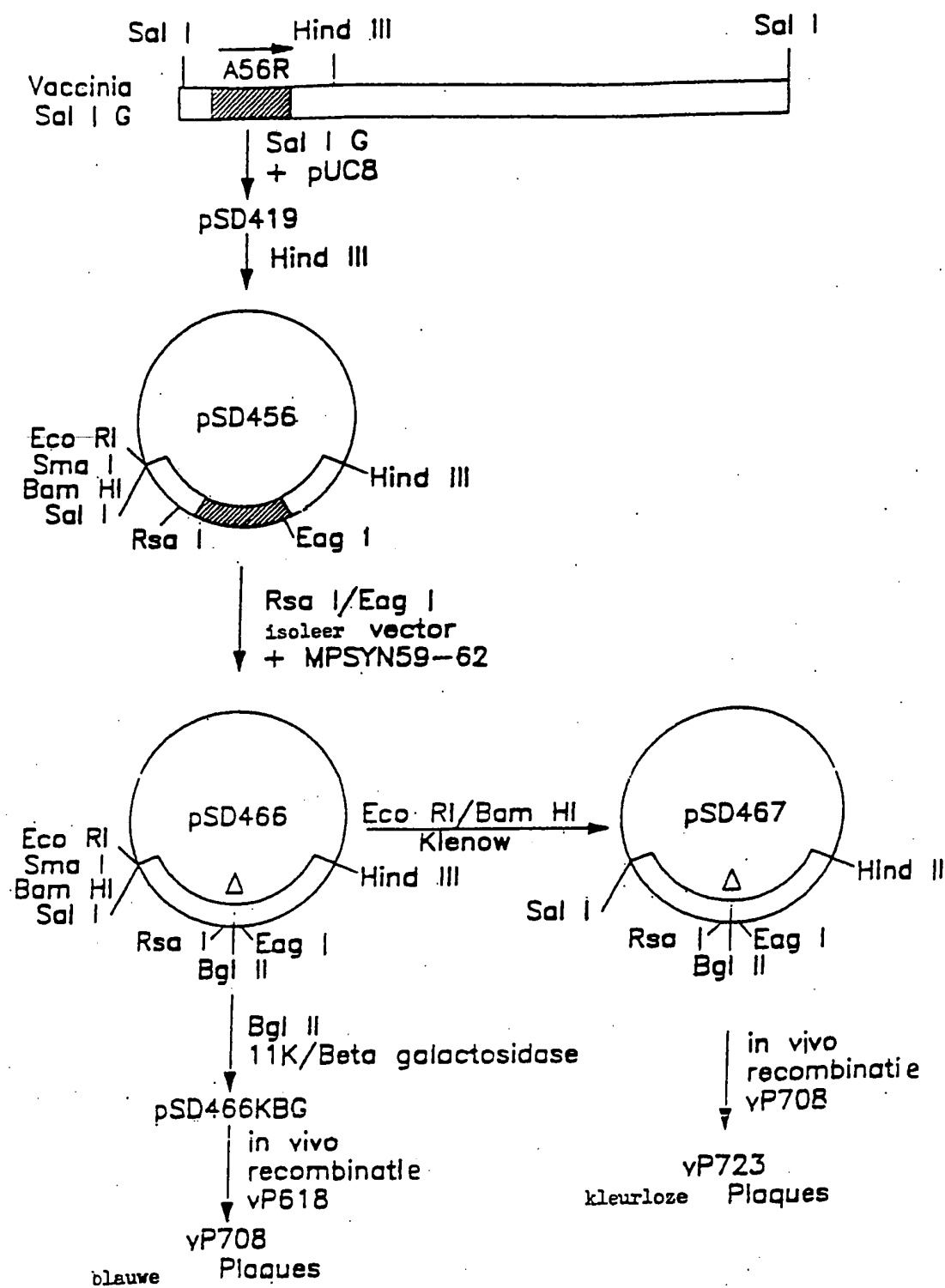


FIG. 8

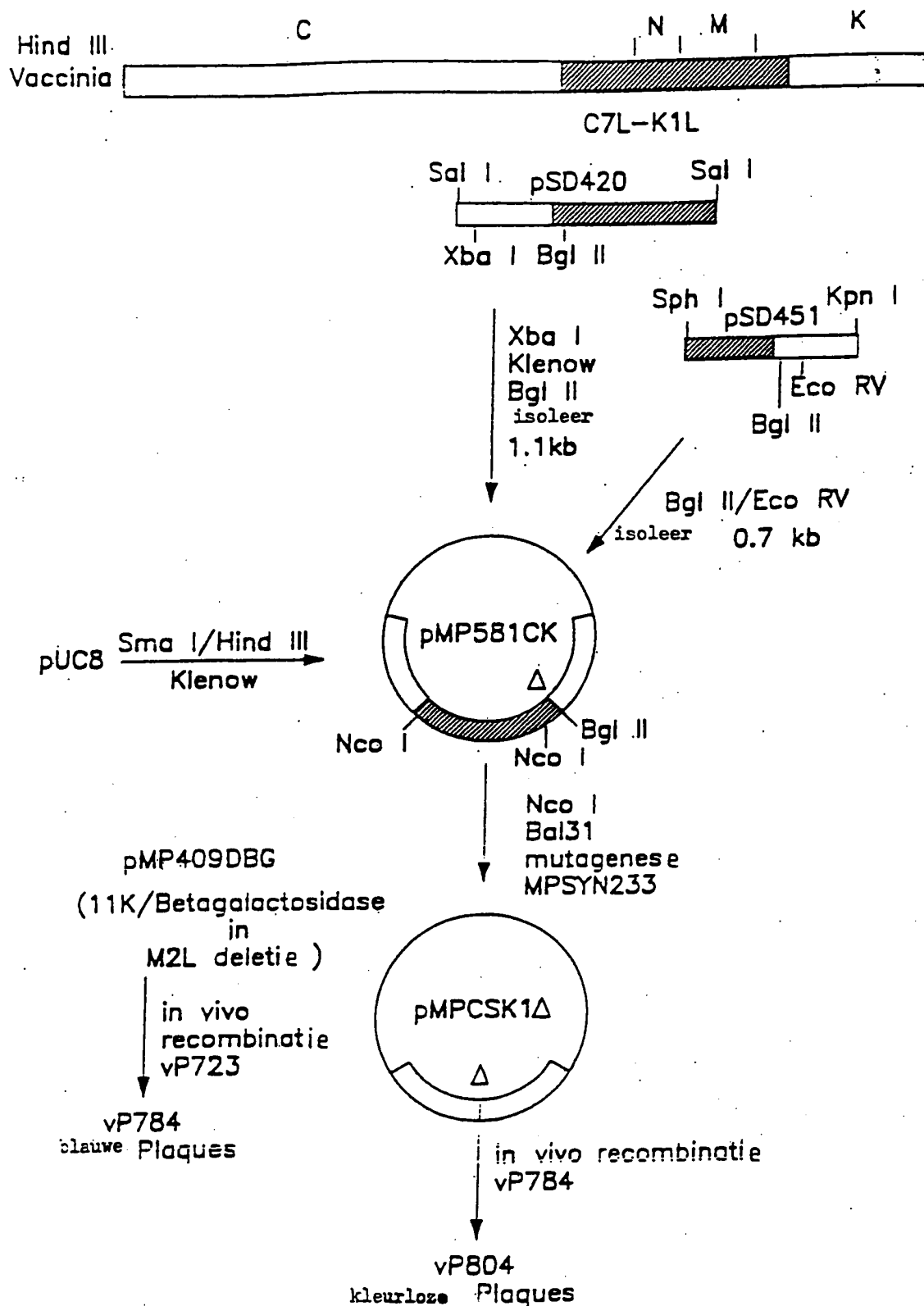


FIG. 9

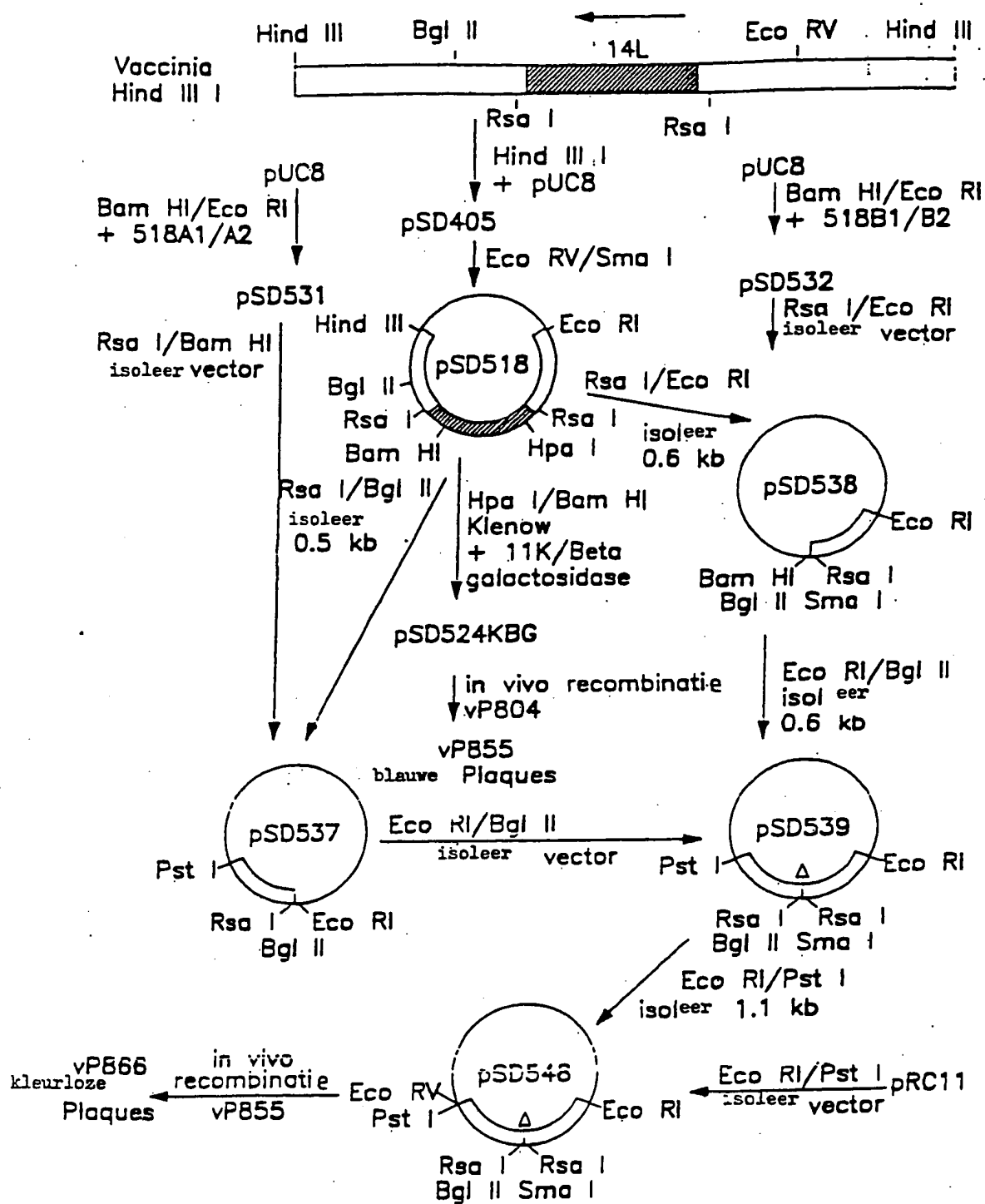


FIG.10

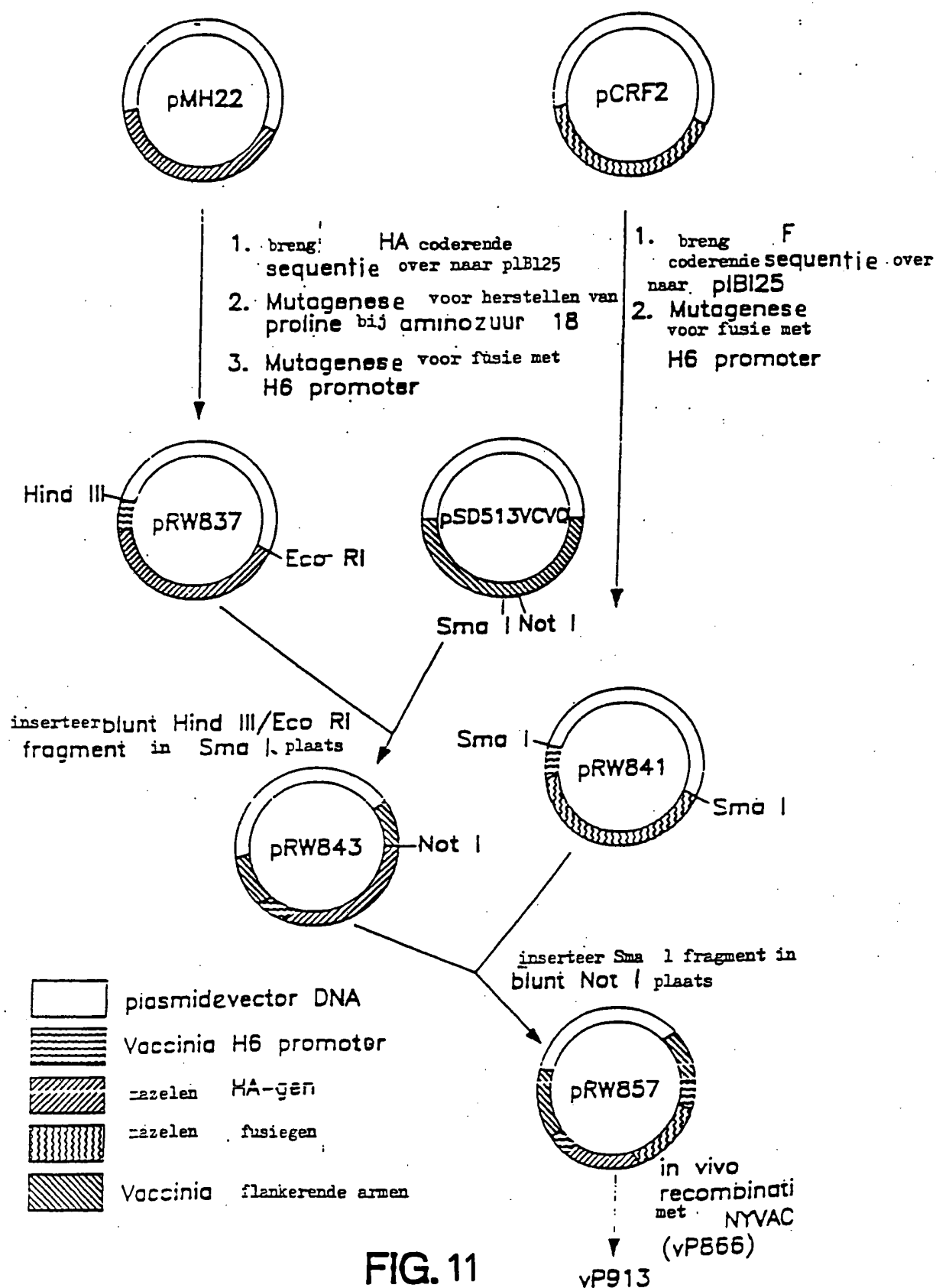


FIG. 11