(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 581 T2** 2006.09.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 680 331 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 581.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/00888**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 908 635.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/016716**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.01.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.08.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.12.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.09.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/86*** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 7/00 (2000.01)
C12N 7/01 (2000.01)

(30) Unionspriorität:

7115	**21.01.1993**	**US**
184009	**19.01.1994**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

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

(72) Erfinder:
PAOLETTI, Enzo, Delmar, US; TARTAGLIA, James, SCHENECTADY, US; COX, William I., Troy, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **IMMUNTHERAPIE DURCH REKOMBINANTEN VIRUS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Efindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Avipoxvirus und Verfahren zur Herstellung und Verwendung desselben. Genauer betrifft die Erfindung verbesserte Vektoren für die Insertion und Expression von fremden Genen zur Verwendung als sichere Immunisierungsvehikel, um gegen eine Vielzahl von Pathogenen zu schützen, so wie zur Verwendung in der Immuntherapie.

[0002] Auf einige Veröffentlichungen wird in dieser Anmeldung Bezug genommen. Die vollständige Anführung dieser Bezugnahmen wird am Ende der Beschreibung, unmittelbar vor den Ansprüchen oder wo die Veröffentlichung erwähnt ist, gefunden. Diese Veröffentlichungen betreffen das Fachgebiet, zu dem diese Erfindung gehört.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Vacciniavirus und vor kurzem andere Pockenviren sind für die Insertion und Expression von fremden Genen verwendet worden. Die Basistechnik des Inserierens von fremden Genen in einen lebenden infektiösen Pockenvirus involviert die Rekombination zwischen den Pocken-DNA-Sequenzen, die ein fremdes genetisches Element in einem Donorplasmid flankieren, und homologen Sequenzen, die in dem rettenden Pockenvirus vorhanden sind (Piccini et al., 1987).

[0004] Im Speziellen werden die rekombinanten Pockenviren in zwei Schritten konstruiert, die auf dem Fachgebiet bekannt und analog zu den Verfahren zum Bilden von synthetischen Rekombinanten von Pockenviren sind, wie das Vacciniavirus und das Avipoxvirus, beschrieben in US-Patent Nr. 4,769,330, 4,772,848, 4,603,112, 5,100,587 und 5,179,993.

[0005] Zuerst wird die DNA-Gensequenz, die in das Virus inseriert werden soll, insbesondere ein offener Leserahmen von einer nicht-Pocken-Quelle, in ein E. coli-Plasmidkonstrukt platziert, in das DNA, die homolog zu einem Teil der DNA des Pockenvirus ist, inseriert worden ist. Getrennt davon wird die DNA-Gensequenz, die inseriert werden soll, an einen Promotor ligiert. Die Promotorgen-Verknüpfung ist im Plasmidkonstrukt so positioniert, dass die Promotorgen-Verknüpfung an beiden Enden durch DNA flankiert ist, die homolog ist zu einer DNA-Sequenz, die eine Region der Pocken-DNA flankiert, die einen nicht-essentiellen Lokus enthält. Das resultierende Plasmidkonstrukt wird dann durch Züchten in E. coli-Bakterien amplifiziert (Clewell, 1972) und isoliert (Clewell et al., 1969; Maniatis et al., 1982).

[0006] Als zweites wird das isolierte Plasmid, das die DNA-Gensequenz, die inseriert werden soll, enthält, in eine Zellkultur, z.B. Hühnerembryofibroblasten, zusammen mit dem Pockenvirus transfiziert. Rekombination zwischen homologer Pocken-DNA im Plasmid beziehungsweise dem viralen Genom ergibt ein Pockenvirus, das durch die Anwesenheit von fremden DNA-Sequenzen in einer nicht-essentiellen Region seines Genoms modifiziert wurde. Der Ausdruck „fremde" DNA bezeichnet exogene DNA, insbesondere DNA von einer nicht-Pocken-Quelle, die Genprodukte codiert, die gewöhnlich nicht durch das Genom, in das die exogene DNA platziert wurde, produziert werden.

[0007] Genetische Rekombination ist im Allgemeinen der Austausch von homologen Sektionen von DNA zwischen zwei Strängen der DNA. Bei bestimmten Viren kann RNA DNA ersetzen. Homologe Sektionen von Nucleinsäure sind Sektionen von Nucleinsäure (DNA oder RNA), die die selbe Sequenz von Nucleotidbasen aufweisen.

[0008] Genetische Rekombination kann natürlicherweise während der Replikation oder Herstellung von neuen vitalen Genomen innerhalb der infizierten Wirtszelle stattfinden. Daher kann genetische Rekombination zwischen vitalen Genen während des vitalen Replikationszyklus erfolgen, der in einer Wirtszelle stattfindet, die mit zwei oder mehreren verschiedenen Viren oder anderen genetischen Konstrukten co-infiziert wurde. Eine Sektion der DNA eines ersten Genoms wird austauschbar beim Konstruieren der Sektion des Genoms eines zweiten co-infizierenden Virus verwendet, in dem die DNA homolog mit jener des ersten vitalen Genoms ist.

[0009] Rekombination kann jedoch auch zwischen Sektionen von DNA in unterschiedlichen Genomen stattfinden, die nicht völlig homolog sind. Wenn eine solche Sektion von einem ersten Genom homolog mit einer Sektion eines anderen Genoms ist, mit Ausnahme, dass innerhalb der ersten Sektion zum Beispiel ein genetischer Marker oder ein Gen, das eine antigene Determinante codiert, anwesend ist, die in einen Teil der ho-

mologen DNA inseriert worden ist, kann Rekombination noch immer stattfinden, und die Produkte jener Rekombination sind dann durch die Anwesenheit jenes genetischen Markers oder Gens im rekombinanten viralen Genom nachweisbar. Von zusätzlichen Strategien zur Erzeugung von rekombinantem Vacciniavirus ist vor kurzem berichtet worden (Scheiflinger et al., 1992; Merchlinsky und Moss, 1992).

[0010] Erfolgreiche Expression der inserierten genetischen DNA-Sequenz durch das modifizierte infektiöse Virus erfordert zwei Bedingungen. Erstens, die Insertion muss in eine nicht-essentielle Region des Virus erfolgen, damit das modifizierte Virus lebensfähig bleibt. Die zweite Bedingung für die Expression der inserierten DNA ist die Anwesenheit eines Promotors im richtigen Verhältnis zu der inserierten DNA. Der Promotor muss so platziert sein, dass er stromaufwärts der DNA-Sequenz, die exprimiert werden soll, lokalisiert ist.

[0011] Vacciniavirus ist erfolgreich verwendet worden, um gegen Pocken zu immunisieren, was in der weltweiten Ausrottung von Pocken in 1980 gipfelte. Im Verlauf seiner Geschichte sind viele Stämme von Vaccinia entstanden. Diese unterschiedlichen Stämme zeigen verschiedene Immunogenität und bringen zu verschiedenen Graden potenzielle Komplikationen mit sich, die schwersten davon sind Enzephalitis und generalisierte Vaccinia nach der Impfung (Behbehani, 1983).

[0012] Mit der Ausrottung der Pocken wurde eine neue Rolle für Vaccinia wichtig, jene eines gentechnisch manipulierten Vektors für die Expression von fremden Genen. Gene, die eine riesige Zahl von heterologen Antigenen codieren, sind in Vaccinia exprimiert worden, was oft in schützender Immunität gegen die Herausforderung durch das korrespondierende Pathogen resultierte (Literaturübersicht in Tartaglia et al., 1990a, b).

[0013] Für den genetischen Hintergrund des Vaccinia-Vektors wurde gezeigt, dass er die Schutzwirkung des exprimierten fremden Immunogens beeinflusst. Zum Beispiel schützte die Expression des Epstein-Barr-Virus (EBV)-gp340 im Wyeth-Impfstamm des Vacciniavirus Baumwollspitzen-Tamarine nicht gegen EBV-induziertes Lymphom, während die Expression desselben Gens im WR-Laborstamm des Vacciniavirus schützend war (Morgan et al., 1988).

[0014] Eine feine Balance zwischen der Wirksamkeit und der Sicherheit eines rekombinanten, Vacciniavirus-basierenden Impfstoff-Kandidaten ist außerordentlich wichtig. Das rekombinante Virus muss das (die) Immunogen(e) in einer Weise darbieten, die eine schützende Immunreaktion im geimpften Tier hervorruft, dem aber jegliche signifikante pathogene Eigenschaften fehlen. Daher würde Abschwächung des Vektorstamms ein hoch-wünschenswerter Vorteil gegenüber dem derzeitigen Stand der Technik sein.

[0015] Eine Zahl von Vacciniagenen ist identifiziert worden, die nicht essentiell für das Wachstum des Virus in Gewebekultur sind und deren Deletion oder Inaktivierung die Virulenz in einer Vielzahl von Tiersystemen reduziert.

[0016] Das Gen, das die Vacciniavirus-Thymidinkinase (TK) codiert, ist kartiert (Hruby et al., 1982) und sequenziert worden (Hruby et al., 1983; Weir et al., 1983). Inaktivierung oder völlige Deletion des Thymidinkinasegens verhindert das Wachstum von Vacciniavirus in einer großen Vielzahl von Zellen in Gewebekultur nicht. TK^--Vacciniavirus ist auch an der Stelle der Beimpfung in einer Vielzahl von Wirten durch eine Vielzahl von Wegen zur Replikation in vivo fähig.

[0017] Für Herpes simplex-Virus Typ 2 ist gezeigt worden, dass intravaginale Beimpfung von Meerschweinchen mit TK^--Virus in deutlich niedrigeren Virustitern im Rückenmark resultierte als Beimpfung mit TK^+-Virus (Stanberry et al., 1985). Es ist gezeigt worden, dass Herpesvirus, das TK-Aktivität codiert, in vitro für das Viruswachstum in aktiv metabolisierenden Zellen nicht wichtig war, aber nötig war für das Viruswachstum in Zellen im Ruhestadium (Jamieson et al., 1974).

[0018] Abschwächung von TK^--Vaccinia ist bei Mäusen, die auf den intracerebralen und intraperitonealen Wegen beimpft worden sind, gezeigt worden (Buller et al., 1985). Abschwächung wurde sowohl für den neurovirulenten WR-Laborstamm als auch für den Wyeth-Impfstamm beobachtet. In Mäusen, die auf dem intradermalen Weg beimpft worden sind, erzeugte rekombinantes TK^--Vaccinia äquivalente anti-Vaccinia-neutralisierende Antikörper verglichen mit dem Eltern TK^+ Vacciniavirus, was darauf hinweist, dass in diesem Testsystem der Verlust der TK-Funktion die Immunogenität des Vacciniavirusvektors nicht signifikant senkt. Nach intranasaler Beimpfung von Mäusen mit rekombinantem TK^-- und TK^+-Vacciniavirus (WR-Stamm) ist eine signifikant geringere Ausbreitung des Virus auf andere Stellen einschließlich dem Gehirn gefunden worden (Taylor et al., 1991a).

[0019] Ein anderes Enzym, das in den Nucleotidmetabolismus involviert ist, ist Ribonucleotid-Reduktase. Für den Verlust der viral codierten Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität im Herpes simplex-Virus (HSV) durch Deletion des Gens, das die große Untereinheit codiert, wurde gezeigt, dass er keinen Effekt auf virales Wachstum und DNA-Synthese in sich teilenden Zellen in vitro hat, aber die Fähigkeit des Virus, auf Serum-gehungerten Zellen zu wachsen, stark beeinträchtigte (Goldstein et al., 1988). Unter Verwendung eines Mausmodells für akute HSV-Infektion des Auges und reaktivierbare latente Infektion in den trigeminalen Ganglien wurde reduzierte Virulenz für HSV, von dem die große Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase deletiert worden war, im Vergleich zu der Virulenz, die von Wildtyp-HSV gezeigt wird, gezeigt (Jacobson et al., 1989).

[0020] Sowohl die kleinen (Slabaugh et al., 1988) als auch die großen (Schmitt et al., 1988) Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase sind im Vacciniavirus identifiziert worden. Insertionale Inaktivierung der großen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase im WR-Stamm von Vacciniavirus führt zur Abschwächung des Virus, gemessen durch intrakraniale Beimpfung von Mäusen (Child et al., 1990).

[0021] Das Vacciniavirus-Hämagglutinin-Gen (HA) ist kartiert und sequenziert worden (Shida, 1986). Das HA-Gen des Vacciniavirus ist nicht essentiell für das Wachstum in Gewebekultur (Ichihashi et al., 1971). Die Inaktivierung des HA-Gens des Vacciniavirus resultiert in reduzierter Neurovirulenz bei Kaninchen, die auf dem intrakranialen Weg beimpft worden sind, und zu kleineren Läsionen bei Kaninchen an der Stelle der intradermalen Beimpfung (Shida et al., 1988). Der HA-Locus wurde für die Insertion von fremden Genen in den WR-Stamm (Shida et al., 1987), in Derivate des Lister-Stamms (Shida et al., 1988) und in den Copenhagen-Stamm (Guo et al., 1989) des Vacciniavirus verwendet. Von rekombinantem HA^--Vacciniavirus, das fremde Gene exprimiert, ist gezeigt worden, dass es immunogen (Guo et al., 1989; Itamura et al., 1990; Shida et al., 1988; Shida et al., 1987) und schützend gegen die Herausforderung durch das relevante Pathogen ist (Guo et al., 1989; Shida et al., 1987).

[0022] Kuhpockenvirus (Brighton red-Stamm) produziert rote (hämorrhagische) Pocken auf der Chorioallantois-Membran von Hühnereiern. Spontane Deletionen im Kuhpocken-Genom erzeugen Mutanten, die weiße Pocken produzieren (Pickup et al., 1984). Die hämorrhagische Funktion (u) bildet sich auf einem 38 kDa-Protein ab, das durch ein frühes Gen codiert wird (Pickup et al., 1986). Von diesem Gen, das Homologie mit Serin-Proteaseinhibitoren aufweist, ist gezeigt worden, dass es die entzündliche Reaktion des Wirts auf Kuhpockenvirus inhibiert (Palumbo et al., 1989) und ein Inhibitor der Blutgerinnung ist.

[0023] Das u-Gen ist im WR-Stamm des Vacciniavirus vorhanden (Kotwal et al., 1989b). Mäuse, die mit einer WR-Vacciniavirus-Rekombinante beimpft wurden, in der die u-Region durch Insertion eines fremden Gens inaktiviert worden ist, produzierten im Vergleich zu Mäusen, die mit einem ähnlichen rekombinanten Vacciniavirus beimpft wurden, im dem das u-Gen intakt ist, höhere Antikörperspiegel des fremden Genprodukts (Zhou et al., 1990). Die u-Region ist in einer defekten, nicht-funktionellen Form im Copenhagen-Stamm des Vacciniavirus vorhanden (offene Leserahmen B13 und B14 in der Terminologie, die in Goebel et al., 1990a, b berichtet wurde).

[0024] Das Kuhpockenvirus ist in infizierten Zellen in cytoplasmatischen Einschlußkörpern vom Typ A (ATI) lokalisiert worden (Kato et al., 1959). Von der Funktion der ATI wird angenommen, dass sie der Schutz von Kuhpockenvirus-Virionen während der Ausbreitung von Tier zu Tier sind (Bergoin et al., 1971). Die ATI-Region des Kuhpocken-Genoms codiert ein 160 kDa-Protein, das die Matrix der ATI-Körper bildet (Funahashi et al., 1988; Patel et al., 1987). Vacciniavirus, obwohl es eine homologe Region in seinem Genom enthält, produziert im Allgemeinen keine ATI. Im WR-Stamm von Vaccinia wird die ATI-Region des Genoms als ein 94 kDa-Protein translatiert (Patel et al., 1988). Im Copenhagen-Stamm des Vacciniavirus sind die meisten der DNA-Sequenzen, die mit der ATI-Region korrespondieren, deletiert, und das verbleibende 3'-Ende der Region ist mit den Sequenzen stromaufwärts der ATI-Region fusioniert, um den offenen Leserahmen (ORF) A26L zu bilden (Goebel et al., 1990a, b).

[0025] Über eine Vielzahl von spontanen (Altenburger et al., 1989; Drillien et al., 1981; Lai et al., 1989; Moss et al., 1981; Paez et al., 1985; Panicali et al., 1981) und manipulierten (Perkus et al., 1991; Perkus et al., 1989; Perkus et al., 1986) Deletionen ist nahe dem linken Ende des Vacciniavirus-Genoms berichtet worden. Von einem WR-Stamm des Vacciniavirus mit einer spontanen 10 kb-Deletion (Moss et al., 1981; Panicali et al., 1981) wurde gezeigt, dass er durch intrakraniale Beimpfung in Mäusen abgeschwächt wird (Buller et al., 1985). Von dieser Deletion wurde später gezeigt, dass sie 17 potenzielle ORFs einschließt (Kotwal et al., 1988b). Bestimmte Gene innerhalb der deletierten Region schließen das Virokin N1L und ein 35 kDa-Protein ein (C3L nach der Terminologie, die in Goebel et al., 1990a, b berichtet wurde). Insertionale Inaktivierung von N1L reduziert durch intrakraniale Beimpfung die Virulenz sowohl für normale als auch für Nacktmäuse (Kotwas et al.,

1989a). Das 35 kDa-Protein wird wie N1L in das Medium von Vacciniavirus-infizierten Zellen sezerniert. Das Protein enthält Homologie zu der Familie von Komplement-Kontroll-Proteinen, besonders dem Komplement 4B-Bindungsprotein (C4bp) (Kotwal et al., 1988a). Wie das zelluläre C4bp bindet das Vaccinia 35 kDa-Protein die vierte Komponente des Komplements und inhibiert die klassische Komplementkaskade (Kotwal et al., 1990). Daher scheint das Vaccinia-35 kDa-Protein beim Helfen des Virus, Wirtsabwehrmechanismen zu umgehen, involviert zu sein.

[0026] Das linke Ende des Vaccinia-Genoms schließt zwei Gene ein, die als Wirts-Bereichsgene K1L (Gillard et al., 1986) und C7L (Perkus et al., 1990) identifiziert worden sind. Die Deletion von diesen beiden Gene reduziert die Fähigkeit des Vacciniavirus, auf einer Vielzahl von menschlichen Zelllinien zu wachsen (Perkus et al., 1990).

[0027] Zwei zusätzliche Impfstoff-Vektorsysteme beziehen die Verwendung von den auf natürliche Weise auf den Wirt beschränkten Pockenviren, den Avipoxviren, ein. Sowohl Geflügelpockenvirus (FPV) als auch Kanarienpockenvirus (CPV) sind manipuliert worden, um fremde Genprodukte zu exprimieren. Das Geflügelpockenvirus (FPV) ist der Virus-Prototyp der Avipox-Gattung der Pockenvirus-Familie. Das Virus bewirkt eine wirtschaftlich wichtige Krankheit von Geflügel, die seit den 1920ern durch die Verwendung von abgeschwächten Lebendimpfstoffen gut kontrolliert worden ist. Die Replikation der Avipoxviren ist auf Vogelarten limitiert (Matthews, 1982b) und es gibt keine Berichte in der Literatur von Avipoxviren, die eine produktive Infektion in irgendwelchen nicht-Vogelarten einschließlich dem Menschen verursachen. Diese Wirts-Einschränkung liefert eine angeborene Sicherheitsbarriere gegen Übertragung des Virus auf andere Arten und macht die Verwendung von Avipoxvirus-basierenden Impfstoffvektoren in Veterinär- und menschlichen Anwendungen zu einem vielversprechenden Vorschlag.

[0028] FPV ist vorteilhaft als ein Vektor verwendet worden, der Antigene von Geflügelpathogenen exprimiert. Das Hämagglutinin-Protein eines virulenten Vogel-Influenzavirus wurde in einer FPV-Rekombinante exprimiert (Taylor et al., 1988a).

[0029] Nach Beimpfen von Hühnern und Puten mit der Rekombinante wurde eine Immunreaktion induziert, die sowohl gegen eine homologe als auch eine heterologe virulente Influenzavirus-Herausforderung schützend war (Taylor et al., 1988a). FPV-Rekombinanten, die die Oberflächenglycoproteine des Newcastle-Krankheitsvirus exprimieren, sind auch entwickelt worden (Taylor et al., 1990; Edbauer et al., 1990).

[0030] Trotz der Wirts-Einschränkung für die Replikation von FPV und CPV auf Vogelsysteme wurde gefunden, dass Rekombinanten, die von diesen Viren abgeleitet wurden, extrinsische Proteine in Zellen von nicht-Vogel-Ursprung exprimieren. Darüber hinaus wurde für solche rekombinante Viren gezeigt, dass sie immunologische Reaktionen hervorrufen, die gegen das fremde Genprodukt gerichtet waren, und es wurde gezeigt, dass sie, wo es passend ist, Schutz vor Herausforderung gegen das entsprechende Pathogen bieten (Tartaglia et al., 1993a, b; Taylor et al., 1992; 1991b; 1988b).

[0031] In der Vergangenheit ist gezeigt worden, dass Viren für Krebsimmuntherapie nützlich sind, in sofern, dass sie ein Mittel zum Verstärken der Tumor-Immunreaktion liefern. Es gibt Beispiele, die zeigen, dass Viren wie das Newcastle-Krankheitsvirus (Cassel et al., 1983), das Influenzavirus (Lindenmann, 1974; Lindenmann, 1967) und das Vacciniavirus (Wallack et al., 1986; Shimizu et al., 1988; Shimizu et al., 1984; Fujiwara et al., 1984) als Tumor-modifizierende Antigene oder Adjuvanzien wirken könne, was im Induzieren von Tumor-spezifischen und nicht-Tumor-spezifischen Immuneffektor-Mechanismen resultiert. Auf Grund der Fortschritte auf den Gebieten der Immunologie, Tumorbiologie und Molekularbiologie haben solche Ansätze jedoch mehr gerichtete immuntherapeutische Ansätze für Krebs erbracht. Die Genetische Modifizierung von Tumorzellen und Immuneffektorzellen (d.h. Tumor-infiltrierende Lymphocyten, TILs), um zum Beispiel Cytokine zu exprimieren, hat viel versprechende Ergebnisse in Tiermodellen und Menschen in Bezug auf Verstärkung von Tumor-gerichteten Immunreaktionen geliefert (Pardoll, 1992; Rosenberg, 1992). Darüber hinaus hat die Definition von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) die Möglichkeit geliefert, ihre Rolle in der Immunbiologie von bestimmten Krebsarten zu untersuchen, was schlussendlich auf ihre Verwendung in Krebsprävention oder -Therapie angewendet werden kann (van der Bruggen, 1992).

[0032] Fortschritte in der Verwendung von eukaryontischen Impfstoff-Vektoren haben ein erneutes Interesse an Viren für Krebsprävention und -Therapie geliefert. Unter den Viren, die manipuliert worden sind, um fremde Genprodukte zu exprimieren, sind Adenoviren, das Adeno-assoziierte Virus, Baculovirus, Herpesviren, Pockenviren und Retroviren. Vor allem auf Retrovirus-, Adenovirus- und Pockenvirus-basierende rekombinante Viren sind mit der Absicht zur in vivo-Nutzung in den Bereichen von Vektor-basierenden Impfstoffen, Genthe-

rapie und Krebstherapie entwickelt worden (Tartaglia, im Druck; Tartaglia, 1990).

[0033] Immuntherapeutische Ansätze, um Krebsarten oder Neoplasie zu bekämpfen, können die Form von klassischen Impfschemata oder Zell-basierenden Therapien einnehmen. Immuntherapeutische Impfung ist das Konzept des Induzierens oder Verstärkens von Immunreaktionen des Krebspatienten auf antigene Determinanten, die einmalig oder in erhöhten Spiegeln auf Tumorzellen exprimiert werden. Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) sind normalerweise von solch schwacher Immunogenität, dass sie ein Fortschreiten des Tumors ungehindert durch das Immunsystem des Patienten ermöglichen. Unter normalen Umständen schreitet die Schwere des Krankheitsstatus, der mit dem Tumor assoziiert ist, schneller fort als die Ausbildung von Immunreaktionen, wenn vorhanden, auf die Tumorzellen. Folglich kann der Patient der Neoplasie erliegen, bevor eine ausreichende Immunreaktion aufgebaut ist, um das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors zu verhindern.

[0034] Pockenvirus-Vektortechnologie ist ausgenutzt worden, um immunologische Reaktionen auf TAAs hervorzurufen. Es gibt Beispiele, die die Wirksamkeit von Pockenvirus-basierenden rekombinanten Viren, die TAAs exprimieren, in Tiermodellen in der Immunprophylaxe und Immuntherapie von experimentell induzierten Tumoren zeigen. Das Gen, das carcinoembryonales Antigen (CEA) codiert, wurde von menschlichen Colontumorzellen isoliert und in das Vacciniavirus-Genom inseriert (Kaufman et al., 1991). Beimpfen mit dem rekombinanten Vacciniavirus-basierenden CEA rief CEA-spezifische Antikörper und eine anti-Tumor-Wirkung in einem murinen Mausmodell hervor. Es ist gezeigt worden, dass dieses rekombinante Virus humorale und zellvermittelte Reaktionen in Rhesusaffen hervorruft (Kantor et al., 1993). Das menschliche Melanom-TAA p97 ist auch in Vacciniavirus inseriert worden, und es wurde gezeigt, dass es Mäuse vor Tumortransplantaten schützt (Hu et al., 1988; Estin et al., 1988). Ein weiteres Beispiel wurde durch Bernards et al., (1987) beschrieben. Diese Forscher konstruierten eine Vaccinia-Rekombinante, die die extrazelluläre Domäne des Ratten neu-codierten Transmembran-Glycoproteins p185 exprimierte. Mäuse, die mit diesem rekombinanten Virus immunisiert wurden, entwickelten eine starke humorale Reaktion gegen das neu-Genprodukt und waren gegen nachfolgende Tumor-Herausforderung geschützt. Vacciniavirus-Rekombinanten, die entweder eine sezernierte oder eine Membran-verankerte Form eines Brustkrebs-assoziierten epithelialen Tumorantigens (ETA) exprimieren, sind zur Evaluierung in der aktiven Immuntherapie von Brustkrebs hergestellt worden (Hareuveni et al., 1991; 1990). Es ist gezeigt worden, dass diese rekombinanten Viren anti-ETA-Antikörper in Mäusen hervorrufen und Mäuse gegen eine tumorigene Herausforderung mit einer ras-transformierten Fischer-Rattenfibroblastline schützen, die beide Formen von ETA exprimiert (Hareuveni et al., 1990). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass Vacciniavirus-Rekombinanten, die das Polyomavirus-abgeleitete T-Ag exprimieren, wirksam für die Prävention und Therapie in einem Maus-Tumormodellsystem sind (Lathe et al., 1987).

[0035] Rekombinante Vacciniaviren sind auch verwendet worden, um Cytokingene zu exprimieren (Literaturübersicht von Ruby et al., 1992). Die Expression von bestimmten Cytokinen (IL-2, IFN-α, TNF-α) führt zu selbst-limitierender Vacciniavirus-Infektion in Mäusen und bewirkt im Wesentlichen, das Virus abzuschwächen. Es wurde gefunden, dass die Expression von anderen Cytokinen (d.h. IL-5, IL-6) die Immunreaktion auf co-exprimierte extrinsische Immunogene moduliert (Literaturübersicht von Ruby et al., 1992).

[0036] Häufig werden Immunreaktionen gegen Tumorzellen durch T-Zellen, besonders cytotoxische T-Lymphocyten (CTLs); weiße Blutzellen, die in der Lage sind, Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen zu töten, vermittelt (Greenberg, 1991). Das Verhalten von CTLs wird durch lösliche Faktoren reguliert, die Cytokine genannt werden. Cytokine lenken das Wachstum, die Differenzierung und die funktionellen Eigenschaften von CTLs so wie von anderen Immuneffektorzellen.

[0037] Es ist gezeigt worden, dass auf Zellen basierende Immuntherapie eine wirksame Therapie für Viren und Tumoren in Tiermodellen liefert (Greenberg, 1991; Pardoll, 1992; Riddel et al., 1992). Cytomegalovirus (CMV)-spezifische CTL-Clone von Knochenmarkspendern sind kürzlich isoliert worden. Diese Clone wurde vermehrt und in vitro expandiert und letztendlich in immundefiziente Knochenmarkpatienten zurückgeführt. Diese transferierten CMV-spezifischen CTL-Clone lieferten keine toxischen Effekte und lieferten beständige Wiederherstellung von CMV-spezifischen $CD8^+$-CTL-Reaktionen, die CMV-Infektion im Transplantat-Patienten verhinderten (Riddel et al., 1992). Carlos et al., The Lancet 339 (1992), 1429–1432 beschreibt die Konstruktion eines rekombinanten Kanarienpockenvirus, das das Tollwut-Glycoprotein G-Gen trägt. Antikörper gegen den Vektor und das inserierte Protein wurden beobachtete.

[0038] WO92/19266 offenbart rekombinante Vacciniavektoren, die das CEA-Gen tragen. Unter eine Liste von anderen potentiellen viralen Vektoren werden Geflügelpocken erwähnt. Die rekombinanten Vektoren können in Verbindung mit einem biologischen Reaktionsmodifizierer wie IL-2 verabreicht werden. In 25% von immunisierten Affen wurden Antikörperreaktionen beobachtet.

[0039] Flexner und Mitarbeiter (Vaccine 8 (1990), 17–21) beschreiben die Herstellung eines rekombinanten Vacciniavirus, das Gene tragen kann, die HA und IL-2 codieren. Es wurde gezeigt, dass IL-2 die Bildung von Hautläsionen signifikant reduziert.

[0040] Keines der oben zitierten Dokumente lehrt oder schlägt die beanspruchte Erfindung vor.

[0041] Es gibt zwei Formen von Zell-basierender Immuntherapie. Diese sind adoptive Immuntherapie, die die Ausdehnung von Tumor-reaktiven Lymphocyten in vitro und die Reinfusion in den Wirt einschließt, und aktive Immuntherapie, die die Immunisierung von Tumorzellen einschließt, um existierende oder neue Tumor-spezifische Immunreaktionen potenziell zu verstärken bzw. hervorzurufen und systemisch anti-Tumor-Immunität zu liefern. Immuntherapeutische Impfung ist das Konzept des Induzierens oder Verstärkens von Immunreaktionen des Krebspatienten auf antigene Determinanten, die nur auf Tumorzellen exprimiert oder in erhöhten Spiegeln exprimiert werden.

[0042] Es kann angenommen werden, dass die Bereitstellung von neuen Stämmen wie NYVAC, ALVAC und TROVAC, die verstärkte Sicherheit aufweisen, ein höchst wünschenswerter Vorteil gegenüber dem derzeitigen Stand der Wissenschaft sein würde. Zum Beispiel, um sicherere Impfstoffe oder sicherere Produkte von der Expression von einem Gen oder von Genen durch einen Virus zu liefern.

ZIELE DER ERFINDUNG

[0043] Es ist daher ein Ziel dieser Erfindung, modifizierte rekombinante Avipoxviren gemäß dem Anspruch 1 zu liefern, wobei die Viren verstärkte Sicherheit aufweisen, und ein Verfahren zum Herstellen solcher rekombinanter Viren zu liefern.

[0044] Es ist ein zusätzliches Ziel dieser Erfindung, einen rekombinanten Avipoxvirus-Impfstoff zu liefern, der einen erhöhten Grad der Sicherheit im Vergleich zu bekannten rekombinanten Pockenvirus-Impfstoffen aufweist.

[0045] Diese und andere Ziele und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden nach in Betracht ziehen des Folgenden leichter offensichtlich werden.

AUSSAGE DER ERFINDUNG

[0046] In einem Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein modifiziertes rekombinantes Avipoxvirus gemäß Anspruch 1, das inaktivierte Virus-codierte genetische Funktionen aufweist, so dass das rekombinante Virus abgeschwächte Virulenz und erhöhte Sicherheit aufweist. Die Funktionen können nicht-essenziell oder mit Virulenz assoziiert sein. Das Virus ist ein Avipoxvirus, wie ein Geflügelpockenvirus und Kanarienpockenvirus. Das modifizierte rekombinante Virus schließt innerhalb einer nicht-essenziellen Region des Virus-Genoms heterologe DNA-Sequenzen ein, die zu mindestens ein Cytokin und ein Tumor-assoziiertes Antigen codieren.

[0047] In einem anderen Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf einen Impfstoff zum Induzieren einer antigenen Reaktion in einem Wirtstier, das mit dem Impfstoff beimpft worden ist, wobei der Impfstoff einen Träger und ein modifiziertes rekombinantes Virus einschließt, das inaktivierte nicht-essenzielle Virus-codierte genetische Funktionen aufweist, so dass das rekombinante Virus abgeschwächte Virulenz und erhöhte Sicherheit wie oben aufweist. Das im Impfstoff gemäß der vorliegenden Erfindung verwendete Virus ist zweckmäßigerweise ein Avipoxvirus, wie ein Geflügelpockenvirus und ein Kanarienpockenvirus. Das modifizierte rekombinante Virus schließt innerhalb einer nicht-essenziellen Region des Virus-Genoms heterologe DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 ein.

[0048] In noch einem anderen Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine immunogene Zusammensetzung, die ein modifiziertes rekombinantes Avipoxvirus enthält, das inaktivierte nicht-essenzielle Virus-codierte genetische Funktionen aufweist, so dass das rekombinante Virus abgeschwächte Virulenz und erhöhte Sicherheit aufweist. Das modifizierte rekombinante Virus schließt innerhalb einer nicht-essenziellen Region des Virus-Genoms heterologe DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 ein, wobei die Zusammensetzung, wenn sie an einen Wirt verabreicht wird, in der Lage ist, eine immunologische Reaktion zu induzieren, die spezifisch für das Protein ist, das durch das Pathogen codiert wird.

[0049] In einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zum Exprimieren

eines Genprodukts in einer Zelle, die in vitro kultiviert wird, durch Einbringen eines rekombinanten Avipoxvirus, das abgeschwächte Virulenz und erhöhte Sicherheit aufweist, in die Zelle. Das modifizierte rekombinante Virus schließt innerhalb einer nicht-essenziellen Region des Virus-Genoms heterologe DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 ein.

[0050] Die genetischen Funktionen werden besonders durch Deletieren eines offenen Leserahmens, der einen Virulenzfaktor codiert, oder durch Ausnutzen von natürlicherweise Wirts-eingeschränkten Viren inaktiviert. Das gemäß der vorliegenden Erfindung verwendete Virus ist zweckmäßigerweise ein Avipoxvirus, wie ein Geflügelpockenvirus und ein Kanarienpockenvirus. Zweckmäßigerweise wird der offene Leserahmen aus der Gruppe ausgewählt, die aus J2R, B13R + B14R, A26L, A56R, C7L – K1L und I4L (nach der Terminologie, die in Goebel et al., 1990a, b berichtet wurde) besteht; und die Kombination davon. In dieser Hinsicht umfasst der offene Leserahmen ein Thymidinkinasegen, eine hämorrhagische Region, eine Einschlußkörper-Region vom Typ A, ein Hämagglutiningen, eine Wirtsbereich-Genregion oder eine große Untereinheit, eine Ribonucleotid-Reduktase; oder die Kombination davon. Der modifizierte Copenhagen-Stamm des Vacciniavirus wird als NYVAC identifiziert (Tartaglia et al., 1992).

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0051] Die folgende detaillierte Beschreibung, angegeben durch ein Beispiel, die aber die Erfindung nicht auf nur die beschriebenen spezifischen Ausführungsformen limitieren soll, kann am besten im Zusammenhang mit den begleitenden Zeichnungen verstanden werden, in denen:

[0052] Fig. 1 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pSD460 für die Deletion des Thymidinkinasegens und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP410 zeigt;

[0053] Fig. 2 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pSD486 für die Deletion der hämorrhagischen Region und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP553 zeigt;

[0054] Fig. 3 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pMP494Δ für die Deletion der ATI-Region und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP618 zeigt;

[0055] Fig. 4 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pSD467 für die Deletion des Hämagglutiningens und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP723 zeigt;

[0056] Fig. 5 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pMPCK1Δ für die Deletion des Genclusters [C7L – K1L] und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP804 zeigt;

[0057] Fig. 6 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pSD548 für die Deletion der großen Untereinheit, der Ribonucleotid-Reduktase und die Herstellung von rekombinantem Vacciniavirus vP866 (NYVAC) zeigt;

[0058] Fig. 7 schematisch ein Verfahren für die Konstruktion von Plasmid pRW842 für die Insertion des Tollwut-Glycoprotein G-Gens in den TK-Deletionslokus und die Herstellung vom rekombinanten Vacciniavirus vP879 zeigt;

[0059] Fig. 8 die DNA-Sequenz (SEQ ID NR:68) eines Kanarienpocken PvuII-Fragments, das den C5-ORF enthält, zeigt;

[0060] Fig. 9A und Fig. 9B schematisch ein Verfahren für die Konstruktion des rekombinanten Kanarienpockenvirus vCP65 (ALVAC-RG) zeigen;

[0061] Fig. 10 schematisch die ORFs zeigt, die deletiert wurden um NYVAC herzustellen;

[0062] Fig. 11 die Nucleotidsequenz (SEQ ID NR:77) eines Fragments der TROVAC-DNA zeigt, das einen F8-ORF enthält;

[0063] Fig. 12 die DNA-Sequenz (SEQ ID NR:78) eines 2356 Basenpaar-Fragments der TROVAC-DNA zeigt, das den F7-ORF enthält;

[0064] Fig. 13A bis Fig. 13D Zeichnungen von neutralisierenden Tollwut-Antikörpertitern (RFFIT, IE/ml) der

Booster-Wirkung von HDC und vCP65 ($10^{5.5}$ TCID50) bei Freiwilligen, die vorher mit entweder dem selben oder dem alternativen Impfstoff immunisiert worden sind (Impfstoffe gegeben an den Tagen 0, 28 und 180, Antikörpertiter gemessen an den Tagen 0, 7, 28, 35, 56, 173, 187 und 208), zeigen;

[0065] Fig. 14A bis Fig. 14C die Nucleotidsequenz eines 7351 bp-Fragments zeigen, das die ALVAC C3-Insertionsstelle (SEQ ID NR:127) enthält;

[0066] Fig. 15 die Nucleotidsequenzen der H6/TNF-α-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vCP245 (SEQ ID NR:79) zeigt;

[0067] Fig. 16 die Nucleotidsequenz der H6/TNF-α-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vP1200 (SEQ ID NR:89) zeigt;

[0068] Fig. 17 die Nucleotidsequenz der H6/p53 (Wildtyp)-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vP1101 (SEQ ID NR:99) zeigt;

[0069] Fig. 18 die Nucleotidsequenz der H6/p53 (Wildtyp)-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vCP207 (SEQ ID NR:99) zeigt;

[0070] Fig. 19 die Nucleotidsequenz der H6/MAGE-1-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vCP235 (SEQ ID NR:109) zeigt;

[0071] Fig. 20 die Nucleotidsequenz der H6/MAGE-1-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von pMAW037 (SEQ ID NR:110) zeigt;

[0072] Fig. 21A und B die Nucleotidsequenz der p126.15-SERA-cDNA-Insertion zusammen mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz (SEQ ID NR:119; 120) zeigen;

[0073] Fig. 22 die Nucleotidsequenz der H6/CEA-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von pH6.CEA.C3.2 (SEQ ID NR:144) zeigt;

[0074] Fig. 23 die Nucleotidsequenz der H6/CEA-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von pH6.CEA.HA (SEQ ID NR:145) zeigt;

[0075] Fig. 24 die Nucleotidsequenz des murinen IL-2 vom Translations-Startcodon bis zum Stoppcodon (SEQ ID NR:150) zeigt;

[0076] Fig. 25 die korrigierte Nucleotidsequenz des menschlichen IL-2 vom Translations-Startcodon bis zum Stoppcodon (SEQ ID NR:159) zeigt;

[0077] Fig. 26 die Nucleotidsequenz der I3L/murinen IFNγ-Expressionskassette (SEQ ID NR:163) zeigt;

[0078] Fig. 27 die Nucleotidsequenz der I3L/menschlichen IFNγ-Expressionskassette (SEQ ID NR:168) zeigt;

[0079] Fig. 28 die Nucleotidsequenz der Kanarienpocken-Insertion in pC6HIII3kb (SEQ ID NR:169) zeigt;

[0080] Fig. 29 die Nucleotidsequenz pC6L (SEQ ID NR:174) zeigt;

[0081] Fig. 30 die Nucleotidsequenz der E3L/murinen IL-4-Expressionskassette (SEQ ID NR:178) zeigt;

[0082] Fig. 31 die Nucleotidsequenz der Expressionskassette, die das E3L-gesteuerte menschliche IL-4-Gen umfasst (SEQ ID NR:186), zeigt;

[0083] Fig. 32 die Nucleotidsequenz der Vaccinia-E3L/hGMCSF-Expressionskassette (SEQ ID NR:191) zeigt;

[0084] Fig. 33 die Sequenz der EPV-42kDa/menschlichen IL-12-P40-Expressionskassette (SEQ ID NR:194) zeigt;

[0085] Fig. 34 die Nucleotidsequenz der Vaccinia-E3L/menschlichen IL-12-P35-Expressionskassette (SEQ ID NR:199) zeigt;

[0086] Fig. 35 die Nucleotidsequenz des murinen B7-Gens (SEQ ID NR:202) zeigt;

[0087] Fig. 36 die Durchfluss-cytometrische Analyse der murinen B7-Expression in NYVAC- und ALVAC-infizierten murinen Tumorzelllinien zeigt;

[0088] Fig. 37 die Nucleotidsequenz für das menschliche B7-Gen (SEQ ID NR:207) zeigt;

[0089] Fig. 38 das murine p53-Gen (SEQ ID NR:214) zeigt; und

[0090] Fig. 39 die codierende Sequenz für das menschliche p53-Gen (SEQ ID NR:215) zeigt;

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0091] TROVAC bezieht sich auf eine abgeschwächte Form von Geflügelpocken, die ein Plaque-cloniertes Isolat war, das vom FP-1-Impfstoffstamm des Geflügelpockenvirus abgeleitet ist, das für die Impfung von 1 Tag-alten Küken lizenziert ist. ALVAC ist ein abgeschwächter Kanarienpockenvirus-basierender Vektor, der ein Plaque-cloniertes Derivat des lizenzierten Kanarienpocken-Impfstoffs Kanapox (Tartaglia et al., 1992) war. ALVAC hat einige allgemeine Eigenschaften, die die selben sind wie einige allgemeine Eigenschaften von Kanapox. Es ist gezeigt worden, dass rekombinante ALVAC-basierende Viren, die extrinsische Immunogene exprimieren, auch als Impfstoffvektoren wirksam sind (Tartaglia et al., 1993a, b). Dieser Avipoxvektor ist für produktive Replikation auf Vogelarten beschränkt. Auf menschlichen Zellkulturen wird Kanarienpockenvirus-Replikation früh im viralen Replikationszyklus vor der viralen DNA-Synthese abgebrochen. Nichtsdestotrotz, wenn es verändert wird, um extrinsische Immunogene zu exprimieren, wird authentische Expression und Verarbeitung in vitro in Säugerzellen beobachtet, und Beimpfung in zahlreiche Säugerarten induziert Antikörper- und zelluläre Immunreaktionen auf das extrinsische Immunogen und liefert Schutz gegen Herausforderung mit dem verwandten Pathogen (Taylor et al., 1992; Taylor et al., 1991). Kürzliche klinische Versuche der Phase I einer Kanarienpocken/Tollwut-Glycoprotein-Rekombinante (ALVAC-RG) sowohl in Europa als auch in den Vereinigten Staaten zeigten, dass der experimentelle Impfstoff gut toleriert wurde und schützende Spiegel von Tollwutvirus-neutralisierenden Antikörpertitern induzierte (Cadoz et al., 1992; Fries et al., 1992). Zusätzlich zeigten periphere mononucleäre Blutzellen (PBMCs), die vom ALVAC-RG-Impfstoff abgeleitet wurden, signifikante Spiegel von Lymphocyten-Proliferation, wenn mit aufgereinigtem Tollwutvirus stimuliert worden ist (Fries et al., 1992).

[0092] ALVAC und TROVAC sind auch als einzigartig unter allen Pockenviren dadurch erkannt worden, dass das beratende Kommitee für rekombinante DNA der National Institutes of Health („NIH") (U.S. Public Health Service), das Richtlinien für die physikalische Eingrenzung von genetischem Material wie Viren und Vektoren ausgibt, d.h. Richtlinien für Sicherheitsverfahren für die Verwendung von solchen Viren und Vektoren, die auf der Pathogenität des bestimmten Virus oder Vektors basieren, eine Reduktion des physikalischen Eingrenzungsgrads von BL2 auf BL1 bewilligte. Kein anderes Pockenvirus hat einen physikalischen BL1-Eingrenzungsgrad. Sogar der Copenhagen-Stamm des Vacciniavirus – der übliche Pockenimpfstoff – hat einen höheren physikalischen Eingrenzungsgrad; nämlich BL2. Dementsprechend hat der Fachbereich erkannt, dass ALVAC und TROVAC eine niedrigere Pathogenität als jedes andere Pockenvirus aufweisen.

[0093] Es ist gezeigt worden, dass ALVAC-basierende rekombinante Viren in vitro spezifisch $CD8^+$-CTLs von menschlichen PBMCs stimulieren (Tartaglia et al., 1993a). Mäuse, die mit ALVAC-Rekombinanten, die verschiedene Formen des HIV-1-Hüllenglycoproteins exprimieren, immunisiert worden sind, erzeugten sowohl primäre als auch Gedächtnis-HIV-spezifische CTL-Reaktionen, die durch eine zweite Beimpfung abgerufen werden konnten (Tartaglia et al., 1993a). ALVAC-env-Rekombinanten (die das HIV-1-Hüllenglycoprotein exprimieren) stimulierten starke HIV-spezifische CTL-Reaktionen von mononucleären peripheren Blutzellen (PBMC) von HIV-1-infizierten Individuen (Tartaglia et al., 1993a). Akut infizierte autologe PBMC wurden als stimulierende Zellen für die verbleibenden PBMC verwendet. Nach 10 Tagen Inkubation in der Abwesenheit von exogenem IL-2 wurden die Zellen auf CTL-Aktivitäten bewertet. ALVAC-env stimulierte hohe Spiegel von anti-HIV-Aktivitäten. So eignen sich diese Vektoren gut für ex vivo-Stimulation von Antigen-reaktiven Lymphocyten; zum Beispiel für adoptive Immuntherapie wie die ex vivo-Expression von Tumor-reaktiven Lymphocyten und Reinfusion in den Wirt (Patienten).

[0094] Immunisierung des Patienten mit ALVAC- oder TROVAC-basierenden rekombinanten Viren, die TAAs

exprimieren, die durch die Tumorzellen des Patienten produziert werden, kann anti-Tumor-Immunreaktionen schneller und in ausreichenden Spiegeln hervorrufen, um die Tumorausbreitung zu verhindern oder aufzuhalten und potenziell die Tumorbelastung zu eliminieren.

[0095] Basierend auf den Abschwächungsprofilen der ALVAC- und TROVAC-Vektoren und ihrer gezeigten Fähigkeit, sowohl humorale als auch zelluläre immunologisch Reaktionen auf extrinsische Immunogene hervorzurufen (Tartaglia et al., 1993a, b; Taylor et al., 1992; Konishi et al., 1992), bieten solche rekombinante Viren einen deutlichen Vorteil gegenüber früher beschriebenen Vaccinia-basierenden rekombinanten Viren.

[0096] Das Immunisierungsverfahren für solche rekombinante Viren als immuntherapeutische Impfstoffe oder Zusammensetzungen kann auf einem parenteralem Weg erfolgen (intradermal, intramusculär oder subcutan). Solch eine Verabreichung ermöglicht eine systemische Immunreaktion gegen das (die) spezifische(n) TAA(s). Alternativ kann der Impfstoff oder die Zusammensetzung direkt in die Tumormasse verabreicht werden (intratumor). Solch ein Weg der Verabreichung kann die anti-Tumor-Aktivitäten von Lymphocyten, die spezifisch mit Tumoren assoziiert sind, verstärken (Rosenberg, 1992). Immunisierung des Patienten mit ALVAC- oder TROVAC-basierenden rekombinanten Viren, die TAAs exprimieren, die durch die Tumorzellen des Patienten produziert werden, kann anti-Tumor Immunreaktionen schneller und in ausreichenden Spiegeln hervorrufen, um die Tumorausbreitung zu verhindern oder aufzuhalten und potenziell die Tumorbelastung zu eliminieren. Die erhöhte Tumor-spezifische Immunreaktion, die aus den Impfungen mit diesen Pockenvirus-basierenden rekombinanten Impfstoffen resultiert, kann in Rückbildung des Tumors einschließlich permanenter Rückbildung des Tumors resultieren. Beispiele von bekannten TAAs, für die rekombinante Pockenviren hergestellt und mit immuntherapeutischem Nutzen gemäß dieser Erfindung angewendet werden können, schließen p53 (Hollstein et al., 1991), p21-ras (Almoguera et al., 1988), HER-2 (Fendly et al., 1990) und die Melanom-assoziierten Antigene (MAGE-1; MZE-2) (van der Bruggen et al., 1991) und p97 (Hu et al., 1988) und das carcinoembryonale Antigen (CEA), das mit colorectalem Krebs assoziiert ist (Kantor et al., 1993; Fischbein et al., 1992; Kaufman et al., 1991), ein, sind aber nicht darauf limitiert.

[0097] Allgemeiner können die Impfstoffe oder Zusammensetzungen der Erfindung (Impfstoffe oder Zusammensetzungen, die die Avipoxvirus-Rekombinanten der Erfindung enthalten) gemäß Standardverfahren, die pharmazeutischen Fachpersonen wohlbekannt sind, hergestellt werden. Solche Impfstoffe oder Zusammensetzungen können an einen Patienten verabreicht werden, der eine solche Verabreichung benötigt in Dosierungen und durch Verfahren, bei denen solche Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht und Verfassung des bestimmten Patienten sowie der Weg der Verabreichung, die medizinischen Fachpersonen wohlbekannt sind, berücksichtigt werden. Die Impfstoffe oder Zusammensetzungen können zusammen oder in Folge mit anderen anti-neoplastischen, anti-Tumor- oder anti-Krebs-Mitteln und/oder mit Mitteln verabreicht werden, die die schädlichen Wirkungen der anti-neoplastischen, anti-Tumor- oder anti-Krebs-Mittel reduzieren oder lindern; wieder unter Berücksichtigung solcher Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht und Verfassung des bestimmten Patienten sowie der Weg der Verabreichung.

[0098] Beispiele von Impfstoffen oder Zusammensetzungen der Erfindung schließen flüssige Präparate für die Verabreichungen in Öffnungen z.B. oral, nasal, anal, vaginal usw. wie Suspensionen, Sirupe oder Elexiere; und Präparate für parenterale, subcutane, intradermale, intramusculäre oder intravenöse Verabreichung (z.B. injizierbare Verabreichung) wie sterile Suspensionen oder Emulsionen ein. In solchen Zusammensetzungen kann das rekombinante Pockenvirus als Beimischung mit einem geeigneten Träger, Verdünner oder Arzneiträger wie sterilem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung, Glucose oder dergleichen vorhanden sein. Das rekombinante Pockenvirus der Erfindung kann in lyophilisierter Form zur Wiederherstellung zum Beispiel in isotonischem, wässrigem Salzpuffer geliefert werden. Darüber hinaus beinhaltet die Erfindung auch einen Kit, in dem das rekombinante Pockenvirus geliefert wird. Der Kit kann einen separaten Behälter einschließen, der einen geeigneten Träger, einen Verdünner oder einen Arzneiträger enthält. Der Kit kann auch ein zusätzliches anti-Krebs-, anti-Tumor- oder anti-neoplastisches Mittel und/oder ein Mittel einschließen, das schädliche Wirkungen der anti-neoplastischen, anti-Tumor- oder anti-Krebs-Mittel zur gleichzeitigen oder sequenziellen Verabreichung reduziert oder lindert. Zusätzlich kann der Kit Anweisungen zum Mischen oder Kombinieren von Bestandteilen und/oder zur Verabreichung einschließen.

[0099] Die Avipoxvirus-Vektortechnologie liefert einen attraktiven Ansatz zum Manipulieren von Lymphocyten und Tumorzellen für die Verwendung in Zell-basierenden immuntherapeutischen Modalitäten für Krebs. Die Charakteristika der ALVAC- und TROVAC-Vektoren, die den Antrieb für solche Anwendungen liefern, schließen ein: 1) ihre offensichtliche Unabhängigkeit von spezifischen Rezeptoren für den Eintritt in Zellen, 2) ihre Fähigkeit, trotz ihres Spezies- oder Gewebe-spezifischen Ursprungs fremde Gene in Zellsubstraten zu exprimieren, 3) ihre Fähigkeit, fremde Gene unabhängig von der Wirtszell-Regulation zu exprimieren, 4) die gezeig-

te Fähigkeit der Verwendung von rekombinanten Pockenvirus-Viren, um spezifische CTL-Reaktivitäten von mononucleären periphären Blutzellen (PBMCs) zu amplifizieren und 5) ihre hoch-abgeschwächten Eigenschaften im Vergleich zu bestehenden Vacciniavirus-Impfstoff-Stämmen (Literaturübersicht von Tartaglia et al., 1993a; Tartaglia et al., 1990).

[0100] Die Expression von spezifischen Cytokinen oder die Co-Expression von spezifischen Cytokinen mit TAAs durch ALVAC- und TROVAC-basierende rekombinante Viren kann die Zahl und anti-Tumor Aktivitäten von CTLs, die mit Tumorzell-Depletion oder -Elimination assoziiert ist, verstärken. Beispiele von Cytokinen, die eine positive Wirkung in dieser Hinsicht aufweisen, schließen Tumornekrose-Faktor-α (TNF-α), Interferon-gamma (IFN-gamma), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-7 (IL-7) ein (Literaturübersicht von Pardoll, 1992). Das Cytokin Interleukin-2 (IL-2) spielt eine wesentliche Rolle in der Förderung der zellvermittelten Immunität. IL-2, das durch die T_H1-Untergruppe von Lymphocyten sezerniert wird, ist ein T-Zellen-Wachstumsfaktor, der die Teilung von sowohl $CD4^+$- und $CD8^+$- Zellen stimuliert. Zusätzlich ist auch gezeigt worden, dass IL-2 B-Zellen, Monocyten und natürliche Killerzellen aktiviert. Zu einem großen Teil erfolgen die biologischen Wirkungen von IL-2 auf Grund seiner Rolle im Induzieren der Produktion von IFNγ. Rekombinantes Vacciniavirus, das IL-2 exprimiert, ist in Mäusen im Vergleich zum Wildtyp-Vacciniavirus abgeschwächt. Dies ist auf Grund der Fähigkeit des Vaccinia-exprimierten IL-2, Maus-NK-Zellen zu stimulieren, IFNγ zu produzieren, das das Wachstum des rekombinanten Vacciniavirus limitiert (Karupiah et al., 1990). In ähnlicher Weise ist gezeigt worden, dass Beimpfen von immundefizienten Nacktmäusen ohne Thymus mit rekombinantem Vacciniavirus, das sowohl IL-2 als auch das HA-Gen von Influenza exprimiert, diese Mäuse vor späterer Herausforderung mit Influenzavirus schützen kann (Karupiah et al., 1992).

[0101] Das Cytokin Interferon γ (IFNγ) wird durch die T_H1-Untergruppe von Lymphocyten sezerniert. IFNγ fördert die T_H1-zellvermittelte Immunreaktion, während es die T_H2 (Antikörper)-Reaktion inhibiert. IFNγ induziert die Expression der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen und induziert die Expression des B7-costimulierenden Moleküls auf Macrophagen. Zusätzlich zum Verstärken der phagocytischen Aktivität von Macrophagen verstärkt IFNγ die cytotoxische Aktivität von NK-Zellen. IFNγ limitiert das Wachstum des rekombinanten Virus, wenn es in replizierendem rekombinanten Vacciniavirus exprimiert wird. Dies ermöglicht T-Zellen-immundefizienten Mäusen, die Infektion zu bewältigen (Kohonen-Corish et al., 1990).

[0102] Das Cytokin Interleukin 4 (IL-4) wird durch die T_H2-Untergruppe von Lymphocyten sezerniert. IL-4 fördert die T_H2 (Antikörper)-Reaktion, während es die T_H1-zellvermittelte Immunreaktion inhibiert. Rekombinantes Vacciniavirus, das IL-4 exprimiert, zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Vacciniavirus erhöhte Pathogenität in Mäusen (Ramshaw et al., 1992).

[0103] Das Cytokin Granulocyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GMCSF) ist pleiotroph. Zusätzlich zum Stimulieren der Proliferation von Zellen sowohl der Granulocyten- als auch der Makrophagen-Zelllinien beeinflusst GMCSF in Kreuzkonkurrenz mit den Interleukinen 3 und 5 (IL-3 und IL-5) viele andere Aspekte der Hämatopoiese und kann eine Rolle in der Erleichterung des Tumorzellwachstums spielen (Lopez et al., 1992). GMCSF wird klinisch für hämatopoetische Wiederherstellung in Folge von Knochenmarkstransplantation verwendet.

[0104] Das Cytokin Interleukin 12 (IL-12), früher als natürlicher Killer(NK)-Zellen-stimulierender Faktor bekannt, ist ein Heterodimer, das aus 35kDa- und 40kDa-Untereinheiten gebildet ist. IL-12 wird durch Monocyten, Macrophagen, B-Zellen und andere Hilfszellen produziert. IL-12 hat pleiotrope Wirkungen sowohl auf NK-Zellen als auch T-Zellen. Zum Teil durch seine Rolle des Induzierens der IFNγ-Produktion spielt IL-12 eine wesentliche Rolle im Fördern der T_H1-zellvermittelten Immunreaktion, während es die T_H2-Reaktion inhibiert (Literaturübersicht in Trinchieri, 1993). Vor kurzem ist gezeigt worden, dass rekombinantes murines IL-12 starke anti-Tumor- und anti-metastatische Wirkungen in Mäusen hat (Brunda et al., 1993).

[0105] B7 (BB-1), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, ist auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen vorhanden. Interaktion des B7-Moleküls auf Antigen-präsentierenden Zellen mit seinen Rezeptoren auf T-Zellen liefert co-stimulierende Signale einschließlich IL-2, die nötig sind für die T-Zell-Aktivierung (Schwartz, 1992). Vor kurzem ist gezeigt worden, dass experimentelle Co-Expression von B7 zusammen mit einem Tumor-Antigen auf murinen Melanomzellen zur Rückbildung von Tumoren in Mäusen führen kann. Dies wurde durch die B7-assistierte Aktivierung von Tumor-spezifischen cytotoxischen T-Zellen erreicht (Chen et al., 1992).

[0106] Das c-erb-B-2-Gen, das unter Wirbeltieren konserviert ist, codiert ein mögliches Rezeptorprotein. Das

185 kDa-Translationsprodukt enthält eine Kinase-Domäne, die hochgradig homolog zu der Kinase-Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors ist. Das c-erb-B-2-Gen ist unter Wirbeltieren konserviert und ist das selbe wie das Ratten-neu-Gen, das in einer Anzahl von Ratten-Neuro-/Glioblastomen nachgewiesen worden ist. Das menschliche c-erb-B-2-Gen, auch als HER2 bekannt, wird in bestimmten Neoplasien amplifiziert, vor allem in Brustkrebs. In der Magenkrebs-Zelllinie MKN-7 werden sowohl das normale 4,6 kb-Transkript, das c-erb-B-2 codiert, als auch ein 2,3 kb-Transkript, das nur die extrazelluläre Domäne des mutmaßlichen Rezeptors bestimmt, in erhöhten Spiegeln synthetisiert (Yamamoto et al., 1986). Die extrazelluläre Domäne ist als ein potenzielles Immunogen für aktive spezifische Immuntherapie von Brustkrebs vorgeschlagen worden (Fendly et al., 1990).

[0107] Der Nutzen von ALVAC- und TROVAC-basierenden rekombinanten Viren, die TAAs plus spezifische Cytokine für adoptive Immuntherapie exprimieren, kann in einigen Formen auftreten. Zum einen kann genetische Modifikation von PBMCs durch Vektor-vermitteltes Einbringen von TAAs und Cytokingenen erzielt und dann wieder direkt in den Patienten eingebracht werden. Eine solche Verabreichung ist auf der Ableitung oder die Bewegung von modifizierten PBMCs zu lymphoidem Gewebe (d.h. Milz; Lymphknoten) durch das Reticulo-Endothelial-System (RES) zum Hervorrufen der Tumor-spezifischen Immunreaktion angewiesen. PBMCs, die durch Infektion mit der angemessenen ALVAC- und TROVAC-basierenden Rekombinante modifiziert wurden, können zum Beispiel in vitro angewendet werden, um TAA-spezifische CTLs für Reinfusion in den Patienten zu vermehren. Tumor-infiltrierende Lymphocyten (TILs), die von der Tumormasse stammen, können isoliert, vermehrt und modifiziert werden, um entsprechende Gene unter Verwendung von ALVAC- oder TROVAC-basierenden rekombinanten Viren vor der Reinfusion in den Patienten zu exprimieren. TILs behalten die Fähigkeit des Zurückkehrens zu Tumoren (homing) bei, wenn sie wieder in das Subjekt eingebracht werden (Rosenberg, 1992). So liefern sie ein praktisches Vehikel zum Abliefern von cytotoxischen oder cytostatischen Cytokinen an Tumormassen.

[0108] Zellbasierende aktive Immuntherapie kann auch einige potenzielle Modalitäten unter Verwendung der ALVAC- und TROVAC-Vektoren annehmen. Tumorzellen können modifiziert werden, um TAAs und Cytokine oder andere neue Antigene (d.h. die wichtigsten Histokompatibilitäts-Gene der Klasse I oder Klasse II) zu exprimieren. Solche modifizierten Tumorzellen können danach für aktive Immunisierung ausgenutzt werden. Das therapeutische Potential für eine solche Verabreichung basiert auf der Fähigkeit dieser modifizierten Tumorzellen, Cytokine zu sezernieren und die Darbietung von TAAs zu ändern, um eine systemische anti-Tumor-Aktivität zu erzielen. Die modifizierten Tumorzellen können auch ausgenutzt werden, um Tumor-spezifische CTLs in vitro für Reinfusion in den Patienten zu vermehren.

[0109] Ein besseres Verstehen der vorliegenden Erfindung und seiner vielen Vorteile wird aus den folgenden Beispielen, die durch Illustration angegeben sind, erhalten werden.

BEISPIELE

DNA-Clonierung und -Synthese.

[0110] Plasmide wurden konstruiert, gescreent und durch Standard-Verfahren gezüchtet (Maniatis et al., 1982; Perkus et al., 1985; Piccini et al., 1987). Restriktionsendonucleasen wurden von Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, New England Bioloabs, Beverly, MA; und Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN erhalten. Das Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase wurde von Boehringer Mannheim Biochemicals erhalten. BAL-31-Exonuclease und Phage-T4-DNA-Ligase wurden von New England Biolabs erhalten. Die Reagenzien wurden wie von den verschiedenen Anbietern vorgegeben verwendet.

[0111] Synthetische Oligodesoxyribonucleotide wurden auf einem Biosearch 8750 oder Applied Biosystems 380B DNA-Synthesegerät wie früher beschrieben (Perkus et al., 1989) hergestellt. DNA-Sequenzierung wurde durch das Didesoxy-Kettenterminierungsverfahren (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Sequenase (Tabor et al., 1987) wie früher beschrieben (Guo et al., 1989) durchgeführt. DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Sequenzverifizierung (Engelke et al., 1988) wurde unter Verwendung von speziell synthetisierten Oligonucleotid-Primern und des GenAmp DNA Amplifications-Reagenzien-Kits (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) in einem automatisierten Perkin Elmer Cetus DNA Thermocycler durchgeführt. Überschüssige DNA-Sequenzen wurden von den Plasmiden durch Restriktionsendonuclease-Verdau gefolgt von limitiertem Verdau durch BAL-31-Exonuclease und Mutagenese (Mandecki, 1986) unter Verwendung von synthetischen Oligonucleotiden deletiert.

Zellen, Virus und Transfektion.

[0112] Die Ursprünge und Bedingungen des Kultivierens des Copenhagen-Stamms des Vacciniavirus sind früher beschrieben worden (Guo et al., 1989). Die Herstellung von rekombinantem Virus durch Rekombination, in situ-Hybridisierung von Nitrocellulosefiltern und Screenen auf B-Galactosidase-Aktivität erfolgen wie früher beschrieben (Piccini et al., 1987).

[0113] Die Ursprünge und Bedingungen der Kultivierung des Copenhagen-Stamms von Vacciniavirus und NYVAC ist früher beschrieben worden (Guo et al., 1989; Tartaglia et al., 1992). Die Herstellung von rekombinantem Virus durch Rekombination, in situ-Hybridisierung von Nitrocellulosefiltern und Screenen auf B-Galactosidase-Aktivität erfolgen wie früher beschrieben (Panicali et al., 1982; Perkus et al., 1989).

[0114] Das Eltern-Kanarienpockenvirus (Rentschler-Stamm) ist ein Impfstamm für Kanarien. Der Impfstamm wurde von einem Wildtyp-Isolat erhalten und durch mehr als 200 serielle Passagen auf Hühnerembryofibroblasten abgeschwächt. Eine virale Hauptsaat wurde vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unter Agar unterzogen, und ein Plaque-Clon wurde durch fünf zusätzliche Passagen amplifiziert, nach denen der Virusbestand als das parenterale Virus in in vitro-Rekombinationstests verwendet wurde. Das plaqueaufgereinigte Kanarienpocken-Isolat wird als ALVAC bezeichnet.

[0115] Der Stamm des Geflügelpockenvirus (FPV), der als FP-1 bezeichnet wird, ist früher beschrieben worden (Taylor et al., 1988a). Er ist ein abgeschwächter Impfstamm, der für die Impfung von ein-Tag alten Küken nützlich ist. Der Eltern-Virusstamm Duvette wurde in Frankreich als eine Geflügelpocken-Schorf von einem Huhn erhalten. Das Virus wurde durch ungefähr 50 serielle Passagen in embryonierten Hühnereiern gefolgt von 25 Passagen auf Hühnerembryofibroblastenzellen abgeschwächt. Das Virus wurde vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unterzogen. Ein Plaque-Isolat wurde weiter in primären CEF-Zellen amplifiziert und ein Virusbestand, bezeichnet als TROVAC, etabliert.

[0116] Virale NYVAC-, ALVAC- und TROVAC-Vektoren und deren Derivate wurden wie früher beschrieben (Piccini et al., 1987; Taylor et al., 1988a, b) vermehrt. Vero-Zellen und Hühnerembryofibroblasten (CEF) wurden wie früher beschrieben (Taylor et al., 1988a, b) vermehrt.

Beispiel 1 – KONSTRUKTION VON PLASMID pSD460 FÜR DIE DELETION DES THYMIDINKINASE-GENS (J2R)

[0117] Jetzt Bezug nehmend auf **Fig. 1** enthält das Plasmid pSD406 Vaccinia-HindIII J (Pos. 83359–88377), das in pUC8 cloniert wurde. pSD406 wurde mit HindIII und PvuII geschnitten und das 1,7 kb-Fragment von der linken Seite von HindIII J, das in pUC8 cloniert wurde, mit HindIII/SmaI geschnitten, was pSD447 ergab. pSD447 enthält das gesamte Gen für J2R (Pos. 83855–84385). Das Startcodon ist in einer NlaIII-Stelle enthalten, und das Stoppcodon ist in einer SspI-Stelle enthalten. Die Richtung der Transkription wird in **Fig. 1** durch einen Pfeil angezeigt.

[0118] Um einen linken flankierenden Arm zu erhalten, wurde ein 0,8 kb-HindIII/EcoRI-Fragment von pSD447 isoliert, dann mit NlaIII verdaut und ein 0,5 kb-HindIII/NlaIII-Fragment isoliert. Die durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotide MPSYN43/MPSYN44 (SEQ ID NR:1/SEQ ID NR:2)

```
                                SmaI
MPSYN43   5'      TAATTAACTAGCTACCCGGG          3'
MPSYN44   3' GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA       5'
           NlaIII                        EcoRI
```

wurden mit dem 0,5 kb-HindIII/NlaIII-Fragment in das pUC18-Vektorplasmid ligiert, das mit HindIII/EcoRI geschnitten wurde, wodurch Plasmid pSD449 hergestellt wurde.

[0119] Um ein Restriktionsfragment zu erhalten, das einen rechten Vacciniaflankierenden Arm und pUC-Vektorsequenzen enthält, wurde pSD447 mit SspI (teilweise) innerhalb der Vacciniasequenzen und mit HindIII an der pUC/Vaccinia-Verbindung geschnitten und ein 2,9 kb-Vektorfragment isoliert. Dieses Vektorfragment wurde mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN45/MPSYN46 (SEQ ID NR:3/SEQ ID NR:4) ligiert,

```
            HindIII SmaI
MPSYN45  5'  AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA
MPSYN46  3'      AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT

                        NotI          SspI
          ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCCTAATTAACTAAT  3' MPSYN45
          TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA  5' MPSYN46
```

wodurch pSD459 hergestellt wurde.

[0120] Um die linken und rechten flankierenden Arme in einem Plasmid zu kombinieren, wurde ein 0,5 kb-HindIII/SmaI-Fragment von pSD449 isoliert und mit dem pSD459 Vektorplasmid ligiert, das mit HindIII/SmaI geschnitten wurde, wodurch Plasmid pSD460 hergestellt wurde. pSD460 wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem Eltern-Wildtyp-Vacciniavirus Copenhagen-Stamm VC-2 verwendet. Eine ^{32}P-markierte Sonde wurde durch Primerextension unter Verwendung von MPSYN45 (SEQ ID NR:3) als Matrize und dem komplementären 20mer-Oligonucleotid MPSYN47 (SEQ ID NR:5) (5' TTAGTTAATTAGGCGGCCGC 3') als Primer synthetisiert. Das rekombinante Virus vP410 wurde durch Plaquehybridisierung identifiziert.

Beispiel 2 – KONSTRUKTION VON PLASMID pSD486 FÜR DIE DELETION DER HÄMORRHAGISCHEN REGION (B13R + B14R)

[0121] Jetzt Bezug nehmend auf Fig. 2 enthält das Plasmid pSD419 Vaccinia-SalI G (Pos. 160, 744–173,351), das in pUC8 cloniert wurde. pSD422 enthält das angrenzende Vaccinia-SalI-Fragment SalI J (Pos. 173,351–182,746) auf der rechten Seite, das in pUC8 cloniert wurde. Um ein Plasmid zu konstruieren, dem die hämorrhagische Region u, B13R – B14R (Pos. 172,549–173,552) deletiert wurde, wurde pSD419 als die Quelle für den linken flankierenden Arm verwendet, und pSD422 wurde als die Quelle des rechten flankierenden Arms verwendet. Die Richtung der Transkription für die u-Region ist in Fig. 2 durch einen Pfeil angezeigt.

[0122] Um unerwünschte Sequenzen von pSD419 zu entfernen, wurden die Sequenzen links der NcoI-Stelle (Pos. 172,253) durch Verdau von pSD419 mit NcoI/SmaI, gefolgt von stumpfem Beenden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Ligierung entfernt, wodurch Plasmid pSD476 hergestellt wurde. Ein rechter flankierender Vaccinia-Arm wurde durch Verdau von pSD422 mit HpaI am Stoppcodon von B14R und durch Verdau mit NruI 0,3 kb auf der rechten Seite erhalten. Dieses 0,3 kb-Fragment wurde isoliert und mit einem 3,4 kb-HincII-Vektorfragment, das von pSD476 isoliert wurde, ligiert, wodurch Plasmid pSD477 hergestellt wurde. Die Lokalisierung der teilweisen Deletion der Vaccinia-u-Region in pSD477 ist durch ein Dreieck angezeigt. Die verbleibenden B13R-codierenden Sequenzen in pSD477 wurden durch Verdau mit ClaI/HpaI entfernt, und das resultierende Vektorfragment wurde mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden SD22mer/SD20mer (SEQ ID NR:6/SEQ ID NR:7)

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

ligiert, wodurch pSD479 erzeugt wurde. pSD479 enthält ein Startcodon (unterstrichen), gefolgt von einer BamHI-Stelle. Um E. coli-beta-Galactosidase in den B13-B14 (u)-Deletionslokus unter der Kontrolle des u-Promotors zu platzieren, wurde ein 3,2 kb-BamHI-Fragment, das das Beta-Galactosidasegen enthält (Shapira et al., 1983), in die BamHI-Stelle von pSD479 inseriert, wodurch pSD479BG hergestellt wurde. pSD479BG wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem Vacciniavirus vP410 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP533 wurde als blauer Plaque unter Anwesenheit des chromogenen Substrats X-gal isoliert. In vP533 ist die B13R-B14R-Region deletiert und ist durch Beta-Galactosidase ersetzt.

[0123] Um beta-Galactosidase-Sequenzen von vP533 zu entfernen, wurde Plasmid pSD486, ein Derivat von pSD477, das eine Polylinker-Region aber kein Startcodon an der u-Deletionsverbindung enthält, eingesetzt. Zuerst wurde das ClaI/HpaI-Vektorfragment von pSD477, auf das oben Bezug genommen wurde, mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden SD42mer/SD40mer (SEQ ID NR:8/SEQ ID NR:9)

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

ligiert, wodurch Plasmid pSD478 hergestellt wurde. Als nächstes wurde die EcoRI-Stelle an der pUC/Vaccinia-verbindung durch Verdau von pSD478 mit EcoRI, gefolgt vom stumpfen Beenden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Ligierung zerstört, wodurch Plasmid pSD478E⁻ hergestellt wurde. pSD478E⁻ wurde mit BamHI und HpaI verdaut und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden HEM5/HEM6 (SEQ ID NR:10/SEQ ID NR:11)

```
           BamHI EcoRI    HpaI
HEM5   5'   GATCCGAATTCTAGCT   3'
HEM6   3'        GCTTAAGATCGA   5'
```

ligiert, wodurch Plasmid pSD486 hergestellt wurde. pSD486 wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit dem rekombinanten Vacciniavirus vP533 verwendet, wodurch vP553 hergestellt wurde, das als klarer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert wurde.

Beispiel 3 – KONSTRUKTION VON PLASMID pMP494Δ FÜR DIE DELETION DER ATI-REGION (A26L)

[0124] Jetzt auf Fig. 3 Bezug nehmend enthält das pSD414 SalI B, das in pUC8 cloniert wurde. Um unerwünschte DNA-Sequenzen links der A26L-Region zu entfernen, wurde pSD414 mit XbaI innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 137,079) und mit HindIII an der pUC/Vacciniaverbindung geschnitten, dann stumpf mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase beendet und ligiert, was in Plasmid pSD483 resultierte. Um unerwünschte Vaccinia-DNA-Sequenzen rechts von der A26L-Region zu entfernen, wurde pSD483 mit EcoRI geschnitten (Pos. 140,665 und an der pUC/Vaccinia-Verbindung) und ligiert, was Plasmid pSD484 bildete. Um die A26L-codierende Region zu entfernen, wurde pSD484 mit NdeI (teilweise) etwas stromaufwärts des A26L-ORF (Pos. 139,004) und mit HpaI (Pos. 137,889) etwas stromabwärts des A26L-ORF geschnitten. Das 5,2 kb-Vektorfragment wurde isoliert und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden AT13/ATI4 (SEQ ID NR:12/SEQ ID NR:13)

```
      NdeI
ATI3  5' TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTTAATTAAAAGTATATTCAAAAAATAAGT
ATI4  3'  ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA

          BglII EcoRI HpaI
        TATATAAATAGATCTGAATTCGTT  3' ATI3
        ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA  5' ATI4
```

ligiert, was die Region stromaufwärts von A26L wiederherstellt und den A26L-ORF durch eine kurze Polylinker-Region ersetzt, die die Restriktionsstellen BglII, EcoRI und HpaI wie oben angezeigt enthält. Das resultierende Plasmid wurde als pSD485 bezeichnet. Da die BglII- und EcoRI-Stellen in der Polylinker-Region von pSD485 nicht einmalig vorkommen, wurden unerwünschte BglII- und EcoRI-Stellen vom Plasmid pSD483 (oben beschrieben) durch Verdau mit BglII (Pos. 140,136) und mit EcoRI an der pUC/Vaccinia-Verbindung, gefolgt von stumpfer Beendigung mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Ligierung entfernt. Das resultierende Plasmid wurde als pSD489 bezeichnet. Das 1,8 kb-ClaI (Pos. 137,198)/EcoRV (Pos. 139,048)-Fragment von pSD489, das den A26L-ORF enthält, wurde durch den entsprechenden 0,7 kb-Polylinker, der das ClaI/EcoRV-Fragment von pSD485 enthält, ersetzt, wodurch pSD492 hergestellt wurde. Die BglII- und EcoRI-Stellen in der Polylinker-Region von pSD492 sind einmalig.

[0125] Eine 3,3 kb-BglII-Kassette, die das E. coli-Beta-Galactosidasegen (Shapira et al., 1983) unter der Kontrolle des 11 kDa-Vaccinia-Promotors enthält (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990), wurde in die BglII-Stelle von pSD492 inseriert, was pSD493KBG bildete. Das Plasmid pSD493KBG wurde in der Rekombination mit dem rettenden Virus vP553 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP581, das Beta-Galactosidase in der A26L-Deletionsregion enthält, wurde als blauer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert.

[0126] Um ein Plasmid für das Entfernen von Beta-Galactosidase-Sequenzen vom rekombinanten Vacciniavirus vP581 herzustellen, wurde die Polylinker-Region von Plasmid pSD492 durch Mutagenese (Mandecki, 1986) unter Verwendung des synthetischen Oligonucleotids MPSYN177 (SEQ ID NR:14) (5' AAAATGGGCGTGGATTGTTAACTTTATATAACTTATTTTTTGAATATAC 3') deletiert. Im resultierenden Plas-

mid pMP494Δ wird die Vaccinia-DNA, die die Positionen [137,889–138,937] einschließlich des gesamten A26L-ORF umspannt, deletiert. Rekombination zwischen dem pMP494Δ und der Beta-Galactosidase-enthaltenden Vaccinia-Rekombinante vP581 resultierte in der Vaccinia-Deletionsmutante vP618, die als klarer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert wurde.

Beispiel 4 – KONSTRUKTION VON PLASMID pSD467 FÜR DIE DELETION DES HÄMAGGLUTININGENS (A56R)

[0127] Jetzt Bezug nehmend auf Fig. 4 kreuzt das Vaccinia-SalI G-Restriktionsfragment (Pos. 160,744–173,351) die HindIII A/B-Verbindung (Pos. 162,539). pSD419 enthält Vaccinia-SalI G, das in pUC8 cloniert wurde. Die Richtung der Transkription für das Hämagglutinin (HA)-Gen wird in Fig. 4 durch einen Pfeil angezeigt. Die Vaccinia-Sequenzen, die von HindIII B stammen, wurden durch Verdau von pSD419 mit HindIII innerhalb der Vaccinia-Sequenzen und an der pUC/Vaccinia-Verbindung gefolgt von Ligierung entfernt. Das resultierende Plasmid pSD456 enthält das HA-Gen A56R, flankiert von 0,4 kb der Vaccinia-Sequenzen auf der linken Seite und von 0,4 kb der Vaccinia-Sequenzen auf der rechten Seite. A56R-codierende Sequenzen wurden durch Schneiden von pSD456 mit RsaI (teilweise; Pos. 161,090) stromaufwärts der A56R-codierenden Sequenzen und mit EagI (Pos. 162,054) nahe dem Ende des Gens entfernt. Das 3,6 kb-RsaI/EagI-Vektorfragment von pSD456 wurde isoliert und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN59 (SEQ ID NR:15), MPSYN62 (SEQ ID NR:16), MPSYN60 (SEQ ID NR:17) und MPSYN61 (SEQ ID NR:18)

```
          RsaI
MPSYN59  5′ ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTTATAGGT-
MPSYN62  3′ TGTGCTTACTAAAAGATTTCATAAACCTTTCAAAATATCCA-

MPSYN59     AGTTGATAGAACAAAATACATAATTT 3′
MPSYN62     TCAACTATCT 5′

MPSYN60  5′                      TGTAAAAATAAATCACTTTTTATA-
MPSYN61  3′ TGTTTTATGTATTAAAACATTTTTATTTAGTGAAAAATAT-

              BglII SmaI  PstI  EagI
MPSYN60     CTAAGATCTCCCGGGCTGCAGC       3′
MPSYN61     GATTCTAGAGGGCCCGACGTCGCCGG   5′
```

ligiert, was die DNA-Sequenzen stromaufwärts des A56R-ORF wiederherstellt und den A56R-ORF durch eine Polylinker-Region wie oben angezeigt ersetzt. Das resultierende Plasmid ist pSD466. Die Vaccinia-Deletion in pSD466 umfasst die Positionen [161,185–162,053]. Die Stelle der Deletion in pSD466 wird in Fig. 4 durch ein Dreieck angezeigt.

[0128] Eine 3,2 kb-BglII/BamHI (teilweise)-Kassette, die das E. coli-Beta-Galactosidasegen (Shapria et al., 1983) unter der Kontrolle des 11 kDa-Vaccinia-Promotors enthält (Bertholet et al., 1985; Guo et al., 1989), wurde in die BglII-Stelle von pSD466 inseriert, was pSD466KBG bildete. Das Plasmid pSD466KBG wurde in der Rekombination mit dem rettenden Virus vP618 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP708, das Beta-Galactosidase in der A56R-Deletion enthält, wurde als blauer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert.

[0129] Die Beta-Galactosidase-Sequenzen wurden von vP708 unter Verwendung des Donorplasmids pSD467 deletiert. pSD467 ist identisch zu pSD466, mit der Ausnahme, dass die EcoRI-, SmaI- und BamHI-Stellen von der pUC/Vaccinia-Verbindung durch Verdau von pSD466 mit EcoRI/BamHI gefolgt von stumpfem Beenden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Ligation entfernt wurden. Rekombination zwischen vP708 und pSD467 resultierte in der rekombinanten Vaccinia-Deletionsmutante vP723, die als klarer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert wurde.

Beispiel 5 – KONSTRUKTION VON PLASMID pMPCSK1Δ FÜR DIE DELETION VON OFFENEN LESERAHMEN [C7L-K1L]

[0130] Jetzt Bezug nehmend auf Fig. 5 wurden die folgenden Vaccinia-Clone zur Konstruktion von pMPCSK1Δ genutzt. pSD420 ist SalI H, das in pUC8 cloniert wurde. pSD435 ist KpnI F, das in pUC18 cloniert wurde. pSD435 wurde mit SphI geschnitten und wieder ligiert, was pSD451 bildete. In pSD451 sind die DNA-Sequenzen links der SphI-Stelle (Pos. 27,416) in HindIII M entfernt (Perkus et al., 1990). pSD409 ist HindIII M, das in pUC8 cloniert wurde.

[0131] Um ein Substrat für die Deletion des [C7L-K1L]-Genclusters von Vaccinia zu liefern, wurde E. coli-Beta-Galactosidase zuerst in den Vaccinia-M2L-Deletionslokus (Guo et al., 1990) wie folgt inseriert. Um die BglII-Stelle in pSD409 zu eliminieren, wurde das Plasmid mit BglII in den Vaccinia-Sequenzen (Pos. 28,212) und mit BamHI an der pUC/Vaccinia-Verbindung geschnitten, dann ligiert, um das Plasmid pMP409B zu bilden. pMP409B wurde an der einmaligen SphI-Stelle (Pos. 27,416) geschnitten. M2L-codierende Sequenzen wurden durch Mutagenese (Guo et al., 1990; Mandecki, 1986) unter Verwendung des synthetischen Oligonucleotids

```
                                                    BglII
MPSYN82 (SEQ ID NO:19) 5' TTTCTGTATATTTGCACCAATTTAGATCTT-
                          ACTCAAAATATGTAACAATA 3'.
```

entfernt. Das resultierende Plasmid pMP409D enthält eine einzelne BglII-Stelle, die in den M2L-Deletionslokus wie oben angezeigt inseriert wurde. Eine 3,2 kb-BamHI (teilweise)/BglII-Kassette, die das E. coli-Beta-Galactosidasegen (Shapria et al., 1983) unter der Kontrolle des 11 kDa-Promotors enthält (Bertholet et al., 1985), wurde in pMP409D, das mit BglII geschnitten wurde, inseriert. Das resultierende Plasmid pMP409DBG (Guo et al., 1990) wurde das Donorplasmid für die Rekombination mit dem rettenden Virus vP723 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP784, das Beta-Galactosidase enthält, die in den M2L-Deletionslokus inseriert worden ist, wurde als blauer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert.

[0132] Ein Plasmid, in dem die Vacciniagene [C7L-K1L] deletiert wurden, wurde in pUC8 eingebaut, das mit SmaI, HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet wurde. Der linke flankierende Arm, der aus Vaccinia-HindIII C-Sequenzen besteht, wurde durch Verdau von pSD420 mit XbaI (Pos. 18,628) gefolgt von stumpfem Beenden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase und Verdau mit BglII (Pos. 19,706) erhalten. Der rechte flankierende Arm, der aus Vaccinia-HindIII K-Sequenzen besteht, wurde durch Verdau von pSD451 mit BglII (Pos. 29,062) und EcoRV (Pos. 29,778) erhalten. Im resultierenden Plasmid pMP581CK sind die Vaccinia-Sequenzen zwischen der BglII-Stelle (Pos. 19,706) in HindIII C und der BglII-Stelle (Pos. 29,062) in HindIII K deletiert. Die Stelle der Deletion der Vaccinia-Sequenzen im Plasmid pMP581CK ist in Fig. 5 durch ein Dreieck angezeigt.

[0133] Um überschüssige DNA an der Vaccinia-Deletionsverbindung zu entfernen, wurde das Plasmid pMP581CK an den NcoI-Stellen innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 18,811; 19,655) geschnitten, mit BaI-31-Exonuclease behandelt und einer Mutagenese (Mandecki, 1986) unter Verwendung des synthetischen Oligonucleotids MPSYN233 (SEQ ID NR:20) 5'-TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAATAATATT-TATT-3' unterzogen. Im resultierenden Plasmid pMPCSK1Δ sind die Vaccinia-Sequenzen an den Positionen 18,805–29,108 deletiert, die 12 offene Leserahmen [C7L – K1L] von Vaccinia umspannen. Rekombination zwischen pMPCSK1Δ und der Beta-Galactosidase-enthaltenden Vaccinia-Rekombinante vP784 resultierte in der Vaccinia-Deletionsmutante vP804, die als klarer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert wurde.

Beispiel 6 – KONSTRUKTION VON PLASMID pSD548 FÜR DIE DELETION DER GROßEN UNTEREINHEIT RIBONUCLEOTID-REDUKTASE (I4L)

[0134] Jetzt Bezug nehmend auf Fig. 6 enthält das Plasmid pSD405 Vaccinia HindIII I (Pos. 63,875–70,367), das in pUC8 cloniert wurde. pSD405 wurde mit EcoRV innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 67,933) und mit SmaI an der pUC/Vaccinia-Verbindung verdaut und ligiert, was Plasmid pSD518 bildete. pSD518 wurde als die Quelle für alle Vaccinia-Restriktionsfragmente verwendet, die in der Konstruktion von pSD548 verwendet wurden.

[0135] Das Vaccinia-I4L-Gen erstreckt sich von Position 67,371–65,059. Die Richtung der Transkription für I4L wird in Fig. 6 durch einen Pfeil angezeigt. Um ein Vektorplasmid-Fragment zu erhalten, bei dem ein Teil der I4L-codierenden Sequenzen deletiert ist, wurde pSD518 mit BamHI (Pos. 65,381) und HpaI (Pos. 67,001) verdaut und unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Dieses 4,8 kb-Vektorfragment wurde mit einer 3,2 kb-SmaI-Kassette, die das E. coli-Beta-Galactosidasegen (Shapira et al., 1983) unter der Kontrolle des 11 kDa-Vaccinia-Promotors (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990) enthält, ligiert, was in Plasmid pSD524KBG resultierte. pSD524KBG wurde als Donorplasmid für die Rekombination mit Vacciniavirus vP804 verwendet. Das rekombinante Vacciniavirus vP855, das Beta-Galactosidase in einer teilweisen Deletion des I4L-Gens enthält, wurde als blauer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert.

[0136] Um Beta-Galactosidase und den Rest des I4L-ORF von vP855 zu deletieren, wurde das Deletionsplasmid pSD548 konstruiert. Die linken und rechten Vaccinia-flankierenden Arme wurden separat in pUC8 eingebaut, wie unten ausführlich beschrieben und schematisch in Fig. 6 dargelegt.

[0137] Um ein Vektorplasmid zu konstruieren, um den linken Vaccinia-flankierenden Arm aufzunehmen, wurde pUC8 mit BamHI/EcoRI geschnitten und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden 518A1/518A2 (SEQ ID NR:21/SEQ ID NR:22)

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

                    BglII  EcoRI
               TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG    3'  518A1
               AACTCTTATTTTTCTAGAATCCTTAA 5'  518A2
```

ligiert, wodurch Plasmid pSD531 gebildet wurde. pSD531 wurde mit RsaI (teilweise) und BamHI geschnitten und ein 2,7 kb-Vektorfragment isoliert. pSD518 wurde mit BglII (Pos. 64,459)/RsaI (Pos. 64,994) geschnitten und ein 0,5 kb-Fragment isoliert. Die zwei Fragmente wurden zusammen ligiert, wodurch pSD537 gebildet wurde, das den vollständigen Vaccinia-flankierenden Arm links der I4L-codierenden Sequenzen enthält.

[0138] Um ein Vektorplasmid zu konstruieren, um den rechten Vaccinia-flankierenden Arm aufzunehmen, wurde pUC8 mit BamHI/EcoRI geschnitten und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden 518B1/518B2 (SEQ ID NR:23/SEQ ID NR:24)

```
      BamHI BglII SmaI
518B1 5' GATCCAGATCTCCCGGGAAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAG-
518B2 3'    GTCTAGAGGGCCCTTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATC-

              RsaI  EcoRI
         GGATTTGACGTATGTAGCGTACTAGG    3'  518B1
         CCTAAACTGCATACTACGCATGATCCTTAA 5'  518B2
```

ligiert, wodurch Plasmid pSD532 gebildet wurde. pSD532 wurde mit RsaI (teilweise)/EcoRI geschnitten und ein 2,7 kb-Vektorfragment isoliert. pSD518 wurde mit RsaI innerhalb der Vaccinia-Sequenzen (Pos. 67,436) und EcoRI an der Vaccinia/pUC-Verbindung geschnitten und ein 0,6 kb-Fragment isoliert. Die zwei Fragmente wurde zusammen ligiert, wobei sich pSD538 bildete, das den vollständigen Vaccinia-flankierenden Arm rechts der I4L-codierenden Sequenzen enthält.

[0139] Der rechte Vaccinia-flankierende Arm wurde als ein 0,6 kb-EcoRI/BglII-Fragment von pSD538 isoliert und in das pSD537-Vektorplasmid ligiert, das mit EcoRI/BglII geschnitten wurde. Im resultierenden Plasmid pSD539 ist der I4L-ORF (Pos. 65,047–67,386) durch eine Polylinker-Region ersetzt, die durch 0,6 kb-Vaccinia-DNA auf der linken Seite und 0,6 kb-Vaccinia-DNA auf der rechten Seite flankiert wird, alles in einem pUC-Hintergrund. Die Stelle der Deletion innerhalb der Vaccinia-Sequenzen wird in **Fig. 6** durch ein Dreieck angezeigt. Um mögliche Rekombination von Beta-Galactosidase-Sequenzen im pUC-abstammenden Teil von pSD539 mit Beta-Galactosidase-Sequenzen im rekombinanten Vacciniavirus vP855 zu vermeiden, wurde die Vaccinia-I4L-Deletionskassette von pSD539 in pRC11 verschoben, einem pUC-Derivat, von dem alle Beta-Galactosidase-Sequenzen entfernt und mit einer Polylinker-Region ersetzt worden sind (Colinas et al., 1990). pSD539 wurde mit EcoRI/PstI geschnitten und das 1,2 kb-Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in pRC11 ligiert, das mit EcoRI/PstI geschnitten wurde (2,35 kb), wodurch pSD548 gebildet wurde. Rekombination zwischen pSD548 und der Beta-Galactosidase-enthaltenden Vaccinia-Rekombinante vP855 resultierte in der Vaccinia-Deletionsmutante vP866, die als klarer Plaque in der Anwesenheit von X-gal isoliert wurde.

[0140] DNA des rekombinanten Vacciniavirus vP866 wurde durch Restriktionsverdau gefolgt von Elektrophorese auf einem Agarosegel analysiert. Die Restriktionsmuster waren wie erwartet. Polymerasekettenreaktionen (PCR) (Engelke et al., 1988) unter Verwendung von vP866 als Matrize und Primern, die die sechs Deletionsloci flankieren, die oben ausführlich beschrieben wurden, produzierte DNA-Fragmente mit den erwarteten Größen. Sequenzanalyse der PCR-generierten Fragmente rund um die Bereiche der Deletionsverbindungen bestätigten, dass die Verbindungen wie erwartet waren. Das rekombinante Vacciniavirus vP866, das die sechs manipulierten Deletionen wie oben beschrieben enthält, wurde als Vaccinia-Impfstoffstamm „NYVAC" bezeichnet.

Bezugsbeispiel 1 – KONSTRUKTION VON TROVAC-NDV, DAS DIE FUSIONS- UND HÄMAGGLUTININ-NEURAMINIDASE-GLYCOPROTEINE DES NEWCASTLE-ERKRANKUNGSVIRUS EXPRIMIERT

[0141] Dieses Beispiel beschreibt die Entwicklung von TROVAC, einem Geflügelpockenvirus-Vektor, und von einer Geflügelpocken-Newcastle-Erkrankungsvirus-Rekombinante, die als TROVAC-NDV bezeichnet wird, und ihre Sicherheit und Wirksamkeit. Der Geflügelpockenvirus (FPV)-Vektor, der sowohl die F- als auch die HN-Gene des virulenten NDV-Stamms Texas exprimiert, wurde konstruiert. Die produzierte Rekombinante wurde als TROVAC-NDV bezeichnet. TROVAC-NDV exprimiert authentisch prozessierte NDV-Glycoproteine in Vogelzellen, die mit dem rekombinanten Virus infiziert wurden, und das Beimpfen von einem Tag alten Küken schützt gegen die darauffolgende virulente NDV-Herausforderung.

Zellen und Viren.

[0142] Der Texas-Stamm von NDV ist ein velogenischer Stamm. Die Herstellung von cDNA-Clonen der F- und HN-Gene ist früher beschrieben worden (Taylor et al., 1990; Edbauer et al., 1990). Der Stamm von FPV, bezeichnet als FP-1, ist früher beschrieben worden (Taylor et al., 1988a). Er ist ein Impfstoff-Stamm, der für die Impfung von einem Tag alten Küken nützlich ist. Der Eltern-Virusstamm Duvette wurde in Frankreich als ein Gefügelpocken-Schorf eines Huhns erhalten. Das Virus wurde durch ungefähr 50 serielle Passagen in embryonierten Hühnereiern gefolgt von 25 Passagen auf Hühnerembryofibroblastenzellen abgeschwächt. Das Virus wurde vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unterzogen. Ein Plaque-Isolat wurde weiter in primären CEF-Zellen amplifiziert und ein Bestandsvirus, bezeichnet als TROVAC, etabliert. Das Bestandsvirus, das im in vitro-Rekombinationstest verwendet wurde, um TROVAC-NDV herzustellen, ist zwölf Passagen in primären CEF-Zellen vom Plaque-Isolat unterzogen worden.

Konstruktion einer Kassette für NDV-F.

[0143] Ein 1,8 kbp-BamHI-Fragment, das außer 22 Nucleotiden alle des 5'-Endes der F-Protein-codierenden Sequenz enthält, wurde aus pNDV81 ausgeschnitten (Taylor et al., 1990) und an der BamHI-Stelle von pUC18 inseriert, um pCE13 zu bilden. Der Vacciniavirus-H6-Promotor, der früher beschrieben wurde (Taylor et al., 1988a, b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989), wurde in pCE13 durch Verdauen von pCE13 mit SalI, Füllen der klebenden Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase und Verdauen mit HindIII inseriert. Ein HindIII-EcoRV-Fragment, das die H6-Promotorsequenz enthält, wurde dann in pCE13 inseriert, um pCE38 zu bilden. Ein perfektes 5'-Ende wurde durch Verdauen von pCE38 mit KpnI und NruI und Inserieren von den durch Annealing angelagerten und mit Kinase behandelten Oligonucleotiden CE75 (SEQ ID NR:27) und CE76 (SEQ ID NR:28) hergestellt, um pCE47 herzustellen.
CE75: CGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGCTCCAGATCTTCTACCAGGATCCCGGTAC
CE76: CGGGATCCTGGTAGAAGATCTGGAGCCCATTACGATACAAACTTAACGGATATCG.

[0144] Um die nicht-codierende Sequenz vom 3'-Ende des NDV-F zu entfernen, wurde ein SmaI- bis PstI-Fragment von pCE13 in die SmaI- und PstI-Stellen von pCU18 inseriert, um pCE23 zu bilden. Die nicht-codierenden Sequenzen wurden durch sequenzielle Verdauung von pCE23 mit SacI, BamHI, Exonuclease III, SI-Nuclease und EcoRI entfernt. Die durch Annealing angelagerten und mit Kinase behandelten Oligonucleotide CE42 (SEQ ID NR:29) und CE43 (SEQ ID NR:30) wurden dann inseriert, um pCE29 zu bilden.
CE42: AATTCGAGCTCCCCGGG
CE43: CCCGGGGAGCTCG

[0145] Das 3'-Ende der NDV-F-Sequenz wurde dann in das Plasmid pCE20 inseriert, das schon das 5'-Ende von NDV-F durch Clonieren eines PstI-SacI-Fragments von pCE29 in die PstI- und SacI-Stellen von pCE20 enthält, um pCE32 zu bilden. Generierung von pCE20 ist vorher in Taylor et al., 1990 beschrieben worden.

[0146] Um die N6-Promotor- und die NDV-F-5'-Sequenzen, die in pCE47 enthalten sind, mit den 3'-NDV-F-Sequenzen, die in pCE32 enthalten sind, auszurichten, wurde ein HindIII-PstI-Fragment von pCE47 in die HindIII- und PstI-Stellen von pCE32 inseriert, um pCE49 zu bilden. Die H6-gesteuerten NDV-F-Sequenzen wurden dann in den ORF-befreiten F8-Lokus (unten beschrieben) durch Clonieren eines HindIII-NruI-Fragments von pCE49 in die HindIII- und SmaI-Stellen von pJCA002 (unten beschrieben) transferiert, um pCE54 zu bilden. Transkriptionsstopp-Signale wurden in pCE54 durch Verdauen von pCE54 mit SacI, teilweises Verdauen mit BamHI und Inserieren der durch Annealing angelagerten und mit Kinase behandelten Oligonucleotide CE166 (SEQ ID NR:31) und CE167 (SEQ ID NR:32) inseriert, um pCE58 zu bilden.
CE166: CTTTTTATAAAAAGTTAACTACGTAG
CE167: GATCCTACGTAGTTAACTTTTTATAAAAAGAGCT

[0147] Ein perfektes 3'-Ende für NDV-F wurde durch Verwenden der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit pCE54 als Matrize und den Oligonucleotiden CE182 (SEQ ID NR:33) und CE183 (SEQ ID NR:34) als Primer erhalten.
CE182: CTTAACTCAGCTGACTATCC
CE183: TACGTAGTTAACTTTTTATAAAAATCATATTTTTGTAGTGGCTC

[0148] Das PCR-Fragment wurde mit PvuII und HpaI verdaut und in pCE58 cloniert, das mit HpaI verdaut und mit PvuII teilweise verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde als pCE64 bezeichnet. Translations-Stoppsignale wurden durch Clonieren eines HindIII-HpaI-Fragments inseriert, das den vollständigen H6-Promotor und die F-codierende Sequenz von pCE64 in die HindIII- und HpaI-Stellen von pRW846 enthält, um pCE71, die endgültige Kassette für NDV-F, zu bilden. Das Plasmid pRW846 ist im Wesentlichen äquivalent zu Plasmid pJCA002 (unten beschrieben), bis auf das Enthalten des H6-Promotors und der Transkriptions- und Translations-Stoppsignale. Verdau von pRW846 mit HindIII und HpaI eliminiert den H6-Promotor, aber lässt die Stoppsignale intakt.

Konstruktion der Kassette für NDV-HN.

[0149] Konstruktion von Plasmid pRW802 wurde früher in Edbauer et al., 1990 beschrieben. Dieses Plasmid enthält die NDV-HN-Sequenzen, die an das 3'-Ende des Vacciniavirus-H6-Promotors in einem pUC9-Vektor gebunden sind. Ein HindIII-EcoRV-Fragment, das das 5'-Ende des Vacciniavirus-H6-Promotors umspannt, wurde in die HindIII- und EcoRV-Stellen von pRW802 inseriert, um pRW830 zu bilden. Ein perfektes 3'-Ende für NVD-HN wurde durch Inserieren der durch Annealing angelagerten und mit Kinase behandelten Oligonucleotide CE162 (SEQ ID NR:35) und CE163 (SEQ ID NR:36) in die EcoRI-Stelle von pRW830 erhalten, um pCE59, die endgültige Kassette für NDV-HN, zu bilden.

CE162:

AATTCAGGATCGTTCCTTTACTAGTTGAGATTCTCAAGGATGATGGGATTTAATTTT

TATAAGCTTG

CE163:

AATTCAAGCTTATAAAAATTAAATCCCATCATCCTTGAGAATCTCAACTAGTAAAGG

AACGATCCTG

Konstruktion des FPV-Insertionsvektors.

[0150] Das Plasmid pRW713-15 enthält ein 10kb-PvuII-PvuII-Fragment, das von genomischer DNA cloniert wurde. Die Nucleotidsequenz wurde auf beiden Strängen für ein 3660 bp-PvuII-EcoRV-Fragment bestimmt. Die Grenzen eines offenen Leserahmens, der hier als F8 bezeichnet wird, wurden bestimmt. Das Plasmid pRW761 ist ein Subclon von pRW731-15, enthaltend ein 2430 bp-EcoRV-EcoRV-Fragment. Der F8-ORF war zur Gänze zwischen einer XbaI-Stelle und einer SspI-Stelle in pRW761 enthalten. Um ein Insertionsplasmid zu bilden, das bei Rekombination mit genomischer TROVAC-DNA den F8-ORF eliminieren würde, wurden die folgenden Schritte befolgt. Das Plasmid pRW761 wurde zur Gänze mit XbaI verdaut und teilweise mit SspI verdaut. Eine 3700 bp-XbaI-SspI-Bande wurde aus dem Gel isoliert und mit den durch Annealing angelagerten doppelsträngigen Oligonucleotiden JCA17 (SEQ ID NR:37) und JCA018 (SEQ ID NR:38) ligiert.

JCA017:5'

CTAGACACTTTATGTTTTTTAATATCCGGTCTTAAAAGCTTCCCGGGGATCCTTATA

CGGGGAATAAT

JCA018:5'

ATTATTCCCCGTATAAGGATCCCCCGGGAAGCTTTTAAGACCGGATATTAAAAAACA

TAAAGTGT

[0151] Das aus dieser Ligierung resultierende Plasmid wurde als pJCA002 bezeichnet.

Konstruktion des Doppel-Insertionsvektors für NDV-F und HN.

[0152] Die H6-gesteuerte NDV-HN-Sequenz wurde in die H6-gesteuerte NDV-F-Kassette durch Clonieren eines HindIII-Fragments von pCE59, das mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase gefüllt worden

war, in die HpaI-Stelle von pCE71 inseriert, um pCE80 zu bilden. Das Plasmid pCE80 wurde vollständig mit NdeI verdaut und teilweise mit BglII verdaut, um ein 4760 bp-NdeI-BglII-Fragment herzustellen, das die NDV F- und HN-Gene enthält, die beide durch den H6-Promotor gelenkt und an die F8-flankierenden Arme gebunden sind. Das Plasmid pJCA021 wurde durch Inserieren eines 4900 bp-PvuII-HindII-Fragments von pRW731-15 in die SmaI- und HindII-Stellen von pBSSK+ erhalten. Das Plasmid pJCA021 wurde dann mit NdeI und BglII verdaut und an das 4760 bp-NdeI-BglII-Fragment von pCE80 ligiert, um pJCA024 zu bilden. Das Plasmid pJCA024 enthält daher die NDV-F und HN-Gene, die in ungekehrter Orientierung mit den 3'-Enden benachbart zwischen den FPV-flankierenden Armen inseriert wurden. Beide Gene sind mit dem Vacciniavirus-H6-Promotor verbunden. Der rechte flankierende Arm benachbart zu der NDV-F-Sequenz besteht aus 2350 bp der FPV-Sequenz. Der linke flankierende Arm benachbart zu der NDV-HN-Sequenz besteht aus 1700 bp der FPV-Sequenz.

Entwicklung von TROVAC-NDV.

[0153] Das Plasmid pJCA024 wurde in TROVAC-infizierte primäre CEF-Zellen durch Verwendung des Calciumphosphat-Präzipitationsverfahrens, das früher beschrieben wurde (Panicali et al., 1982; Piccini et al., 1987), transfiziert. Positive Plaques wurden auf der Basis der Hybridisierung an spezifische radioaktiv-markierte NDV-F- und HN-Sonden selektiert und fünf aufeinander folgenden Runden von Plaqueaufreinigung unterzogen, bis eine reine Population erzielt wurde. Ein repräsentativer Plaque wurde dann amplifiziert, und die resultierende TROVAC-Rekombinante wurde als TROVAC-NDV (vFP96) bezeichnet.

Immunfluoreszenz.

[0154] Indirekte Immunfluoreszenz wurde wie beschrieben (Taylor et al., 1990) unter Verwendung eines polyclonalen anti-NDV-Serums und von Seren, die in Kaninchen gegen Vacciniavirus-Rekombinanten produziert wurden, die NDV-F oder NDV-HN exprimieren, als mono-spezifische Reagenzien durchgeführt.

Immunpräzipitation.

[0155] Immunpräzipitationsreaktionen wurden wie beschrieben (Taylor et al., 1990) unter Verwendung eines polyclonalen anti-NDV-Serums, das von SPAFAS Inc., Storrs, CT erhalten wurde, durchgeführt.

[0156] Der Virusbestand wurde durch in situ-Plaquehybridisierung gescreent, um zu bestätigen, dass der F8-ORF deletiert wurde. Die korrekte Insertion der NDV-Gene in das TROVAC-Genom und die Deletion des F8-ORF wurde auch durch Southern-Blot-Hybridisierung bestätigt.

[0157] In NDV-infizierten Zellen ist das F-Glycoprotein in der Membran durch eine hydrophobe Transmembran-Region nahe dem Carboxy-Ende verankert und benötigt post-translationale Spaltung eines Vorläufers F_0 in zwei Disulfid-verbundene Polypeptide F_1 und F_2. Spaltung von F_0 ist wichtig für die Bestimmung der Pathogenität eines gegebenen NDV-Stamms (Homma und Ohuchi, 1973; Nagai et al., 1976; Nagai et al., 1980), und die Sequenz der Aminosäuren an der Spaltungsstelle ist daher kritisch für die Bestimmung der viralen Virulenz. Es ist festgestellt worden, dass die Aminosäuren an der Spaltungsstelle in der NDV-F-Sequenz, inseriert in FPV, um rekombinantes vFP29 zu bilden, die Sequenz Arg – Arg – Gln – Arg – Arg (SEQ ID NR:39) hatten (Taylor et al., 1889), was der Sequenz entspricht, von der gefunden wurde, dass sie eine Vorraussetzung für virulente NDV-Stämme ist (Chambers et al., 1986; Espion et al., 1987; Le et al., 1988; McGinnes und Morrison, 1986; Toyoda et al., 1987). Das HN-Glycoprotein, das in Zellen synthetisiert wird, die mit virulenten Stämmen von NDV infiziert wurden, ist ein ungespaltenes Glycoprotein von 74 kDA. Besonders avirulente Stämme wie Ulster und Queensland codieren einen HN-Vorläufer (HNo), der zur Aktivierung Spaltung benötigt (Garten et al., 1980).

[0158] Die Expression der F- und HN-Gene in TROVAC-NDV wurde analysiert, um zu bestätigen, dass die Genprodukte authentisch prozessiert und dargelegt wurden. Indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines polyclonalen anti-NDV-Hühnerserums bestätigte, dass immunreaktive Proteine auf der infizierten Zelloberfläche dargeboten werden. Um nachzuweisen, dass beide Proteine auf der Plasmamembran dargeboten werden, wurden mono-spezifische Kaninchenseren gegen Vacciniarekombinanten produziert, die entweder die F- oder die HN-Glycoproteine exprimieren. Indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung dieser Seren bestätigte die Oberflächendarbietung von beiden Proteinen.

[0159] Immunpräzipitations-Experimente wurden durch Verwendung von (^{35}S)-Methionin-markierten Lysaten von CEF-Zellen, die mit den Eltern- und rekombinanten Viren infiziert wurden, durchgeführt. Die erwarteten

Werte der offensichtlichen Molekulargewichte der glycosylierten Formen von F_1 und F_2 sind 54,7 beziehungsweise 10,3 kDa (Chambers et al., 1986). In den Immunpräzipitations-Experimenten unter Verwendung eines polyclonalen anti-NDV-Serums wurden Fusions-spezifische Produkte mit der passenden Größe von der einzelnen NDV-F-Rekombinante vFP29 (Taylor et al., 1990) und der doppelten TROVAC-NDV-Rekombinante vFP96 nachgewiesen. Das HN-Glycoprotein mit passender Größe wurde auch von der einzelnen NDV-HN Rekombinante VFP-47 (Edbauer et al., 1990) und TROVAC-NDV nachgewiesen. Keine NDV-spezifischen Produkte wurden von nicht-infizierten und Eltern-TROVAC-infizierten CEF-Zellen nachgewiesen.

[0160] In CEF-Zellen werden die F- und HN-Glycoproteine passend auf der infizierten Zelloberfläche dargelegt, wo sie durch NDV-Immunserum erkannt werden. Die Immunpräzipitationsanalyse wies darauf hin, dass das F_0-Protein authentisch in die F_1- und F_2-Bestandteile gespalten wurde, die in virulenten Stämmen erforderlich sind. In ähnlicher Weise wurde das HN-Glycoprotein in CEF-Zellen, die mit rekombinantem TROVAC-NDV infiziert wurden, authentisch prozessiert.

[0161] Frühere Berichte (Taylor et al., 1990; Edbauer et al., 1990; Boursnell et al., 1990a, b, c; Ogawa et al., 1990) würden darauf hinweisen, dass Expression von entweder HN oder F allein ausreichend ist, um schützende Immunität gegen NDV-Herausforderung hervorzurufen. Die Arbeit an anderen Paramyxoviren hat jedoch darauf hingewiesen, dass für vollständige schützende Immunität ein Antikörper gegen beide Proteine benötigt werden kann. Es ist gezeigt worden, dass SV5-Virus sich in Gewebekultur in der Anwesenheit von einem Antikörper gegen das HN-Glycoprotein aber nicht gegen das F-Glycoprotein verbreiten konnte (Merz et al., 1980). Zusätzlich ist vorgeschlagen worden, dass Impfstoffversagen mit abgetöteten Masernvirus-Impfstoffen auf Grund von Inaktivierung der Fusionskomponente erfolgten (Norrby et al., 1975). Da von beiden NDV-Glycoproteinen gezeigt worden ist, dass sie verantwortlich sind für das Hervorrufen von einem Virus-neutralisierenden Antikörper (Avery et al., 1979), und beide Glycoproteine, wenn sie individuell in einem Geflügelpockenvektor exprimiert werden, eine schützende Immunreaktion induzieren können, kann abgeschätzt werden, dass der wirksamste NDV-Impfstoff beide Glycoproteine exprimieren sollte.

Bezugsbeispiel 2 – KONSTRUKTION VON ALVAC-REKOMBINANTEN, DIE TOLLWUTVIRUS-GLYCOPROTEIN G EXPRIMIEREN

[0162] Dieses Beispiel beschreibt die Entwicklung von ALVAC, einem Kanarienpockenvirus-Vektor, und einer Kanarienpocken-Tollwut-Rekombinante, die als ALVAC-RG (vCP65) bezeichnet wird, und seiner Sicherheit und Wirksamkeit.

Zellen und Viren.

[0163] Das Eltern-Kanarienpockenvirus (Rentschler-Stamm) ist ein Impfstamm für Kanarien. Der Impfstoff-Stamm wurde von einem Wildtyp-Isolat erhalten und durch mehr als 200 serielle Passagen auf Hühnerembryofibroblasten abgeschwächt. Eine Haupt-Virussaat wurde vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unter Agar unterzogen, und ein Plaqueclon wurde durch fünf zusätzliche Passagen amplifiziert, nach denen der Virusbestand als das Eltern-Virus in den in vitro-Rekombinationstests verwendet wurde. Das plaqueaufgereinigte Kanarienpocken-Isolat wird als ALVAC bezeichnet.

Konstruktion eines Kanarienpocken-Insertionsvektors.

[0164] Ein 880 bp-Kanarienpocken-PuvII-Fragment wurde zwischen die PvuII-Stellen von pUC9 cloniert, um pRW764.5 zu bilden. Die Sequenz dieses Fragments ist in **Fig. 8** zwischen den Positionen 1372 und 2251 gezeigt. Die Grenzen eines offenen Leserahmens, der als C5 bezeichnet wurde, wurden definiert. Es wurde festgelegt, dass der offene Leserahmen an Position 166 innerhalb des Fragments begonnen und an Position 487 beendet wurde. Die C5-Deletion wurde ohne Störung von offenen Leserahmen durchgeführt. Die Basen von Position 167 bis Position 455 wurden durch die Sequenz (SEQ ID NR:39) GCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTT ersetzt. Diese Ersatzsequenz enthält HindIII-, SmaI- und EcoRI-Insertionsstellen, gefolgt von Translationsstopps und einem Transkriptions-Terminierungssignal, das von Vacciniavirus-RNA-Polymerase erkannt wird (Yuen et al., 1987). Die Deletion des C5-ORF wurde wie unten beschrieben durchgeführt. Das Plasmid pRW764.5 wurde teilweise mit RsaI geschnitten, und das lineare Produkt wurde isoliert. Das lineare RsaI-Fragment wurde wieder mit BglII geschnitten und das pRW764.5-Fragment, jetzt mit einer RsaI zu BglII-Deletion von Position 156 bis Position 462, wurde isoliert und als ein Vektor für die folgenden synthetischen Oligonucleotide verwendet:
RW145 (SEQ ID NO:40) ACTCTCAAAAGCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTTAT
RW146 (SEQ ID NO:419 GATCTTTATAAAAACTAGCTAGCTAGAATTCCCGGGAAGCTTTTGAGAGT

[0165] Die Oligonucleotide RW145 und RW146 wurde durch Annealing angelagert und in den oben beschriebenen pRW 764.5-RsaI- und BglII-Vektor inseriert. Das resultierende Plasmid wird als pRW831 bezeichnet.

Konstruktion eines Insertionsvektors, der das Tollwut G-Gen enthält.

[0166] Konstruktion von pRW838 wird unten veranschaulicht. Die Oligonucleotide A bis E, die das Translations-Startcodon des H6-Promotors mit dem ATG von Tollwut G überlappen, wurden in pUC9 als pRW737 cloniert. Die Oligonucleotide A bis E enthalten den H6-Promotor, startend bei NruI, bis zur HindIII-Stelle von Tollwut G, gefolgt von BglII. Die Sequenzen der Oligonucleotide A bis E ((SEQ DI NO:42) – (SEQ ID NR:46)) sind:

A (SEQ ID NO:42): CTGAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAA
GTTTGTATCGTAATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGT

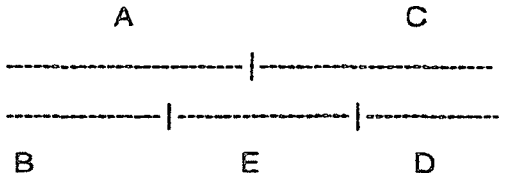
B (SEQ ID NO:43): CATTACGATACAAACTTAACGGATATCGCGATAA
TGAAATAATTTCAG

C (SEQ ID NO:44): ACCCCTTCTGGTTTTTCCGTTGTGTTTTGGGAAA
TTCCCTATTTACACGATCCCAGACAAGCTTAGATCTCAG

D (SEQ ID NO:45): CTGAGATCTAAGCTTGTCTGGGATCGTGTAAATA
GGGAATTTCCCAAAACA

E (SEQ ID NO:46): CAACGGAAAAACCAGAAGGGGTACAAACAGGAGA
GCCTGAGGAAC

[0167] Das Diagramm der durch Annealing angelagerten Oligonucleotide A bis E ist wie folgt:



[0168] Die Oligonucleotide A bis E wurden mit Kinase behandelt, annealt (95°C für 5 Minuten, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt) und zwischen die PvuII-Stellen von pUC9 inseriert. Das resultierende Plasmid pRW737 wurde mit HindIII und BglII geschnitten und als ein Vektor für das 1,6 kbp-HindIII-BglII-Fragment von ptg155PRO verwendet (Kieny et al., 1984), wodurch pRW739 hergestellt wurde. Die ptg155PRO-HindIII-Stelle liegt 86 bp stromabwärts des Tollwut G-Translations-Startcodons. BglII liegt stromabwärts des Tollwut G-Translations-Stoppcodons in ptg155PRO. pRW739 wurde teilweise mit NruI geschnitten, vollständig mit BglII geschnitten, und ein 1,7 bp-NruI-BglII-Fragment, das das 3'-Ende des früher beschriebenen H6-Promotors (Taylor et al., 1988a, b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989) durch das gesamte Tollwut G-Gen enthält, wurde zwischen die NruI- und BamHI-Stellen von pRW824 inseriert. Das resultierende Plasmid wird als pRW832 bezeichnet. Insertion in pRW824 fügten den H6-Promotor 5' von NruI hinzu. Die pRW824-Sequenz von BamHI gefolgt von SmaI ist (SEQ ID NR:47): GGATCCCCGGG. pRW824 ist ein Plasmid, das ein nicht-passendes Gen enthält, das präzise an den Vacciniavirus-H6-Promotor gebunden ist. Der Verdau mit NruI und BamHI schnitt dieses nicht-passende Gen vollständig heraus. Das 1,8 kbp-pRW832-SmaI-Fragment, das das H6-gesteuerte Tollwut G enthält, wurde in das SmaI von pRW831 inseriert, um Plasmid pRW838 zu bilden.

Entwicklung von ALVAC-RG.

[0169] Das Plasmid pRW838 wurde in ALVAC-infizierte primäre CEF-Zellen durch Verwendung des früher beschriebenen Calciumphosphat-Präzipitationsverfahrens transfiziert (Panicali et al., 1982; Piccini et al., 1987). Positive Plaques wurden auf der Basis der Hybridisierung an eine spezifische Tollwut-G-Sonde selektiert und 6 sequenziellen Runden einer Plaqueaufreinigung unterzogen, bis eine reine Population erzielt wurde. Ein repräsentativer Plaque wurde dann amplifiziert, und die resultierende ALVAC-Rekombinante wurde als ALVAC-RG (vCP65) bezeichnet (siehe auch **Fig.** 9). Die korrekte Insertion des Tollwut G-Gens in das ALVAC-Genom ohne folgende Mutation wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

Immunfluoreszenz.

[0170] Während der letzten Stadien der Zusammenstellung von reifen Tollwutvirus-Partikeln wurde die Glycoprotein-Komponente vom Golgi-Apparat zu der Plasmamembran transportiert, wo sie mit dem Carboxy-Ende in das Cytoplasma reichend und dem Großteil des Proteins auf der externen Oberfläche der Zellmembran akkumuliert. Um zu bestätigen, dass das Tollwut-Glycoprotein, das in ALVAC-RG exprimiert wird, korrekt präsentiert wurde, wurde Immunfluoreszenz an primären CEF-Zellen, die mit ALVAC oder ALVAC-RG infiziert worden waren, durchgeführt. Immunfluoreszenz wurde wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) unter Verwendung eines monoclonalen Tollwut G-Antikörpers durchgeführt. Starke Oberflächenfluoreszenz wurde auf mit ALVAC-RG, aber nicht auf den mit dem Eltern-ALVAC infizierten Zellen nachgewiesen.

Immunpräzipitation.

[0171] Vorgebildete Monolayer von primären CEF-, Vero- (einer Linie von afrikanischen Grünaffen-Nierenzellen ATCC # CCL81) und MRC-5-Zellen (eine Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, die von normalem menschlichen fetalen Lungengewebe abstammt ATCC # CCL171) wurden mit 10 pfu pro Zelle mit dem Eltern-Virus ALVAC und dem rekombinanten Virus ALVAC-RG in der Anwesenheit von radioaktiv-markiertem ^{35}S-Methionin beimpft und wie früher beschrieben behandelt (Taylor et al., 1990). Immunpräzipitations-Reaktionen wurden unter Verwendung eines Tollwut G-spezifischen monoclonalen Antikörpers durchgeführt. Wirksame Expression von einem Tollwut-spezifischen Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 67 kDA wurde mit dem rekombinanten ALVAC-RG nachgewiesen. Keine Tollwut-spezifischen Produkte wurden in nicht-infizierten Zellen oder in Zellen, die mit dem Eltern-ALVAC-Virus infiziert worden waren, nachgewiesen.

Sequenzielles Passagier-Experiment.

[0172] In Untersuchungen mit ALVAC-Virus in einer Auswahl von nicht-Vogelspezies wurde keine proliferative Infektion oder offene Krankheit beobachtet (Taylor et al., 1991b). Um dennoch zu etablieren, dass sich weder das Eltern- noch das rekombinante Virus an das Wachstum in Zellen von nicht-Vogelspezies anpassen könnten, wurde ein sequenzielles Passagier-Experiment durchgeführt.

[0173] Die zwei Viren ALVAC und ALVAC-RG wurden in 10 sequenziellen Blindpassagen in drei Zelllinien beimpft:

(1) Primäre Hühnerembryofibroblasten (CEF)-Zellen, die von 11-Tage-alten weißen Leghorn-Embryonen produziert wurden;

(2) Vero-Zellen – eine konstante Linie von afrikanischen Grünaffen-Nierenzellen (ATCC # CCL81); und

(3) MRC-5-Zellen – eine diploide Zelllinie, die von menschlichem fetalen Lungengewebe abstammt (ATCC # CCL171).

[0174] Die anfängliche Beimpfung wurde in einer m.o.i. von 0,1 pfu pro Zelle unter Verwendung von drei 60 mm-Schalen von jeder Zelllinie, enthaltend 2×10^6 Zellen pro Schale, durchgeführt. Eine Schale wurde in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid (Ara C), einen Inhibitor der DNA-Replikation, beimpft. Nach einer Absorptionsperiode von 1 Stunde bei 37°C wurde das Inoculum entfernt und der Monolayer gewaschen, um unabsorbiertes Virus zu entfernen. Zu dieser Zeit wurde das Medium mit 5 ml EMEM + 2% NBCS auf zwei Schalen (Proben t0 und t7) und mit 5 ml EMEM + 2% NBCS, enthaltend 40 µg/ml Ara C, auf der dritten (Probe t7A) ersetzt. Die Probe t0 wurde bei –70°C gefroren, um einen Hinweis auf das verbliebene Eingabevirus zu liefern. Die Proben t7 und t7A wurden bei 37°C für 7 Tage inkubiert, danach wurden die Inhalte geerntet und die Zellen durch indirekte Ultraschallbehandlung zerstört.

[0175] Ein ml der Probe t7 von jeder Zelllinie wurde unverdünnt auf drei Schalen der selben Zelllinie (um Proben t0, t7 und t7A zu liefern) und auf eine Schale der primären CEF-Zellen beimpft. Die Proben t0, t7 und t7A wurden als Passage 1 behandelt. Die zusätzliche Beimpfung auf CEF-Zellen wurde eingeschlossen, um einen Amplifikationsschritt für eine empfindlichere Bestimmung des Virus zu liefern, das in den nicht-Vogelzellen vorhanden sein könnte.

[0176] Diese Vorgehensweise wurde für 10 (CEF und MRC-5) oder 8 (Vero) sequenzielle Blindpassagen wiederholt. Die Proben wurden dann drei Mal gefroren und wieder aufgetaut und durch Titration auf primären CEF-Monolayern getestet.

[0177] Der Virusertrag in jeder Probe wurde dann durch Plaquetitration auf CEF-Monolayern unter Agarose bestimmt. Die zusammengefassten Ergebnisse des Experiments sind in den Tabellen 1 und 2 gezeigt.

[0178] Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl das Eltern-ALVAC als auch das rekombinante ALVAC-RG zu anhaltender Replikation auf CEF-Monolayern ohne Titerverlust in der Lage sind. In Vero-Zellen fielen die Spiegel des Virus nach 2 Passagen für ALVAC und 1 Passage für ALVAC-RG unter den Nachweisspiegel. In MRC-5-Zellen war ein ähnliches Ergebnis offensichtlich, und nach 1 Passage wurde kein Virus nachgewiesen. Obwohl die Ergebnisse für nur vier Passagen in den Tabellen 1 und 2 gezeigt sind, wurde die Serie für 8 (Vero) und 10 (MCR-5) Passagen ohne nachweisbare Anpassung beider Viren auf Wachstum in den nicht-Vogelzellen fortgesetzt.

[0179] In Passage 1 waren relativ hohe Spiegel von Virus in der t7-Probe in MRC-5- und Vero-Zellen vorhanden. Dieser Spiegel von Virus war jedoch äquivalent zu jenem, der in der t0-Probe und der t7A-Probe, die in der Anwesenheit von Cytosin-Arabinosid inkubiert wurde, in dem keine virale Replikation erfolgen kann, gesehen wurde. Dies zeigte, dass die Spiegel des Virus, die nach 7 Tagen in nicht-Vogelzellen gesehen werden, Restvirus und nicht neu-repliziertes Virus darstellten.

[0180] Um den Test empfindlicher zu machen, wurde ein Teil der Tag 7-Ernte von jeder Zelllinie auf einen permissiven CEF-Monolayer beimpft und bei cytopathischem Effekt (CPE) oder nach 7 Tagen, wenn kein CPE offensichtlich war, geerntet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 3 gezeigt. Sogar nach Amplifikation durch eine permissive Zelllinie wurde das Virus nur für zwei zusätzliche Passagen in MRC-5- und Vero-Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es unter den verwendeten Bedingungen keine Anpassung eines Virus auf Wachstum in Vero- oder MRC-5-Zellen gab.

Beimpfen von Makakken.

[0181] Vier HIV-seropositive Makakken wurden anfänglich mit ALVAC-RG wie in Tabelle 4 beschrieben beimpft. Nach 100 Tagen wurden diese Tiere wieder beimpft, um einen Verstärkereffekt nachzuweisen, und zusätzliche sieben Tiere wurden mit einem Bereich von Dosen beimpft. Blut wurde in geeigneten Intervallen gezogen, und Seren wurden nach Hitzeinaktivierung bei 56°C für 30 Minuten auf die Anwesenheit von anti-Tollwut-Antikörper unter Verwendung des Rapid Fluorescent Focus Inhibition Assay (Smith et al., 1973) analysiert.

Beimpfen von Chimpansen.

[0182] Zwei erwachsene männliche Chimpansen (50 bis 65 kg Gewichtsbereich) wurden intramuskulär oder subcutan mit 1×10^7 pfu von vCP65 beimpft. Die Tiere wurden auf Reaktionen überwacht und ihnen wurde in regelmäßigen Intervallen für die Analyse auf die Anwesenheit von anti-Tollwut-Antikörper mit dem RFFI-Test (Smith et al., 1973) Blut entnommen. Die Tiere wurden mit einer äquivalenten Dosis 13 Wochen nach der anfänglichen Beimpfung wieder beimpft.

Beimpfen von Mäusen.

[0183] Gruppen von Mäusen wurden mit 50 bis 100 µl eines Verdünnungsbereichs unterschiedlicher Chargen von vCP65 beimpft. Die Mäuse wurden in die Fußsohle beimpft. Am Tag 14 wurden die Mäuse durch intrakraniale Beimpfung von 15 bis 43 Maus-LD_{50} des virulenten CVS-Stamms des Tollwutvirus herausgefordert. Das Überleben der Mäuse wurde überwacht und eine schützende 50%-Dosis (PD_{50}) 28 Tage nach dem Beimpfen berechnet.

Beimpfen von Hunden und Katzen.

[0184] Zehn 5 Monate-alte Beagle-Hunde und 10 4 Monate-alte Katzen wurden subcutan mit entweder 6,7 oder 7,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG beimpft. Vier Hunde und vier Katzen wurden nicht beimpft. Den Tieren wurde 14 und 28 Tage nach dem Beimpfen Blut entnommen und der anti-Tollwut-Antikörper in einem RFFI-Test bewertet. Die Tiere, die 6,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG erhalten hatten, wurden 29 Tage nach der Impfung mit 3,7 $\log_{10}$ Maus-LD_{50} (Hunde) oder 4,3 $\log_{10}$ Maus-LD_{50} (Katzen) des NYGS-Tollwutvirus-Challengestamms gechallenged.

Beimpfen von Hörnchenaffen.

[0185] Drei Gruppen von vier Hörnchenaffen (Saimiri sciureus) wurden mit einem der drei Viren (a) ALVAC, dem Eltern-Kanarienpockenvirus, (b) ALVAC-RG, der Rekombinante, die das Tollwut G-Glycoprotein exprimiert, oder (c) vCP37, einer Kanarienpocken-Rekombinante, die das Hüllenglycoprotein des felinen Leukämievirus exprimiert, beimpft. Beimpfungen wurden unter Ketamin-Anästhesie durchgeführt. Jedes Tier erhielt zur

selben Zeit: (1) 20 µl, instilliert auf die Oberfläche des rechten Auges ohne Skarifizierung; (2) 100 µl als mehrere Tropfen in das Maul; (3) 100 µl in jede von zwei intradermalen Injektionsstellen in der rasierten Haut der externen Fläche des rechten Arms; und (4) 100 µl in den anterioren Muskel des rechten Oberschenkels.

[0186] Vier Affen wurden mit jedem Virus beimpft, zwei mit insgesamt 5,0 $\log_{10}$ pfu und zwei mit insgesamt 7,0 $\log_{10}$ pfu. Die Tiere wurden in regelmäßigen Intervallen geblutet und die Seren auf die Anwesenheit von anti-Tollwut-Antikörper unter Verwendung eines RFFI-Tests (Smith et al., 1973) analysiert. Die Tiere wurden täglich auf Reaktionen auf die Impfung überwacht. Sechs Monate nach der anfänglichen Impfung wurden die vier Affen, die ALVAC-RG erhalten hatten, zwei Affen, die anfänglich vCP37 erhielten, und zwei Affen, die anfänglich ALVAC erhielten, so wie ein unbehandelter Affe mit 6,5 $\log_{10}$ pfu von ALVAC-RG subcutan beimpft. Die Seren wurden auf die Anwesenheit von Tollwut-neutralisierendem Antikörper in einem RFFI-Test (Smith et al., 1973) überwacht.

Beimpfen von menschlichen Zelllinien mit ALVAC-RG.

[0187] Um nachzuweisen, ob wirksame Expression eines fremden Gens in nicht-Vogelzellen, in denen sich das Virus nicht produktiv repliziert, erreicht werden könnte, wurden fünf Zelltypen, einer von Vogel und vier nicht von Vögeln, auf Virusertrag, Expression des fremden Tollwut G-Gens und spezifische virale DNA-Akkumulierung analysiert. Die beimpften Zellen waren:

(a) Vero, Nierenzellen von afrikanischen Grünaffen, ATCC # CCL81;
(b) MRC-5, menschliche embryonale Lunge, ATCC # CCL 171;
(c) WISH menschliches Amnion, ATCC # CCL 25;
(d) Detroit-532, menschliche Vorhaut, Down Syndrom, ATCC # CCL 54; und
(e) Primäre CEF-Zellen.

[0188] Hühnerembryofibroblastenzellen, die von 11 Tage alten weißen Leghorn-Embryonen produziert wurden, wurden als eine Positivkontrolle eingeschlossen. Alle Beimpfungen wurden auf vorgeformten Monolayern von 2×10^6 Zellen wie unten diskutiert durchgeführt.

A. Verfahren zur DNA-Analyse.

[0189] Drei Schalen von jeder Zelllinie wurden mit 5 pfu/Zelle des zu testenden Virus beimpft, wobei jeweils eine zusätzliche Schale jeder Zelllinie unbeimpft blieb. Eine Schale wurde in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid (Ara C) inkubiert. Nach einer Adsorptionsperiode von 60 Minuten bei 37°C wurde das Inoculum entfernt und der Monolayer zweimal gewaschen, um nicht adsorbiertes Virus zu entfernen. Das Medium (mit oder ohne Ara C) wurde dann ersetzt. Die Zellen von einer Schale (ohne Ara C) wurden als eine Zeitpunkt Null-Probe geerntet. Die verbleibenden Schalen wurden bei 37°C für 72 Stunden inkubiert, zu welcher Zeit die Zellen geerntet und verwendet wurden, um die DNA-Akkumulierung zu analysieren. Jede Probe von 2×10^6 Zellen wurde in 0,5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), enthaltend 40 mM EDTA, resuspendiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein gleiches Volumen von 1,5% Agarose, die auf 42°C vorgewärmt wurde und 120 mM EDTA enthielt, wurde zu der Zellsuspension zugefügt und sanft gemischt. Die Suspension wurde auf eine Agarose-Stopfenform transferiert und für mindestens 15 min aushärten gelassen. Die Agarosestopfen wurden dann entfernt und für 12–16 Stunden bei 50°C in einem Volumen von Lysepuffer (1% Sarkosyl, 100 µg/ml Proteinase K, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM EDTA) inkubiert, so dass die Stopfen vollständig bedeckt waren. Der Lysepuffer wurde dann mit 5,0 ml sterilem 0,5 × TBE (44,5 mM Tris-Borat, 44,5 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) ersetzt und bei 4°C für 6 Stunden mit 3 Wechsel von TBE-Puffer äquilibriert. Die virale DNA im Stopfen wurde von zellulärer RNA und DNA unter Verwendung eines Pulsfeld-Elektrophoresesystems fraktioniert. Elektrophorese wurde für 20 Stunden bei 180 V mit einem Auslauf von 50–90 sec bei 15°C in 0,5 × TBE durchgeführt. Die DNA wurde mit Lambda-DNA-Molekulargewichts-Standards laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurde die virale DNA-Bande durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die DNA wurde dann auf ein Nitrocellulosemembran transferiert und mit einer radioaktiv-markierten Sonde, die aus aufgereinigter genomischer ALVAC-DNA hergestellt wurde, sondiert.

B. Bestimmen des Virusertrags.

[0190] Die Schalen wurden genau wie oben beschrieben beimpft, mit der Ausnahme, dass die Eingabevielzahl 0,1 pfu/Zelle war. 72 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen durch drei aufeinander folgende Zyklen von Einfrieren und Auftauen lysiert. Der Virusertrag wurde durch Plaquetitration auf CEF-Monolayern beurteilt.

C. Analyse der Expression des Tollwut G-Gens.

[0191] Die Schalen wurden mit rekombinantem oder Eltern-Virus in einer Vielzahl von 10 pfu/Zelle beimpft, wobei jeweils eine zusätzliche Schale eine nicht-infizierte Viruskontrolle blieb. Nach einer ein-Stunden Absorptionsperiode wurde das Medium entfernt und mit Methionin-freiem Medium ersetzt. Nach einem 30 Minuten-Zeitraum wurde dieses Medium mit Methionin-freiem Medium, enthaltend 25 uCi/ml ^{35}S-Methionin, ersetzt. Infizierte Zellen wurden über Nacht (ungefähr 16 Stunden) markiert, dann durch die Zugabe von Puffer A-Lysepuffer lysiert. Immunpräzipitation wurde wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) unter Verwendung eines Tollwut G-spezifischen monoclonalen Antikörpers durchgeführt.

Ergebnisse: Bestimmung des Virusertrags.

[0192] Die Ergebnisse der Titration auf den Ertrag 72 Stunden nach der Beimpfung mit 0,1 pfu pro Zelle sind in Tabelle 5 gezeigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass, während eine produktive Infektion in den Vogelzellen erreicht werden kann, durch dieses Verfahren in den vier nicht-Vogel-Zellsystemen keine Steigerung des Virusertrags nachgewiesen werden kann.

Analyse der viralen DNA-Akkumulation.

[0193] Um nachzuweisen, ob der Block der produktiven viralen Replikation in den nicht-Vogelzellen vor oder nach der DNA-Replikation erfolgt, wurde DNA der Zelllysate durch Elektrophorese fraktioniert, auf Nitrocellulose transferiert und auf die Anwesenheit von spezifischer viraler DNA sondiert. Jede DNA von nicht-infizierten CEF-Zellen, ALVAC-RG-infizierten CEF-Zellen zum Zeitpunkt Null, ALVAC-RG-infizierte CEF-Zellen 72 Stunden nach der Infektion und ALVAC-RG-infizierte CEF-Zellen 72 Stunden nach der Infektion in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid zeigte eine gewisse Hintergrundaktivität, wahrscheinlich auf Grund von kontaminierender zellulärer CEF-DNA in der radioaktiv-markierten ALVAC-DNA-Sondenpräparation. ALVAC-RG-infizierte CEF-Zellen zeigten jedoch 72 Stunden nach der Infektion eine starke Bande in der Region von ungefähr 350 kbp, was virale ALVAC-spezifische DNA-Akkumulierung repräsentierte. Keine solche Bande ist nachweisbar, wenn die Kultur in der Anwesenheit des DNA-Syntheseinhibitors Cytosin-Arabinosid inkubiert wird. Äquivalente Proben, die in Vero-Zellen produziert wurden, zeigten eine sehr schwache Bande bei ungefähr 350 kbp in den ALVAC-RG-infizierten Vero-Zelle zum Zeitpunkt Null. Dieser Spiegel repräsentierte Restvirus. Die Intensität der Bande wurde 72 Stunden nach der Infektion amplifiziert, was darauf hinweist, dass ein gewisser Spiegel von spezifischer viraler DNA-Replikation in Vero-Zellen erfolgt war, der nicht in einer Erhöhung der viralen Vermehrung resultierte. Äquivalente Proben, die in MRC-5-Zellen produziert wurden, wiesen darauf hin, dass keine spezifische virale DNA-Akkumulation unter diesen Bedingungen in dieser Zelllinie nachgewiesen wurde. Dieses Experiment wurde dann ausgeweitet, um zusätzliche menschliche Zelllinien, insbesondere WISH- und Detroid-532-Zellen, einzuschließen. ALVAC-infizierte CEF-Zellen dienten als eine Positivkontrolle. Spezifische virale DNA-Akkumulierung wurde weder in WISH- noch in Detroit-Zellen, die mit ALVAC-RG beimpft worden waren, nachgewiesen. Es sollte bemerkt werden, dass die Grenzen des Nachweises dieses Verfahrens nicht vollständig abgesichert worden sind und virale DNA-Akkumulierung erfolgen kann, aber in einem Spiegel unter der Empfindlichkeit des Verfahrens. Andere Experimente, in denen virale DNA-Replikation durch ^{3}H-Thymidin-Inkorporierung gemessen wurde, unterstützen die Ergebnisse, die mit Vero- und MRC-5-Zellen erzielt worden sind.

Analyse der Tollwutgen-Expression.

[0194] Um nachzuweisen, ob irgendeine virale Genexpression, besonders jene des inserierten fremden Gens, in den menschlichen Zelllinien sogar in der Abwesenheit von viraler DNA-Replikation erfolgte, wurden Immunpräzipitations-Experimente auf ^{35}S-Methionin-markierten Lysaten von Vogel- und nicht-Vogelzellen, die mit ALVAC und ALVAC-RG infiziert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation unter Verwendung eines monoclonalen Tollwut G-spezifischen Antikörpers illustrierte spezifische Immunpräzipitation eines 67 kDa-Glycoproteins in CEF-, Vero- und MRC-5-, WISH- und Detroit-Zellen, die mit ALVAC-RG infiziert worden waren. Keine solchen spezifischen Tollwut-Genprodukte wurden in den nicht-infizierten und infizierten parentalen Zelllysaten nachgewiesen.

[0195] Die Ergebnisse dieses Experiments wiesen darauf hin, dass in den analysierten menschlichen Zelllinien, obwohl die ALVAC-RG-Rekombinante in der Lage war, eine Infektion zu iniziieren und ein fremdes Genprodukt unter der transkriptionellen Kontrolle des frühen/späten H6-Vacciniavirus-Promotors zu exprimieren, die Replikation nicht durch DNA-Replikation stattfand, noch wurde irgendeine nachweisbare virale Vermehrung produziert. In den Vero-Zellen, obwohl ein gewisser Spiegel von ALVAC-RG-spezifischer DNA-Akkumu-

lierung beobachtet wurde, wurde durch dieses Verfahren keine virale Vermehrung nachgewiesen. Diese Ergebnisse würden darauf hinweisen, dass in den analysierten menschlichen Zelllinien das Blockieren der viralen Replikation vor dem Beginn der DNA-Replikation erfolgt, während in Vero-Zellen das Blockieren nach dem Beginn der viralen DNA-Replikation erfolgt.

[0196] Um nachzuweisen, ob das Tollwut-Glycoprotein, das in ALVAC-RG exprimiert wird, immunogen war, wurde eine Anzahl von Tier-Spezies durch Beimpfen mit der Rekombinante getestet. Die Wirksamkeit der derzeitigen Tollwut-Impfstoffe wird in einem Mausmodell-System bewertet. Ein ähnlicher Test wurde daher unter Verwendung von ALVAC-RG durchgeführt. Neun unterschiedliche Präparationen von Virus (einschließlich eine Impfstoff-Charge (J), die nach 10 seriellen Gewebekultur-Passagen der Virussaat produziert wurde) mit infektiösen Titern im Bereich von 6,7 bis 8,4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ pro ml wurden seriell verdünnt und 50 bis 100 µl der Verdünnungen in die Fußsohle von vier bis sechs Wochen-alten Mäusen beimpft. Die Mäuse wurden 14 Tage später auf dem intrakranialen Weg mit 300 µl des CVS-Stamms des Tollwutvirus, der von 15 bis 43 Maus-LD_{50} enthält, bestimmt durch Lethalitätstitration in einer Kontrollgruppe von Mäusen, herausgefordert. Die Potenz, als die PD_{50} ausgedrückt (schützende Dosis 50%), wurde 14 Tage nach der Herausforderung berechnet. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ALVAC-RG beständig in der Lage war, Mäuse gegen Tollwutvirus-Herausforderung mit einem PD_{50}-Wert im Bereich von 3,33 bis 4,56 mit einem Mittelwert von 3,73 (STD 0,48) zu schützen. Als eine Ausdehnung dieser Studie wurden männliche Mäuse intrakranial mit 50 µl Virus, enthaltend 6,0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG, oder mit einem äquivalenten Volumen einer nicht-infizierten Zellsuspension beimpft. Die Mäuse wurden an den Tagen 1, 3 und 6 nach dem Beimpfen getötet und ihre Gehirne entfernt, fixiert und geschnitten. Histopathologische Untersuchung zeigte keinen Hinweis auf Neurovirulenz von ALVAC-RG in Mäusen.

[0197] Um die Sicherheit und Wirksamkeit von ALVAC-RG für Hunde und Katzen zu bewerten, wurde eine Gruppe von 14 fünf Monate-alten Beaglen und 14 vier Monate-alten Katzen analysiert. Vier Tiere von jeder Spezies wurden nicht geimpft. Fünf Tiere erhielten 6,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ subcutan, und fünf Tiere erhielten 7,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ auf dem selben Weg. Den Tieren wurde für die Analyse auf anti-Tollwut-Antikörper Blut entnommen. Die Tiere, die keine Beimpfung oder 6,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG erhielten, wurden 29 Tage nach der Impfung mit 3,7 $\log_{10}$ Maus-LD_{50} (Hunde, in den temporalen Muskel) oder 4,3 $\log_{10}$ Maus-LD_{50} (Katzen, in den Nacken) des NYGS-Tollwutvirus-Challenge-Stamms herausgefordert. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 7 gezeigt.

[0198] Es wurden keine schädlichen Reaktionen weder bei Katzen noch Hunden auf die Beimpfung mit jeder Dosis des Inoculum-Virus gesehen. Vier von 5 Hunden, die mit 6,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ immunisiert wurden, hatten Antikörpertiter am Tag 14 nach der Impfung, und alle Hunde hatten nach 29 Tagen Titer. Alle Hunde waren vor einer Herausforderung geschützt, die drei von vier Kontrollen tötete. Bei Katzen hatten drei von fünf Katzen, die 6,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ erhielten, spezifische Antikörpertiter am Tag 14, und alle Katzen waren am Tag 29 positiv, obwohl der durchschnittliche Antikörpertiter mit 2,9 IE niedrig war. Drei von fünf Katzen überlebten eine Herausforderung, die alle Kontrollen tötete. Alle Katzen, die mit 7,7 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ immunisiert wurden, hatten am Tag 14 Antikörpertiter, und am Tag 29 wurde der geometrische Durchschnittstiter als 8,1 Internationale Einheiten berechnet.

[0199] Die Immunreaktion von Hörnchenaffen (Saimiri sciureus) auf Beimpfen mit ALVAC, ALVAC-RG und einer nicht-verwandten Kanarienpockenvirus-Rekombinante wurde untersucht. Gruppen von Affen wurden wie oben beschrieben beimpft und die Seren auf die Anwesenheit von Tollwut-spezifischem Antikörper analysiert. Abgesehen von geringfügigen typischen Hautreaktionen auf die Beimpfung auf dem intradermalen Weg wurde keine nachteilige Reaktivität in den Affen gesehen. Kleine Mengen von Restvirus wurden aus den Hautläsionen nach der intradermalen Beimpfung nur an den Tagen zwei und vier nach der Beimpfung isoliert. Alle Proben am Tag sieben oder später waren negativ. Es gab keine lokale Reaktion auf intramuskuläre Injektion. Alle vier mit ALVAC-RG beimpften Affen entwickelten anti-Tollwutserum-neutralisierende Antikörper, gemessen in einem RFFI-Test. Ungefähr sechs Monate nach der anfänglichen Beimpfung wurden alle Affen und ein zusätzlicher unbehandelter Affe auf dem subcutanen Weg auf der äußeren Fläche des linken Oberschenkels mit 6,5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG wieder beimpft. Die Seren wurde auf die Anwesenheit von anti-Tollwut-Antikörper analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt.

[0200] Vier der fünf Affen, die gegen Tollwut unbehandelt waren, entwickelten sieben Tage nach der Beimpfung mit ALVAC-RG eine serologische Reaktion. Alle fünf Affen hatten 11 Tage nach der Beimpfung nachweisbaren Antikörper. Von den vier Affen mit vorherigem Ausgesetzsein gegenüber dem Tollwut-Glycoprotein zeigten alle einen signifikanten Anstieg des Serum-neutralisierenden Titers zwischen den Tagen 3 und 7 nach der Impfung. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Impfung von Hörnchenaffen mit ALVAC-RG keine un-

günstigen Nebenwirkungen produziert und eine primäre neutralisierende Antikörperreaktion induziert werden kann. Bei Wiederimpfung wird auch eine anamnestische Reaktion induziert. Vorheriges Ausgesetzsein gegenüber ALVAC oder gegenüber einer Kanarienpocken-Rekombinante, die ein nicht-verwandtes fremdes Gen exprimiert, interferiert nicht mit der Induktion einer anti-Tollwut-Immunreaktion bei Wiederimpfung.

[0201] Die immunologische Reaktion von HIV-2-seropositiven Makakken auf Beimpfung mit ALVAC-RG wurde bewertet. Die Tiere wurden wie oben beschrieben beimpft und die Anwesenheit von anti-Tollwutserum-neutralisierendem Antikörper in einem RFFI-Test bewertet. Die Ergebnisse, die in Tabelle 9 gezeigt sind, wiesen darauf hin, dass HIV-2-positive Tiere, die auf dem subkutanen Weg beimpft wurden, 11 Tage nach einer Beimpfung anti-Tollwut-Antikörper entwickelten. Eine anamnestische Reaktion wurde nach einer Boosterbeimpfung, die ungefähr drei Monate nach der ersten Beimpfung gegeben wurde, nachgewiesen. In Tieren, die die Rekombinante auf dem oralen Weg erhielten, wurde keine Reaktion nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine Reihe von sechs Tieren mit absteigenden Dosen von ALVAC-RG, das entweder auf dem intramuskulären oder subkutanen Wegen verabreicht wurde, beimpft. Fünf der sechs beimpften Tiere reagierten 14 Tage nach der Impfung mit keinem signifikanten Unterschied im Antikörpertiter.

[0202] Zwei Chimpansen, die vorher HIV ausgesetzt waren wurden mit 7,0 $\log_{10}$ pfu von ALVAC-RG auf dem subkutanen oder intramuskulären Weg beimpft. Drei Monate nach den Beimpfungen wurden beide Tiere auf identische Weise wieder geimpft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt.

[0203] Keine ungünstige Reaktivität auf die Beimpfung auf entweder intramuskulären oder subkutanen Wegen wurde beobachtet. Beide Chimpansen reagierten auf die primäre Beimpfung spätestens nach 14 Tagen, und eine stark ansteigende Reaktion wurde in Folge von nochmaliger Impfung nachgewiesen.

Tabelle 1. Sequenzielle Passage von ALVAC in Vogel- und nicht-Vogelzellen.

	CEF	Vero	MCR-5
Durchlauf 1			
Probe t0[a]	2,4	3,0	2,6
t7[b]	7,0	1,4	0,4
t7A[c]	1,2	1,2	0,4
Durchlauf 2			
Probe t0	5,0	0,4	N.D.[d]
t7	7,3	0,4	N.D.
t7A	3,9	N.D.	N.D.
Durchlauf 3			
Probe t0	5,4	0,4	N.D.
t7	7,4	N.D.	N.D.
t7A	3,8	N.D.	N.D.
Durchlauf 4			
Probe t0	5,2	N.D.	N.D.
t7	7,1	N.D.	N.D.
t7A	3,9	N.D.	N.D.

a: Diese Probe wurde zum Zeitpunkt Null geerntet und repräsentiert das verbleibende Eingabevirus. Der Titer wird als $\log_{10}$pfu pro ml ausgedrückt.
b: Diese Probe wurde 7 Tage nach der Infektion geerntet.
c: Diese Probe wurde in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid beimpft und 7 Tage nach der Infek-

tion geerntet.
d: Nicht nachweisbar

Tabelle 2. Sequenzielle Passage von ALVAC-RG in Vogel- und nicht-Vogelzellen

	CEF	Vero	MCR-5
Durchlauf 1			
Probe t0[a]	3,0	2,9	2,9
t7[b]	7,1	1,0	1,4
t7A[c]	1,8	1,4	1,2
Durchlauf 2			
Probe t0	5,1	0,4	0,4
t7	7,1	N.D.[d]	N.D.
t7A	3,8	N.D.	N.D.
Durchlauf 3			
Probe t0	5,1	0,4	N.D.
t7	7,2	N.D.	N.D.
t7A	3,6	N.D.	N.D.
Durchlauf 4			
Probe t0	5,1	N.D.	N.D.
t7	7,0	N.D.	N.D.
t7A	4,0	N.D.	N.D.

a: Diese Probe wurde zum Zeitpunkt Null geerntet und repräsentiert das verbleibende Eingabevirus. Der Titer wird als $\log_{10}$pfu pro ml ausgedrückt.
b: Diese Probe wurde 7 Tage nach der Infektion geerntet.
c: Diese Probe wurde in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid beimpft und 7 Tage nach der Infektion geerntet.
d: Nicht nachweisbar.

Tabelle 3. Amplifikation des Restvirus durch Passage in CEF-Zellen

	CEF	Vero	MRC-5
a) ALVAC			
Durchlauf 2[a]	7,0[b]	6,0	5,2
3	7,5	4,1	4,9
4	7,5	N.D.[c]	N.D.
5	7,1	N.D.	N.D.
b) ALVAC-RG			
Durchlauf 2[a]	7,2	5,5	5,5
3	7,2	5,0	5,1
4	7,2	N.D.	N.D.
5	7,2	N.D.	N.D.

a: Durchlauf 2 repräsentiert die Amplifikation in CEF-Zellen der Probe vom Tag 7 Durchlauf Pass 1.
b: Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ pfu pro ml
c: Nicht nachweisbar

Tabelle 4: Plan der Beimpfung von Rhesusmakakken mit ALVAC-RG (vCP65)

Tier		Beimpfung
176L	Primär:	1×10^8 pfu von vCP65 oral in TANG
	Sekundär:	1×10^7 pfu von vCP65 plus 1×10^7 pfu von vCP82[a] auf sc Weg
185 L	Primär:	1×10^8 pfu von vCP65 oral in Tang
	Sekundär:	1×10^7 pfu von vCP65 plus 1×10^7 pfu von vCP82 auf sc Weg
177 L	Primär:	5×10^7 pfu SC von vCP65 auf SC Weg
	Sekundär:	1×10^7 pfu von vCP65 plus 1×10^7 pfu von vCP82 auf sc Weg
186L	Primär:	5×10^7 pfu von vCP65 auf SC Weg
	Sekundär:	1×10^7 pfu von vCP65 plus 1×10^7 pfu von vCP82 auf sc Weg
178L	Primär:	1×10^7 pfu von vCP65 auf SC Weg
182L	Primär:	1×10^7 pfu von vCP65 auf IM Weg
179L	Primär:	1×10^6 pfu von vCP65 auf SC Weg
183L	Primär:	1×10^6 pfu von vCP65 auf IM Weg
180L	Primär:	1×10^6 pfu von vCP65 auf SC Weg
184L	Primär:	1×10^5 pfu von vCP65 auf IM Weg
187L	Primär:	1×10^7 pfu von vCP65 oral

a: vCP82 ist eine Kanarienpockenvirus-Rekombinante, die die Masernvirus-Fusions- und Hämagglutinin-Gene exprimiert.

Tabelle 5: Analyse des Ertrags in Vogel- und nicht-Vogelzellen, die mit ALVAC-RG beimpft wurden

Probenzeit			
Zelltyp	t0	t72	t72[b]
Expt 1			
CEF	3,3[a]	7,4	1,7
Vero	3,0	1,4	1,7
MRC-5	3,4	2,0	1,7
Expt 1			
CEF	2,9	7,5	< 1,7
WISH	3,3	2,2	2,0
Detriot-532	2,8	1,7	<1,7

a: Titer, ausgedrückt als $\log_{10}$ pfu pro ml
b: Kultur, die in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid inkubiert wurde

Tabelle 6. Potenz von ALVAC-RG, getestet in Mäusen

Test	Challenge-Dosis[a]	PD_{50}[b]
Anfängliche Aussaat	43	4,56
Primäre Aussaat	23	3,34
Impfstoffcharge H	23	4,52
Impfstoffcharge I	23	3,33
Impfstoffcharge K	15	3,64
Impfstoffcharge L	15	4,03
Impfstoffcharge M	15	3,32
Impfstoffcharge N	15	3,39
Impfstoffcharge J	23	3,42

a: Ausgedrückt als Maus-LD_{50}
b: Ausgedrückt als $\log_{10}$ $TCID_{50}$

Tabelle 7: Wirksamkeit von ALVAC-RG in Hunden und Katzen

	Hunde		Katzen	
Dosis	Antikörper[a]	Überleben[b]	Antikörper	Überleben
6,7	11,9	5/5	2,9	3/5
7,7	10,1	N.T.	8,1	N.T.

a: Antikörper am Tag 29 nach der Beimpfung, ausgedrückt als ein geometrischer Durchschnittstiter in Internationalen Einheiten.
b: Ausgedrückt als ein Verhältnis von überlebenden gegenüber herausgeforderten Tieren

Tabelle 8. Serologische anti-Tollwut-Reaktion von Hörnchenaffen, die mit Kanarienpocken-Rekombinanten beimpft wurden

Affe	Früheres		Tollwutserum-neutralisierender Antikörper[a]					
#	Ausgesetzsein	-196[b]	0	3	7	11	21	28
22	ALVAC[c]	NT[g]	< 1,2	< 1,2	< 1,2	2,1	2,3	2,2
51	ALVAC[c]	NT	< 1,2	< 1,2	1,7	2,2	2,2	2,2
39	vCP37[d]	NT	< 1,2	< 1,2	1,7	2,1	2,2	N.T.[g]
55	vCP37[d]	NT	< 1,2	< 1,2	1,7	2,2	2,1	N.T.
37	ALVAC-RG[e]	2,2	< 1,2	< 1,2	3,2	3,5	3,5	3,2
53	ALVAC-RG[e]	2,2	< 1,2	< 1,2	3,6	3,6	3,6	3,4
38	ALVAC-RG[f]	2,7	< 1,7	< 1,7	3,2	3,8	3,6	N.T.
54	ALVAC-RG[f]	3,2	< 1,7	< 1,5	3,6	4,2	4,0	3,6
57	Keines	NT	< 1,2	< 1,2	1,7	2,7	2,7	2,3

a: Nachgewiesen durch RFFI-Test an den angezeigten Tagen und in Internationalen Einheiten ausgedrückt
b: Tag – 196 repräsentiert Serum vom Tag 28 nach der primären Impfung
c: Tiere erhielten 5,0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC
d: Tiere erhielten 5,0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von vCP37
e: Tiere erhielten 5,0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG
f: Tiere erhielten 7,0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ von ALVAC-RG
g: Nicht getestet.

Tabelle 9: Beimpfen von Rhesus-Makakken mit ALVAC-RG[a]

Tage nach der Beimpfung	Weg der primären Beimpfung										
	or/Tang[b] 176L	185L	SC 177L	SC 186L	SC 178L	IM 182L	SC 179L	IM 183L	SC 180L	IM 184L	OR[b] 187L
-84	-	-		-							
-9	-	-	-	-	-		-				
3	-	-	-	-							
6	-	-	±	±							
11	-	-	16[d]	128							
19	-	-	32	128	-		-				
35	-	-	32	512							
59	-	-	64	256							
75	-	-	64	128	-		-				
99[c]	-	-	64	256	-		-	-	-	-	-
2	-	-	32	256	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	512	512	-	-	-	-	-	-	-
15	16	16	512	512	64	32	64	128	32	-	-
29	16	32	256	256	64	64	32	128	32	-	-
55		32				32		32	16	-	
57	16		128	128	16		16				-

a: Siehe Tabelle 9 für den Plan der Beimpfungen
b: Die Tiere 176L und 185L erhielten 8,0 $\log_{10}$ pfu auf dem oralen Weg in 5 ml Tang. Tier 187L erhielt 7,0 $\log_{10}$ pfu auf oralem Weg, nicht in Tang.
c: Tag der nochmaligen Impfung für die Tiere 176L, 185L, 177L und 186L auf s.c. Weg, und primäre Impfung für die Tiere 178L, 182L, 179L, 183L, 180L, 184L und 187L.
d: Titer, ausgedrückt als Kehrwert der letzten Verdünnung, die Inhibierung der Fluoreszenz in einem RFFI-Test zeigte.

Tabelle 10. Beimpfung von Chimpansen mit ALVAC-RG

Wochen nach der Beimpfung	Tier 431 I.M.	Tier 457 S.C.
0	<8[a]	<8
1	<8	<8
2	8	32
4	16	32
8	16	32
12[b]/0	16	8
13/1	128	128
15/3	256	512
20/8	64	128
26/12	32	128

a: Titer, ausgedrückt als Kehrwert der letzten Verdünnung, die Inhibierung der Fluoreszenz in einem RFFI-Test zeigte
b: Tag der Wiederbeimpfung

Bezugsbeispiel 3 – IMMUNISIERUNG VON MENSCHEN UNTER VERWENDUNG VON KANARIENPOCKEN, DIE EIN TOLLWUT-GLYCOPROTEIN EXPRIMIEREN (ALVAC-RG; vCP65)

[0204] ALVAC-RG (vCP65) wurde wie in Beispiel 9 und Fig. 9A und Fig. 9B beschrieben hergestellt. Zur Korrektur nach oben und Impfstoffherstellung wurde ALVAC-RG (vCP65) in primären CEF gezüchtet, die von spezifisch Pathogen-freien Eiern abstammten. Zellen wurden in einer Vielzahl von 0,01 infiziert und bei 37°C für drei Tage inkubiert.

[0205] Die Impfstoffvirus-Suspension wurde durch Ultraschall-Zerstörung der infizierten Zellen in serumfreiem Medium erhalten; Zelldebris wurde dann durch Zentrifugation und Filtration entfernt. Die resultierende geklärte Suspension wurde mit einem Lyophilisierungsstabilisierer (Gemisch von Aminosäuren) ergänzt, in Einzeldosen-Fläschchen verteilt und gefriergetrocknet. Drei Chargen mit sinkendem Titer wurden durch zehnfach-Serienverdünnungen der Virussuspension in einem Gemisch von serumfreiem Medium und Lyophilisierungsstabilisierer vor der Lyophilisierung hergestellt.

[0206] Qualitätskontroll-Tests wurden auf die Zellsubstrate, das Medium und die Virussaaten und auf das endgültige Produkt mit Betonung auf die Suche nach schädlichen Agenzien und die Beimpfbarkeit in Labornagern angewendet. Es wurden kein unerwünschtes Merkmal gefunden.

Vorklinische Daten.

[0207] Studien in vitro wiesen darauf hin, dass VERO- oder MRC-5-Zellen nicht das Wachstum von ALVAC-RG (vCP65) unterstützten; eine Reihe von acht (VERO) und 10 (MRC) seriellen Blindpassagen verursachte keine nachweisbare Anpassung des Virus auf das Wachstum in diesen nicht-Vogel-Linien. Analysen von menschlichen Zelllinien (MRC-5-, WISH-, Detroit 532-, HEL-. HNK- oder EBV-transformierte lymphoblastoide Zellen), die mit ALVAC-RG (vCP65) infiziert oder beimpft worden sind, zeigten keine Akkumulierung von Virusspezifischer DNA, was nahe legt, dass in diesen Zellen die Blockade der Replikation vor der DNA-Synthese erfolgt. Die Expression des Tollwutvirus-Glycoproteins war jedoch in allen getesteten Zelllinien signifikant, was darauf hinweist, dass der abortive Schritt im Kanarienpocken-Replikationszyklus vor der vitalen DNA-Replikation erfolgt.

[0208] Die Sicherheit und Wirksamkeit von ALVAC-RG (vCP65) wurden in einer Reihe von Experimenten in Tieren dokumentiert. Eine Anzahl von Spezies, einschließlich Kanarien, Hühner, Enten, Gänse, Labornager (Säuglings- und erwachsene Mäuse), Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen und Hunde, Hörnchenaffen, Rhesus-Makakken und Chimpansen wurden mit Dosen im Bereich von 10^5 bis 10^8 pfu beimpft. Eine Vielzahl von Wegen wurde verwendet, am häufigsten subkutan, intramuskulär und intradermal, aber auch oral (Affen und Mäuse) und intrazerebral (Mäuse).

[0209] Bei Kanarien bewirkte ALVAC-RG (vCP65) eine „Aufnahme"-Läsion an der Stelle der Skarifikation, ohne Hinweis auf Krankheit oder Tod. Intradermale Beimpfung von Kaninchen resultierte in einer typischen Pockenvirus-Impfreaktion, die sich nicht ausbreitete und in sieben bis zehn Tagen verheilte. In keinem der Tier-Tests gab es schädlichen Nebenwirkungen auf Grund der Kanarienpocken. Die Immunogenität wurde durch die Entwicklung von anti-Tollwut-Antikörpern nach der Beimpfung mit ALVAC-RG (vCP65) in Nagern, Hunden, Katzen und Primaten dokumentiert, gemessen durch Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Der Schutz wurde auch durch Tollwutvirus-Challenge-Experimente in Mäusen, Hunden und Katzen, die mit ALVAC-RG (vCP65) geimpft worden waren, gezeigt.

Freiwillige.

[0210] Fünfundzwanzig gesunde Erwachsene im Alter von 20–45 ohne vorherige Geschichte einer Tollwutimpfung wurden eingeschrieben. Ihr Gesundheitsstatus wurde durch vollständige medizinische Geschichten, physikalische Untersuchungen, hämatologische und Blutchemie-Analysen bewertet. Ausschlusskriterien schlossen Schwangerschaft, Allergien, Immundepression jeder Art, chronisch schwächende Krankheit, Krebs, Injektion von Immunglobulinen in den letzten drei Monaten und seropositive Reaktion auf menschliches Immunschwächevirus (HIV) oder auf Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen ein.

Untersuchungsaufbau.

[0211] Die Teilnehmer wurden zufällig zugeteilt, um entweder den Standardtollwutimpfstoff, menschlichen diploide Zellen (HDC) mit Chargen-Nr. E0751 (Pasteur Merieux Serums & Vaccine, Lyon, Frankreich) oder den Untersuchungsimpfstoff ALVAC-RG (vCP65) zu erhalten.

[0212] Der Versuch wurde als eine Dosissteigerungs-Untersuchung bezeichnet. Drei Chargen des experimentellen ALVAC-RG (vCP65)-Impfstoffs wurden sequenziell in drei Gruppen von Freiwilligen (Gruppen A, B und C) mit zwei Wochen-Intervallen zwischen jedem Schritt verwendet. Die Konzentration der drei Chargen war $10^{3,5}$, $10^{4,5}$ beziehungsweise $10^{5,5}$ Gewebekultur-infektiöse Dosis ($TCID_{50}$) pro Dosis.

[0213] Jeder Freiwillige erhielt in einem Intervall von vier Wochen zwei Dosen des gleichen Impfstoffs subkutan in der Deltamuskel-Region. Das Wesen des injizierten Impfstoffs war den Teilnehmern zum Zeitpunkt der ersten Injektion nicht bekannt, aber war dem Untersucher bekannt.

[0214] Um das Risiko einer unmittelbaren Hypersensibilisierung zum Zeitpunkt der zweiten Injektion zu minimieren, wurden die Freiwilligen der Gruppe B, denen die mittlere Dosis des experimentellen Impfstoffs zugeteilt wurde, 1 h vorher mit der niedrigen Dosis injiziert und jene, denen die höhere Dosis zugeteilt wurde (Gruppe C), erhielten in stündlichen Intervallen aufeinander folgend die niedrigere und die mittlere Dosis.

[0215] Sechs Monate später wurde den Empfängern der höchsten Dosis des ALVAC-RG (vCP65)- (Gruppe C) und HDC-Impfstoffs eine dritte Dosis des Impfstoffs angeboten; sie wurden dann zufällig verteilt, um entweder den selben Impfstoff wie vorher oder den alternativen Impfstoff zu erhalten. Als ein Ergebnis wurden vier Gruppen gebildet, die dem folgenden Impfschema entsprechen: 1. HDC, HDC – HDC; 2. HDC, HDC – ALVAC-RG (vCP65); 3. ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65) – HDC; 4. ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65) – ALVAC-RG (vCP65).

Überwachung auf Nebenwirkungen.

[0216] Alle Testpersonen wurden für 1 h nach der Injektion überwacht und jeden Tag für die nächsten fünf Tage noch einmal untersucht. Sie wurden gefragt, lokale und systemische Reaktionen für die nächsten drei Wochen aufzuzeichnen, und wurden telefonisch zweimal pro Woche befragt.

Labor-Versuchsleiter.

[0217] Blutproben wurden vor der Registrierung und zwei, vier und sechs Tage nach jeder Injektion erhalten. Die Analyse schloss vollständige Blutzellen-Zählung, Leberenzym- und Kreatinkinase-Tests ein.

Antikörper-Tests.

[0218] Antikörper-Tests wurden sieben Tage vor der ersten Injektion und an den Tagen 7, 28, 35, 56, 173, 187 und 208 der Untersuchung durchgeführt.

[0219] Die Spiegel der neutralisierenden Antikörper gegen Tollwut wurden unter Verwendung des Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) (Smith & Yaeger, in Laboratory Techniques on Rabies) bestimmt. Kanarienpocken-Antikörper wurden durch direkten ELISA gemessen. Das Antigen, eine Suspension von aufgereinigtem Kanarienpockenvirus, das mit 0,1% Triton X100 zerstört wurde, wurde in Microtiterplatten geschichtet. Fixierte Verdünnungen der Seren wurden für zwei Stunden bei Zimmertemperatur reagieren gelassen, und die reagierenden Antikörper wurden mit einem Peroxidase-markierten anti-Mensch-IgG-Ziegenserum erkennbar gemacht. Die Ergebnisse werden als die optische Dichte, gelesen bei 490 nm ausgedrückt.

Analyse.

[0220] Fünfundzwanzig Testpersonen wurden registriert und beendeten die Studie. Es gab 10 Männer und 15 Frauen, und das durchschnittliche Alter war 31,9 (21 bis 48). Alle außer drei Testpersonen hatten einen Beleg für frühere Pockenimpfung; die drei verbleibenden Testpersonen hatten keine typische Narbe und Impfgeschichte. Drei Testpersonen erhielten jede der niedrigeren Dosen des experimentellen Impfstoffs (10^{35} und 10^{45} $TCID_{50}$), neun Testpersonen erhielten $10^{5,5}$ $TCID_{50}$, und zehn erhielten den HDC-Impfstoff.

Sicherheit (Tabelle 11).

[0221] Während der primären Serie der Immunisierung wurde Fieber höher als 37,7°C innerhalb von 24 Stunden nach der Injektion bei einem HDC-Empfänger (37,8°C) und in einem vCP65 $10^{5,5}$ $TCID_{50}$-Empfänger (38°C) bemerkt. Bei keinem Teilnehmer wurde eine andere systemische Reaktion, die der Impfung zuschreibbar ist, beobachtet.

[0222] Lokale Reaktionen wurden in 9/10 Empfängern des HDC-Impfstoffs, der subkutan injiziert wurde, und in 0/3, 1/3 und 9/9 Empfängern von vCP65 $10^{3,5}$, $10^{4,5}$ beziehungsweise $10^{5,5}$ $TCID_{50}$ bemerkt.

[0223] Schmerz war das häufigste Symptom und war immer mild. Andere lokale Symptome schlossen Rötung und Verhärtung ein, die auch mild und vorübergehend waren. Alle Symptome klangen normalerweise innerhalb von 24 Stunden ab und dauerten nie länger als 72 Stunden.

[0224] Es gab keine signifikante Änderung der Blutzellzahlen, Leberenzym- oder Kreatinkinase-Werte

Immunreaktionen; Neutralisierende Antikörper gegen Tollwut (Tabelle 12).

[0225] Achtundzwanzig Tage nach der ersten Injektion hatten alle HDC-Empfänger schützende Titer (≥ 0,5 IE/ml). Im Gegensatz dazu erreichte keiner der ALVAC-RG (vCP65)-Empfänger in den Gruppen A und B ($10^{3,5}$ und $10^{4,5}$ $TCID_{50}$) und nur 2/9 in Gruppe C ($10^{5,5}$ $TCID_{50}$) diesen schützenden Titer.

[0226] Am Tag 56 (d.h. 28 Tage nach der zweiten Injektion) wurden schützende Titer in 0/3 Empfängern von ALVAC-RG (vCP65)-Impfstoff von Gruppe A, 2/3 von Gruppe B und 9/9 von Gruppe C erzielt und blieben in allen 10 HDC-Empfängern bestehen.

[0227] Am Tag 56 waren die geometrischen Durchschnittstiter 0,05, 0,47, 4,4 und 11,5 IE/ml in den Gruppen A, B, C beziehungsweise HDC.

[0228] Am Tag 180 waren die Tollwut-Antikörpertiter in allen Testpersonen wesentlich verringert, blieben aber in 5/10 HDC-Empfängern und in 5/9 ALVAC-RG (vCP65)-Empfängern über dem minimal schützenden Titer von 0,5 IE/ml; die geometrischen Durchschnittstiter waren 0,51 und 0,45 IE/ml in den Gruppen HDC beziehungsweise C.

Antikörper gegen das Kanarienpockenvirus (Tabelle 13).

[0229] Die beobachteten prä-immun-Titer variierten weit mit Titern, die von 0,22 bis 1,23 O.D.-Einheiten reichten, trotz der Abwesenheit von jeglichem vorherigen Kontakt mit Kanarienvögeln in jenen Testpersonen mit den höchsten Titern. Wenn sie als ein mehr als zweifacher Anstieg zwischen vor-Immunisierungs- und Titer nach der zweiten Injektion definiert wird, wurde eine Serokonversion in 1/3 Testpersonen in Gruppe B und in 9/9 Testpersonen in Gruppe C erzielt, wohingegen keine Testperson in den Gruppen A oder HDC serokonvertierte.

Booster-Injektion.

[0230] Der Impfstoff wurde sechs Monate später zum Zeitpunkt der Boosterinjektion ähnlich gut toleriert: Fieber wurde in 2/9 HDC-Booster-Empfängern und in 1/10 ALVAC-RG (vCP65)-Booster-Empfängern bemerkt. Lokale Reaktionen waren in 5/9 Empfängern von HDC-Booster und in 6/10 Empfängern des ALVAC-RG (vCP65)-Boosters vorhanden.

Beobachtungen.

[0231] **Fig.** 13 zeigt Zeichnungen von Tollwut-neutralisierenden Antikörpertitern (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test oder RFFIT, IE/ml): Booster-Wirkung von HDC und vCP65 ($10^{5,5}$ $TCID_{50}$) in Freiwilligen, die vorher mit entweder dem selben oder dem alternativen Impfstoff immunisiert wurden. Die Impfstoffe wurden an den Tagen 0, 28 und 180 verabreicht. Antikörpertiter wurden an den Tagen 0, 7, 28, 35, 56, 173 und 187 und 208 gemessen.

[0232] Wie in **Fig. 13A** bis **Fig. 13D** gezeigt wird, resultierte die verabreichte Boosterdosis in einem weiteren Anstieg der Tollwut-Antikörpertiter bei jeder Versuchsperson, unabhängig vom Immunisierungschema. Der ALVAC-RG (vCP65)-Booster rief jedoch global schwächere Immunreaktionen hervor als der HDC-Booster, und die ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65) – ALVAC-RG (vCP65)-Gruppe hatte signifikant niedrigere Titer als die drei anderen Gruppen. In ähnlicher Weise resultierte die ALVAC-RG (vCP65)-Booster-Injektion in einem Anstieg der Kanarienpocken-Antikörpertiter in 3/5 Testpersonen, die vorher den HDC-Impfstoff erhalten hatten, und in allen fünf Testpersonen, die vorher mit ALVAC-RG (vCP65) geimpft worden sind.

[0233] Im Allgemeinen wies keine der lokalen Nebenwirkungen der Verabreichung von vCP65 auf eine lokale Replikation des Virus hin. Insbesondere fehlten Läsionen der Haut wie jene, die nach Injektion des Impfstoffs beobachtet werden. Trotz der offensichtlichen Abwesenheit einer Replikation des Virus resultierte die Injektion bei den Freiwilligen im Erzeugen von signifikanten Mengen von Antikörpern gegen sowohl den Kanarienpockenvektor als auch das exprimierte Tollwut-Glycoprotein.

[0234] Tollwut-neutralisierende Antikörper wurden mit dem Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) getestet, von dem bekannt ist, dass er gut mit dem Serumneutralisationstest in Mäusen korreliert. Von 9 Empfängern der $10^{5,5}$ $TCID^{50}$ hatten fünf Reaktionen mit niedrigen Spiegeln nach der ersten Dosis. Schützende Titer der Tollwut-Antikörper wurden nach der zweiten Injektion bei allen Empfängern der höchsten getesteten Dosis erzielt und sogar in 2 von den 3 Empfängern der mittleren Dosis. In dieser Untersuchung wurden beide Impfstoffe subkutan verabreicht, wie es gewöhnlich für Lebendimpfstoffe, aber nicht für den inaktivierten HDC-Impfstoff empfohlen wird. Dieser Weg der Injektion wurde ausgewählt, da er am besten eine vorsichtige Untersuchung der Injektionsstelle ermöglichte, aber dies könnte das späte Auftreten von Antikörpern in den HDC-Empfängern erklären: in der Tat hatte keiner der HDC-Empfänger am Tag 7 einen Antikörperanstieg, während es in den meisten Untersuchungen, wo HDC-Impfstoff intramuskulär verabreicht wird, bei einem signifikanten Anteil von Testpersonen der Fall ist (Klietmann et al., Int'l Green Cross – Genf, 1981; Kuwert et al., Int'l Green Cross – Genf, 1981). Diese Erfindung ist jedoch nicht notwendigerweise auf den subkutanen Weg der Verabreichung beschränkt.

[0235] Die GMT (geometrischen Durchschnittstiter) der Tollwut-neutralisierenden Antikörper waren mit dem Versuchsimpfstoff niedriger als mit dem HDC-Kontrollimpfstoff, aber noch immer gut über dem minimalen Titer, der zum Schutz benötigt wird. Die deutliche Reaktion Dosis Wirkung, die mit den drei in dieser Untersuchung verwendeten Dosen erhalten wurde, legt nahe, dass eine höhere Dosis eine stärkere Reaktion induzieren könnte. Aus dieser Offenbarung kann ein Fachmann zweifellos eine geeignete Dosis für einen Patienten auswählen.

[0236] Die Fähigkeit, die Antikörperreaktion zu verstärken, ist ein anderes wichtiges Ergebnis dieses Beispiels; in der Tat wurde eine Erhöhung der Tollwut-Antikörpertiter in jeder Testperson egal bei welchem Impf-

schema nach der 6 Monats-Dosis erzielt, was zeigt, dass vorher existierende Immunität, die entweder durch den Kanarienpockenvektor oder das Tollwut-Glycoprotein hervorgerufen wurde, keine blockierende Wirkung auf den Booster mit dem rekombinanten Impfstoffkandidaten oder dem konventionellen HDC-Tollwutimpfstoff hatte. Dies widerspricht Ergebnissen von anderen mit Vaccinia-Rekombinanten in Menschen, dass die Immunreaktion durch vorher bestehende Immunität blockiert werden kann (Cooney et al., Lancet 1991, 337:567-72; Etlinger et al., Vaccine 9:470-72, 1991).

[0237] Daher zeigt dieses Beispiel deutlich, dass ein nicht-replizierendes Pockenvirus als ein immunisierender Vektor in Menschen mit all den Vorteilen, die replizierende Agenzien auf die Immunreaktion übertragen, dienen kann, aber ohne das Sicherheitsproblem, das durch ein vollständig permissives Virus erzeugt wird.

TABELLE 11: Reaktionen in den 5 Tagen nach der Impfung

vCP65-Dosis ($TCID_{50}$)	$10^{3,5}$		$10^{4,5}$		$10^{5,5}$		HDC-Kontrolle	
Injektion	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Anzahl Geimpfte	3	3	3	3	9	9	10	10
Temp. > 37,7°C	0	0	0	0	0	1	1	0
Schmerzhaftigkeit	0	0	1	1	6	8	8	6
Rötung	0	0	0	0	0	4	5	4
Verhärtung	0	0	0	0	0	4	5	4

TABELLE 12: Tollwut-neutralisierende Antikörper (REFIT; IE/ml) individuelle Titer und geometrische Durchschnittstiter (GMT)

		Tage				
Nr.	TCID50/Dosis	0	7	28	35	56
1	$10^{3,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,2
3	$10^{3,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
4	$10^{3,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
	G.M.T	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
6	$10^{4,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
7	$10^{4,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	2,4	1,9
10	$10^{4,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,6	1,1
	G.M.T.	< 0,1	< 0,1	0,1	0,58	0,47
11	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	1,0	3,2	4,3
13	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	0,3	6,0	8,8
14	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	0,2	2,1	9,4
17	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,2	2,5
18	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	0,7	8,3	12,5
20	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3	3,7
21	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	0,2	2,6	3,9
23	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,7	4,2
25	$10^{5,5}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,6	0,9
	G.M.T.	< 0,1	< 0,1	0,16	1,9	4,4*
2	HDC	< 0,1	< 0,1	0,8	7,1	7,2
5	HDC	< 0,1	< 0,1	9,9	12,8	18,7
8	HDC	< 0,1	< 0,1	12,7	21,1	16,5
9	HDC	< 0,1	< 0,1	6,0	9,9	14,3
12	HDC	< 0,1	< 0,1	5,0	9,2	25,3
15	HDC	< 0,1	< 0,1	2,2	5,2	8,6
16	HDC	< 0,1	< 0,1	2,7	7,7	20,7
19	HDC	< 0,1	< 0,1	2,6	9,9	9,1
22	HDC	< 0,1	< 0,1	1,4	8,6	6,6
24	HDC	< 0,1	< 0,1	0,8	5,8	4,7
	G.M.T.	< 0,1	< 0,1	2,96	9,0	11,5*

* p = 0,007 Student t-Test

TABELLE 13: Kanarienpocken-Antikörper: ELISA geometrische Durchschnittstiter*

Tage					
vCP65-Dosierung TCID50/Dosis	0	7	28	35	56
$10^{3,5}$	0,69	ND	0,76	ND	0,68
$10^{4,5}$	0,49	0,45	0,56	0,63	0,87
$10^{5,5}$	0,38	0,38	0,77	1,42	1,63
HDC-Kontrolle	0,45	0,39	0,40	0,35	0,39

* optische Dichte bei 1/25-Verdünnung

Bezugsbeispiel 4 – VERGLEICH DER LD_{50} VON ALVAC UND NYVAC MIT VERSCHIEDENEN VACCINIAVIRUS-STÄMMEN

Mäuse.

[0238] Männliche ausgezüchtete Swiss Webster-Mäuse wurden von Taconic Farms (Germantown, NY) gekauft und mit Mausfutter und Wasser ad libitum bis zur Verwendung im Alter von 3 Wochen („normale" Mäuse) gehalten. Neugeborene ausgezüchtete Swiss Webster-Mäuse von beiden Geschlechtern wurden nach zeitlich festgelegter Trächtigkeit erhalten, durchgeführt von Taconic Farms. Alle verwendeten neugeborenen Mäuse wurden innerhalb eines Zeitraums von zwei Tagen geboren.

Viren.

[0239] ALVAC wurde durch Plaqueaufreinigung von einer Kanarienpockenvirus-Population abgeleitet und wurde in primären Hühnerembryofibroblastenzellen (CEF) hergestellt. Nach der Aufreinigung durch Zentrifugation über Saccharose-Dichtegradienten wurde ALVAC für Plaque-bildende Einheiten in CEF-Zellen ausgezählt. Die WR (L)-Variante des Vacciniavirus wurde durch Selektion von großen Plaque-Phänotypen von WR abgeleitet (Panicali et al., 1981). Der Wyeth New York State-Board of Health-Impfstoffstamm des Vacciniavirus wurde vom Pharmaceuticals Calf Lymph Typ-Impfstoff Dryvax mit der Kontrollnummer 302001B erhalten. Das Copenhagen-Stamm-Vacciniavirus VC-2 wurde vom Institut Merieux, Frankreich, erhalten. Vacciniavirus Stamm-NYVAC wurden von Copenhagen VC-2 abgeleitet. Alle Vacciniavirus-Stämme außer dem Wyeth-Stamm wurden in afrikanischen Grünaffen-Nieren-Vero-Zellen kultiviert, aufgereinigt durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und auf Plaquebildende Einheiten auf Vero-Zellen durchgezählt. Der Wyeth-Stamm wurde in CEF-Zellen gezüchtet und in CEF-Zellen ausgezählt.

Beimpfungen.

[0240] Gruppen von 10 normalen Mäusen wurden intrakranial (ic) mit 0,05 ml einer von einigen Verdünnungen des Virus, die durch 10-fach serielle Verdünnung der Bestandspräparate in steriler phosphatgepufferter Salzlösung hergestellt wurde, beimpft. In manchen Fällen wurde die unverdünnte Bestandsvirus-Präparation zur Beimpfung verwendet.

[0241] Gruppen von 10 neugeborenen Mäusen, 1 bis 2 Tage alt, wurden ic in ähnlicher Weise wie die normalen Mäuse beimpft, mit der Ausnahme, dass ein Injektionsvolumen von 0,03 ml verwendet wurde.

[0242] Alle Mäuse wurden täglich auf Sterblichkeit über einen Zeitraum von 14 Tagen (neugeborene Mäuse) oder 21 Tagen (normale Mäuse) nach der Beimpfung überwacht. Die Mäuse, die am Morgen nach der Beimpfung tot vorgefunden wurden, wurden auf Grund von potenziellem Tod durch ein Trauma ausgeschlossen.

[0243] Die letale Dosis, die benötigt wurde, um eine Sterblichkeit von 50% der Versuchspopulation zu produzieren (LD_{50}), wurde durch das proportionale Verfahren von Reed und Muench bestimmt.

Vergleich der LD_{50} von ALVAC und NYVAC mit verschiedenen Vacciniavirus-Stämmen für normale, junge ausgezüchtete Mäuse auf dem ic-Weg.

[0244] In jungen, normalen Mäusen war die Virulenz von NYVAC und ALVAC einige Größenordnungen niedriger als von den anderen getesteten Vacciniavirus-Stämmen (Tabelle 14). Es wurde gefunden, dass NYVAC und ALVAC in normalen Mäusen über 3 000mal weniger virulent sind als der Wyeth-Stamm; über 12 500mal weniger virulent als der parentale VC-2-Stamm; und über 63 000 000mal weniger virulent als die WR (L)-Variante. Diese Ergebnisse würden nahe lagen, dass NYVAC im Vergleich zu anderen Vaccinia-Stämmen hochgradig abgeschwächt ist und dass ALVAC im Allgemeinen für junge Mäuse nicht virulent ist, wenn es intrakranial verabreicht wird, obwohl beide Sterblichkeit in Mäusen bei extrem hohen Dosen ($3{,}85 \times 10^8$ PFUs, ALVAC und 3×10^8 PFUs, NYVAC) durch einen unbestimmten Mechanismus durch diesen Weg der Beimpfung bewirken können.

Vergleich der LD_{50} von ALVAC und NYVAC mit verschiedenen Vacciniavirus-Stämmen für neugeborene ausgezüchtete Mäuse auf dem ic-Weg.

[0245] Die relative Virulenz von 5 Pockenvirus-Stämmen für normale, neugeborene Mäuse wurde durch Titration in einem intrakranialen (ic) Challenge-Modellsystem getestet (Tabelle 15). Mit der Sterblichkeit als Endpunkt wiesen LD_{50}-Werte darauf hin, dass ALVAC über 100 000mal weniger virulent ist als der Wyeth-Impfstoffstamm des Vacciniavirus; über 200 000mal weniger virulent als der Copenhagen-VC-2-Stamm des Vacciniavirus; und über 25 000 000mal weniger virulent als die WR-L-Variante des Vacciniavirus. Nichts desto trotz resultierte es bei der höchsten getesteten Dosis von $6{,}3 \times 10^7$ PFUs in 100% Sterblichkeit. Sterblichkeitsraten von 33,3% wurden bei $6{,}3 \times 10^6$ PFUs beobachtet. Die Ursache des Tods, obwohl sie nicht tatsächlich bestimmt wurde, war wahrscheinlich nicht von toxikologischer oder traumatischer Natur, da die durchschnittliche Überlebenszeit (MST) von Mäusen der Gruppe mit der höchsten Dosierung (ungefähr 6,3 LD_{50}) $6{,}7 \pm 1{,}5$ Tage war. Im Vergleich zu WR (L) bei einer Challenge-Dosis von 5 LD_{50}, wo die MST $4{,}8 \pm 0{,}6$ Tage ist, war die MST von ALVAC-herausgeforderten Mäusen signifikant länger ($P = 0{,}001$).

[0246] Es wurde gefunden, dass Wyeth im Vergleich zu NYVAC über 15 000mal virulenter ist; VC-2 mehr als 35 000mal virulenter; und WR(L) über 3 000 000mal virulenter. Ähnlich zu ALVAC verursachten die zwei höchsten Dosen von NYVAC, 6×10^8 und 6×10^7 PFUs, 100% Sterblichkeit. Die MST von Mäusen, die mit der höchsten Dosis, entsprechend 380 LD_{50}, herausgefordert wurden, war jedoch nur 2 Tage (9 Todesfälle am Tag 2 und einer am Tag 4). Im Gegensatz dazu überlebten alle Mäuse, die mit der höchsten Dosis von WR-L, entsprechend 500 LD_{50}, herausgefordert wurden, bis zum Tag 4.

Tabelle 14. Berechnete letale 50%-Dosis für Mäuse durch verschiedene Vacciniavirus-Stämme und für Kanarienpockenvirus (ALVAC) auf dem ic Weg.

POCKENVIRUSSTAMM	BERECHNETE LD_{50} (PFUs)
WR (L)	2,5
VC-2	$1{,}26 \times 10^4$
WYETH	$5{,}00 \times 10^4$
NYVAC	$1{,}58 \times 10^8$
ALVAC	$1{,}58 \times 10^8$

Tabelle 15. Berechnete letale 50%-Dosis für neugeborene Mäuse durch verschiedene Vacciniavirus-Stämme und für Kanarienpockenvirus (ALVAC) auf dem ic Weg.

POCKENVIRUSSTAMM	BERECHNETE LD_{50} (PFUs)
WR (L)	0,4
VC-2	0,1
WYETH	1,6
NYVAC	$1{,}58 \times 10^6$
ALVAC	$1{,}00 \times 10^7$

Bezugsbeispiel 5 – BEWERTUNG VON NYVAC (vP866) UND NYVAC-RG (vP879)

Immunpräzipitation.

[0247] Vorgeformte Monolayer von Vogel- oder nicht-Vogel-Zellen wurden mit 10 pfu pro Zelle von parentalen NYVAC- (vP866) oder NYVAC-RG- (vP879) Virus beimpft. Die Beimpfung wurde in EMEM, das frei war von Methionin und mit 2% dialysiertem fötalem Rinderserum ergänzt worden war, durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Inoculum entfernt und das Medium mit EMEM (Methionin-frei), das 20 µCi/ml ^{35}S-Methionin enthielt, ersetzt. Nach einer Inkubation über Nacht von ungefähr 16 Stunden wurden die Zellen durch die Zugabe von Puffer A (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Natriumazid, 500 Einheiten pro ml Aprotonin und 0,02% Phenylmethylsulfonylfluorid) lysiert. Immunpräzipitation wurde unter Verwendung eines Tollwut-Glycoprotein-spezifischen monoclonalen Antikörpers, der als 24-3F10 bezeichnet wird, bereitgestellt von Dr. C. Trinarchi, Griffith Laboratories, New York State Department of Health, Albany, New York, und eines Ratten-anti-Maus-Konjugats, das von Boehringer Mannheim Corporation (Kat. #604-500) erhalten wurde, durchgeführt. Protein A-Sepharose CL-48, erhalten von Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, New Jersey, wurde als eine Unterlagenmatrix verwendet. Immunpräzipitate wurden auf 10% Polyacrylamidgelen gemäß dem Verfahren von Dreyfuss et al. (1984) fraktioniert. Die Gele wurden fixiert, für Fluorographie mit 1M Na-Salicylat für eine Stunde behandelt und einem Kodak XAR-2-Film ausgesetzt, um die immunpräzipitierte Protein-Spezies sichtbar zu machen.

Quelle der Tiere.

[0248] Weiße Neuseeland-Kaninchen wurden von Hare-Marland (Hewitt, New Jersey) erhalten. Drei Wochen alte männliche ausgezüchtete Swiss Webster-Mäuse, zeitlich festgelegte trächtige weibliche ausgezüchtete Swiss Webster-Mäuse und vier Wochen alte Swiss Webster-Nacktmäuse (nu^+nu^+) wurden von Taconic Farms, Inc. (Germantown, New York) erhalten. Alle Tiere wurden entsprechend den NIH-Richtlinien gehalten. Alle Tierprotokolle wurden durch das institutionelle IACUC genehmigt. Wenn es für nötig erachtet wurde, wurden Mäuse, die offensichtlich unheilbar krank waren, euthanasiert.

Bewertung der Läsionen bei Kaninchen.

[0249] Jedes von zwei Kaninchen wurde intradermal an mehreren Stellen mit 0,1 ml PBS, enthaltend 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 oder 10^8 pfu von jedem Testvirus oder mit PBS allein beimpft. Die Kaninchen wurden täglich vom Tag 4 bis zur Auflösung der Läsionen beobachtet. Verhärtungen und Geschwüre wurden gemessen und aufgezeichnet.

Virusgewinnung aus den beimpften Stellen.

[0250] Ein einzelnes Kaninchen wurde intradermal an mehreren Stellen mit 0/1 ml PBS, enthaltend 10^6, 10^7 oder 10^8 pfu von jedem Testvirus oder mit PBS allein beimpft. Nach 11 Tagen wurde das Kaninchen euthanasiert, und Hautbiopsie-Proben, die von jeder der Beimpfungsstellen genommen wurden, wurden aseptisch durch mechanischen Aufschluss und indirekte Ultraschallbehandlung für die Virusgewinnung präpariert. Infektiöses Virus wurde durch Plaquetitration auf CEF-Monolayern getestet.

Virulenz in Mäusen.

[0251] Gruppen von zehn Mäusen oder fünf Mäusen im Nacktmäuse-Versuch wurden ip mit einer von einigen Verdünnungen des Virus in 0,5 ml sterilem PBS beimpft. Es wird auch auf Beispiel 11 Bezug genommen.

Cyclophosphamid (CY)-Behandlung.

[0252] Mäuse wurden auf ip Weg mit 4 mg (0,02 ml) CY (SIGMA) am Tag – 2 injiziert, gefolgt von Virusinjektion am Tag 0. An den folgenden Tagen nach der Infektion wurden die Mäuse ip mit CY injiziert: 4 mg am Tag 1; 2 mg an den Tagen 4, 7 und 11; 3 mg an den Tagen 14, 18, 21, 25 und 28. Immunsuppression wurde indirekt durch Zählen der weißen Blutzellen mit einem Coulter-Zähler am Tag 11 überwacht. Die durchschnittliche Anzahl der weißen Blutzellen war 13 500 Zellen pro µl für unbehandelte Mäuse (n = 4) und 4 220 Zellen pro µl für CY-behandelte Kontrollmäuse (n = 5).

Berechnung der LD_{50}.

[0253] Die letale Dosis, die nötig war, um 50% Sterblichkeit zu produzieren (LD_{50}), wurde durch das proportionale Verfahren von Reed und Muench (Reed und Muench, 1938) bestimmt.

Potenz-Testen von NYVAC-RG in Mäusen.

[0254] Vier bis sechs Wochen alte Mäuse wurden in die Fußsohle mit 50 bis 100 µl einer Auswahl von Verdünnungen (2,0–8,0 $\log_{10}$ Gewebekultur infektiöser Dosis 50% ($TCID_{50}$)) von entweder VV-RG (Kieny et al., 1984), ALVAC-RG (Taylor et al., 1991b) oder dem NYVAC-RG beimpft. Jede Gruppe bestand aus acht Mäusen. Vierzehn Tage nach der Impfung wurden die Mäuse durch intrakraniale Beimpfung mit 15 LD_{50} des Tollwutvirus-CVS-Stamms (0,03 ml) gechallenged. Am Tag 28 wurden die überlebenden Mäuse gezählt und die schützende Dosis 50% (PD_{50}) berechnet.

Ableitung von NYVAC (vP866).

[0255] Der NYVAC-Stamm des Vacciniavirus wurde aus VC-2 hergestellt, einem Plaque-geclonten Isolat des COPENHAGEN-Impfstoffstamms. Um NYVAC aus VC-2 herzustellen, wurden achtzehn Vaccinia-ORFs einschließlich einer Zahl von viralen Funktionen, die mit Virulenz assoziiert werden, in einer Reihe von sequenziellen Manipulationen wie vorher in dieser Offenbarung beschrieben präzise deletiert. Diese Deletionen wurden in einer Weise konstruiert, dass das Auftreten von neuen unerwünschten offenen Leserahmen verhindert wird. Fig. 10 stellt schematisch die ORFs dar, die deletiert wurden, um NYVAC herzustellen. In Fig. 10 oben ist die HindIII-Restriktionskarte des Vacciniavirusgenoms (VC-2-Plaqueisolat, COPENHAGEN-Stamm) dargestellt. Vergrößert sind die sechs Regionen von VC-2, die sequenziell bei der Herstellung von NYVAC deletiert wurden. Die Deletionen wurden vorher in dieser Offenbarung beschrieben (Beispiele 1 bis 6). Unter einer solchen Deletionsstelle sind die ORFs aufgelistet, die aus dieser Stelle deletiert wurden, zusammen mit den Funktionen oder Homologien und dem Molekulargewicht von ihren Genprodukten.

Replikationsstudien von NYVAC und ALVAC auf menschlichen Gewebezelllinien.

[0256] Um den Pegel der Replikation des NYVAC-Stamms des Vacciniavirus (vP866) in Zellen von menschlichem Ursprung zu bestimmen, wurden sechs Zelllinien mit einer Eingabe-Vielzahl von 0,1 pfu pro Zelle unter Flüssigkultur beimpft und für 72 Stunden inkubiert. Der parentale COPENHAGEN-Clon (VC-2) wurde parallel dazu beimpft. Primäre Hühnerembryofibroblasten (CEF)-Zellen (erhalten von 10–11 Tage-alten embryonierten Eiern von SPF-Ursprung, Spafas, Inc., Storrs, CT) wurden eingeschlossen, um ein permissives Zellsubstrat für alle Viren darzustellen. Kulturen wurden auf der Basis von zwei Kriterien analysiert: das Vorkommen von produktiver viraler Replikation und die Expression eines extrinsischen Antigens.

[0257] Das Replikationspotenzial von NYVAC in einer Reihe von Zellen, die von Menschen abstammen, sind in Tabelle 16 gezeigt. Sowohl VC-2 als auch NYVAC sind zu produktiver Replikation in CEF-Zellen in der Lage, obwohl NYVAC mit geringfügig reduzierten Erträgen. VC-2 ist auch zu produktiver Replikation in den sechs getesteten vom Menschen abstammenden Zelllinien mit vergleichbaren Erträgen in der Lage, außer in der EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinie JT-1 (menschliche lymphoblastoide Zelllinie, die mit Epstein-Barr-Virus transformiert worden ist, siehe Rickinson et al., 1984). Im Gegensatz dazu ist NYVAC hochgradig abgeschwächt in seiner Fähigkeit, sich in jeder der getesteten von Menschen abstammenden Zelllinien produktiv zu replizieren. Kleine Steigerungen des infektiösen Virus über die Restvirus-Spiegel wurden von NYVAC-infizierten MRC-5-(ATCC #CCL171, menschlicher embryonischer Lungen-Ursprung), DETROIT 532-(ATCC #CCL54, menschliche Vorhaut, Down-Syndrom), HEL 299- (ATCC #CCL137, menschliche embryonale Lungenzellen) und HNK- (menschliche neonatale Nierenzellen, Whittiker Bioprodukts, Inc. Walkersville, MD, Kat. #70-151) Zellen erhalten. Replikation auf diesen Zelllinien war signifikant reduziert im Vergleich zu den Viruserträgen, die von NYVAC-infizierten CEF-Zellen oder mit den parentalen VC-2 erhalten wurden (Tabelle 16). Es sollte bemerkt werden, dass die Erträge nach 24 Stunden in CEF-Zellen sowohl für NYVAC als auch VC-2 äquivalent zu dem 72-Stunden-Ertrag sind. Das Inkubieren der menschlichen Zelllinien-Kulturen für zusätzliche 48 Stunden (zwei weitere virale Wachstumszyklen) kann daher den erhaltenen relativen Virusertrag amplifiziert haben.

[0258] In Übereinstimmung mit den niedrigen Spiegeln der erhaltenen Viruserträge in den vom Menschen abstammenden Zelllinien MRC-5 und DETROIT 532 wurden nachweisbare aber reduzierte Spiegel von NYVAC-spezifischer DNA-Akkumulierung bemerkt. Der Spiegel der DNA-Akkumulierung in den MRC-5- und DETROIT 532-NYVAC-infizierten Zelllinien im Vergleich zu jenem, der in NYVAC-infizierten CEF-Zellen beobach-

tet wurde, lief parallel zu den relativen Viruserträgen. NYVAC-spezifische virale DNA-Akkumulierung wurde in keinen der anderen vom Menschen abstammenden Zellen beobachtet.

[0259] Ein äquivalentes Experiment wurde auch unter Verwendung des Avipoxvirus ALVAC durchgeführt. Die Ergebnisse der Virusreplikation sind auch in Tabelle 16 gezeigt. In keiner der menschlichen Zelllinien wurde ein Abkömmlingsvirus nachgewiesen, was konsistent mit der Wirtsbereich-Einschränkung des Kanarienpockenvirus auf Vogelspezies ist. Auch konsistent mit einem Fehlen der produktiven Replikation von ALVAC in diesen vom Menschen abstammenden Zellen ist die Beobachtung, dass in keiner der vom Menschen abstammenden Zelllinien ALVAC-spezifische DNA-Akkumulierung nachweisbar war.

Expression von Tollwut-Glycoprotein durch NYVAC-RG (vP879) in menschlichen Zellen.

[0260] Um nachzuweisen, ob wirksame Expression eines fremden Gens in der Abwesenheit von signifikanten Spiegeln von produktiver viraler Replikation erzielt werden könnte, wurden die selben Zelllinien mit der NYVAC-Rekombinante beimpft, die das Tollwutvirus-Glycoprotein (vP879, Beispiel 7) in der Anwesenheit von ^{35}S-Methionin exprimiert. Immunpräzipitation des Tollwut-Glycoproteins wurde vom radioaktiv-markierten Kulturlysat unter Verwendung eines monoclonalen Antikörpers durchgeführt, der spezifisch für das Tollwut-Glycoprotein ist. Immunpräzipitation eines 67kDa-Proteins wurde übereinstimmend mit einer vollständig glycosylierten Form des Tollwut-Glycoproteins nachgewiesen. Kein serologisches kreuzreaktives Produkt wurde in nicht-infizierten oder NYVAC-infizierten parentalen Zelllysaten nachgewiesen. Äquivalente Ergebnisse wurde mit allen anderen analysierten menschlichen Zellen erhalten.

Beimpfungen auf der Kaninchenhaut.

[0261] Die Induktion und die Art von Hautläsionen auf Kaninchen nach der intradermalen (id) Beimpfungen ist früher als ein Maß der Pathogenität des Vacciniavirus-Stamms verwendet worden (Buller et al., 1988; Child et al., 1990; Fenner, 1958; Flexner et al., 1987; Ghendon und Chernos, 1964). Daher wurde die Art der Läsionen, die mit id-Beimpfungen mit den Vaccinia-Stämmen WR (ATCC #VR119, plaqueaufgereinigt auf CV-1-Zellen, ATCC #CCL70, und ein Plaque-Isolat, das als L-Variante bezeichnet wird, ATCC #VR2035, ausgewählt wie in Panicali et al., 1981 beschrieben), WYETH (ATCC #VR325, vermarktet als DRYVAC durch Wyeth Laboratories, Marietta, PA), COPENHAGEN (VC-2) und NYVAC assoziiert sind, durch Beimpfen von zwei Kaninchen (A069 und A128) beurteilt. Die zwei Kaninchen zeigten unterschiedliche Gesamtempfindlichkeit auf die Viren, wobei Kaninchen A128 weniger schwere Reaktionen als Kaninchen A069 zeigte. Beim Kaninchen A128 waren die Läsionen relativ klein und verschwanden 27 Tage nach der Beimpfung. Beim Kaninchen A069 waren die Läsionen intensiv, besonders für die WR-Beimpfungsstellen, und verschwanden erst nach 49 Tagen. Die Intensität der Läsionen war auch abhängig von der Lokalisation der Beimpfungsstellen im Vergleich zum Lymphabfluß-Netzwerk. Insbesondere zeigten alle Stellen, die über dem Rückgrat lokalisiert waren, intensivere Läsionen und benötigten längere Zeiten, um die Läsionen, die auf den Flanken lokalisiert waren, aufzulösen. Alle Läsionen wurden täglich vom Tag 4 bis zum Verschwinden der letzten Läsion gemessen, und die Mittelwerte der maximalen Läsionsgröße und der Tage bis zur Auflösung wurden berechnet (Tabelle 17). Keine lokalen Reaktionen wurden von den Stellen, die mit dem Kontroll-PBS injiziert wurden, beobachtet. Ulcerative Läsionen wurden an den Stellen beobachtet, die mit WR-, VC-2- und WYETH-Vacciniavirus-Stämmen injiziert worden sind. Signifikanter Weise wurden keine Verhärtung oder ulcerative Läsionen an der Stellen der Beimpfung mit NYVAC beobachtet.

Persistenz des infektiösen Virus an der Stelle der Beimpfung.

[0262] Um die relative Persistenz dieser Viren an der Stelle der Beimpfung zu beurteilen, wurde ein Kaninchen intradermal an mehreren Stellen mit 0,1 ml PBS, enthaltend 10^6, 10^7 oder 10^8 pfu von VC-2, WR, WYETH oder NYVAC beimpft. Für jedes Virus wurde die 10^7 pfu-Dosis über dem Rückgrat lokalisiert, flankiert von den 10^6 und 10^8 Dosen. Die Stellen der Beimpfung wurden täglich für 11 Tage beobachtet. WR rief die intensivste Reaktion hervor, gefolgt von VC-2 und WYETH (Tabelle 18). Ulceration wurde zuerst am Tag 9 für WR und WYETH und Tag 10 für VC-2 beobachtet. Die Stellen, die mit NYVAC oder Kontroll-PBS beimpft wurden, zeigten keine Verhärtung oder Ulceration. Am Tag 11 nach der Beimpfung wurden Hautproben von den Stellen der Beimpfung ausgeschnitten, mechanisch zerstört, und das Virus wurde auf CEF-Zellen titriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 gezeigt. Zu diesen Zeitpunkt wurde in keinem Fall mehr Virus gewonnen als verabreicht wurde. Die Gewinnung des Vaccinia-Stamms WR war ungefähr 10^6 pfu von Virus an jeder Stelle, unabhängig von der Menge des verabreichten Virus. Gewinnung der Vaccinia-Stämme WYETH und VC-2 war 10^3 bis 10^4 pfu, unabhängig von der verabreichten Menge. Von den Stellen, die mit NYVAC beimpft wurden, wurde kein infektiöses Virus gewonnen.

Beimpfung von genetisch oder chemisch immun-defizienten Mäusen.

[0263] Intraperitoneale Beimpfung mit hohen Dosen von NYVAC (5×10^8 pfu) oder ALVAC (10^9 pfu) in Nacktmäuse verursachte keine Todesfälle, keine Läsionen und keine offensichtliche Erkrankung innerhalb des 100 Tage-Beobachtungszeitraums. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit WR (10^3 bis 10^4 pfu), WYETH (5×10^7 oder 5×10^8 pfu) oder VC-2 (10^4 bis 10^9 pfu) beimpft wurden, disseminierte Läsionen, die typisch für Pockenviren sind, zuerst an den Zehen, dann am Schwanz, gefolgt von schwerer Orchitis in manchen Tieren. In Mäusen, die mit WR oder WYETH infiziert wurden, führte das Auftreten von disseminierten Läsionen im allgemeinen letztendlich zum Tod, wohingegen die meisten Mäuse, die mit VC-2 infiziert wurden, sich letztendlich erholten. Die berechneten LD_{50}-Werte sind in Tabelle 19 angegeben.

[0264] Insbesondere Mäuse, die mit VC-2 beimpft wurden, begannen Läsionen an ihren Zehen (rote Knötchen) und 1 bis 2 Tage später am Schwanz zu zeigen. Diese Läsionen traten zwischen 11 und 13 Tagen nach der Beimpfung (pi) in Mäusen auf, denen die höchsten Dosen (10^9, 10^8, 10^7 und 10^6 pfu) gegeben wurden, am Tag 16 pi in Mäusen, denen 10^5 pfu gegeben wurde, und am Tag 21 pi in Mäusen, denen 10^4 pfu gegeben wurde. Es wurden keine Läsionen während des 100 Tage-Beobachtungszeitraums in Mäusen beobachtet, die mit 10^3 und 10^2 pfu beimpft wurden. Orchitis wurde am Tag 23 pi in Mäusen bemerkt, denen 10^9 und 10^8 pfu gegeben wurde, und ungefähr 7 Tage später in den anderen Gruppen (10^7 bis 10^4 pfu). Orchitis war besonders stark in den 10^9 und 10^8 pfu-Gruppen und wurde, obwohl in Rückbildung, bis zum Ende des 100 Tage-Beobachtungszeitraums beobachtet. Einige Pocken-ähnliche Läsionen wurden auf der Haut von ein paar Mäusen bemerkt, die etwa 30–35 Tage pi auftraten. Die meisten Pockenläsionen heilten normalerweise zwischen 60–90 Tage pi. Nur eine Maus starb in der Gruppe, die mit 10^9 pfu beimpft wurde (Tag 34 pi), und eine Maus starb in der Gruppe, die mit 10^8 pfu beimpft wurde (Tag 94 pi). Keine anderen Todesfälle wurden in den VC-2-beimpften Mäusen beobachtet.

[0265] Mäuse, die mit 10^4 pfu des WR-Stamms von Vaccinia beimpft wurden, starteten am Tag 17 pi, Pockenläsionen zu zeigen. Diese Läsionen erschienen identisch zu den Läsionen, die von den VC-2-injizierten Mäusen gezeigt wurden (geschwollene Zehen, Schwanz). Mäuse, die mit 10^3 pfu des WR-Stamms beimpft wurden, entwickelten bis 34 Tage pi keine Läsionen. Orchitis wurde nur in den Mäusen bemerkt, die mit der höchsten Dosis von WR (10^4 pfu) beimpft wurden. Während der späteren Stadien des Beobachtungszeitraums erschienen Läsionen rund um das Maul, und die Mäuse hörten auf zu fressen. Alle Mäuse, die mit 10^4 pfu WR beimpft wurden, starben oder wurden euthanasiert, wenn es zwischen 21 Tagen und 31 Tagen pi als notwendig erachtet wurde. Vier von den 5 Mäusen, die mit 10^3 pfu WR injiziert wurden, starben oder wurden euthanasiert, wenn es zwischen 35 Tagen und 57 Tagen pi als notwendig erachtet wurde. Keine Todesfälle wurden bei Mäusen beobachtet, die mit niedrigeren Dosen von WR beimpft wurden (1 bis 100 pfu).

[0266] Mäuse, die mit dem WYETH-Stamm des Vacciniavirus mit den höheren Dosen (5×10^7 und 5×10^8 pfu) beimpft wurden, zeigten Läsionen an Zehen und Schwänzen, entwickelten Orchitis und starben. Mäuse, die mit 5×10^6 pfu oder weniger von WYETH injiziert wurden, zeigten keine Anzeichen von Erkrankung oder Läsionen.

[0267] Wie in Tabelle 19 gezeigt, lieferten CY-behandelte Mäuse ein empfindlicheres Modell zum Testen der Pockenvirus-Virulenz als es Nacktmäuse taten. LD_{50}-Werte für die WR-, WYETH- und VC-2-Vacciniavirus-Stämme waren in diesem Modellsystem signifikant niedriger als im Nacktmäuse-Modell. Zusätzlich entwickelten sich Läsionen in Mäusen, die mit WYETH-, WR- und VC-2-Vacciniaviren wie unten angemerkt mit höheren Dosen von jedem Virus injiziert wurden, was in schnellerer Bildung von Läsionen resultierte. Wie es mit Nacktmäusen gesehen wurde, entwickelten CY-behandelte Mäuse, die mit NYVAC oder ALVAC injiziert wurden, keine Läsionen. Im Gegensatz zu Nacktmäusen wurden jedoch bei CY-behandelten Mäusen, die mit NYVAC oder ALVAC herausgefordert wurden, unabhängig von der Dosis einige Todesfälle beobachtet. Diese zufälligen Fälle sind verdächtig in Bezug auf die Ursache des Todes.

[0268] Mäuse, die mit allen Dosen von WYETH ($9{,}5 \times 10^4$ bis $9{,}5 \times 10^8$ pfu) injiziert wurden, zeigten zwischen 7 und 15 Tagen pi Pockenläsionen auf ihrem Schwanz und/oder auf ihren Zehen. Zusätzlich waren die Schwänze und Zehen geschwollen. Entwicklung der Läsionen am Schwanz war typisch für Pockenläsionen mit der Bildung eines Knötchens, Ulcerierung und schließlich Bildung eines Schorfs. Mäuse, die mit allen Dosen von VC-2 ($1{,}65 \times 10^5$ bis $1{,}65 \times 10^9$) beimpft wurden, entwickelten auch Pockenläsionen auf ihren Schwänzen und/oder ihren Zehen analog zu jenen der WYETH-injizierten Mäuse. Diese Läsionen wurden zwischen 7-12 Tage nach der Beimpfung beobachtet. Keine Läsionen wurden auf Mäusen beobachtet, die mit niedrigeren Dosen des WR-Virus injiziert wurden, obwohl in dieser Gruppe Todesfälle auftraten.

Wirksamkeitstest von NYVAC-RG.

[0269] Um nachzuweisen, dass die Abschwächung des COPENHAGEN-Stamms des Vacciniavirus ohne signifikante Änderung der Fähigkeit des resultierenden NYVAC-Stamms, ein nützlicher Vektor zu sein, bewirkt worden war, wurden vergleichende Wirksamkeitstests durchgeführt. Um das immunogene Potenzial des Vektors während der sequenziellen genetischen Manipulationen, die durchgeführt werden, um das Virus abzuschwächen, zu überwachen, wurde ein Tollwutvirus-Glycoprotein als ein extrinsiches Reporterantigen verwendet. Die protektive Wirksamkeit der Vektoren, die das Tollwut-Glycoproteingen exprimieren, wurde im NIH-Mauspotenz-Standardtest für Tollwut bewertet (Seligmann, 1973). Tabelle 20 zeigt, dass die mit dem hochgradig abgeschwächten NYVAC-Vektor erhaltenen PD_{50}-Werte identisch zu jenen sind, die unter Verwendung einer COPENHAGEN-basierenden Rekombinante erhalten wurden, die das Tollwut-Glycoproteingen im tk-Lokus enthält (Kieny et al., 1984), und ähnlich zu den PD_{50}-Werten, die mit ALVAC-RG, einem Kanarienpocken-basierenden Vektor, der auf Replikation in Vogel-Spezies beschränkt ist.

Beobachtungen.

[0270] NYVAC, in dem bekannte Virulenzgene deletiert sind und das beschränkte in vitro-Wachstumscharakteristika aufweist, wurde in Tiermodell-Systemen analysiert, um seine Anschwächungscharakteristika zu bewerten. Diese Studien wurden im Vergleich mit dem neurovirulenten Vacciniavirus-Laborstamm WR, den zwei Vacciniavirus-Impfstoffstämmen WYETH (New York City Board of Health) und COPENHAGEN (VC-2) so wie mit einem Kanarienpockenvirus-Stamm ALVAC (siehe auch Beispiel 11) durchgeführt. Zusammen lieferten diese Viren ein Spektrum von relativen pathogenen Potenzialen im Maus-Challenge-Modell und dem Kaninchen-Hautmodell, wobei WR der virulenteste Stamm ist, WYETH und COPENHAGEN (VC-2) vorher verwendete abgeschwächte Virus-Stämme mit dokumentierten Charakteristika liefern und ALVAC ein Beispiel eines Pockenvirus liefert, dessen Replikation auf Vogel-Spezies beschränkt ist. Ergebnisse dieser in vivo-Analysen zeigen deutlich die hochgradig abgeschwächten Eigenschaften von NYVAC im Vergleich zu den Vacciniavirus-Stämmen WR, WYETH und COPENHAGEN (VC-2) (Tabellen 14–20). Signifikanterweise waren die LD_{50}-Werte für NYVAC vergleichbar zu jenen, die mit dem auf Vogelwirt-beschränkten Avipoxvirus ALVAC beobachtet wurden. Todesfälle auf Grund von NYVAC so wie ALVAC wurden nur beobachtet, wenn extrem hohe Dosen von Virus auf intrakranialem Weg verabreicht wurden (Beispiel 11, Tabellen 14, 15, 19). Es ist noch nicht festgestellt worden, ob diese Todesfälle auf Grund von nicht-spezifischen Folgen der Beimpfung mit einer großen Proteinmasse erfolgten. Ergebnisse von Analysen in Mausmodellen mit beeinträchtigtem Immunsystem (nackt und CY-behandelt) zeigen auch die relativ hohen Anschwächungscharakteristika von NYVAC im Vergleich zu den WR-, WYETH- und COPENHAGEN-Stämmen (Tabellen 17 und 18). Signifikanterweise wurde keine Hinweis auf disseminierte Vaccinia-Infektion oder Impf-Erkrankung in NYVAC-beimpften Tieren oder ALVAC-beimpften Tieren im Beobachtungszeitraum beobachtet. Die Deletion von multiplen Virulenz-assoziierten Genen in NYVAC zeigt eine synergistische Wirkung in Bezug auf die Pathogenität. Ein anderes Maß für die Beimpfbarkeit von NYVAC wurde durch die intradermale Verabreichung in Kaninchenhaut geliefert (Tabellen 17 und 18). Wenn man die Ergebnisse mit ALVAC in Betracht zieht, einem Virus das nicht in der Lage ist, sich in nicht-Vogel-Spezies zu replizieren, ist die Fähigkeit, an der Stelle der Beimpfung zu replizieren nicht das einzige, das mit der Reaktivität korreliert, da intradermale Beimpfung mit ALVAC Bereiche mit Verhärtung in einer Dosis-abhängigen Weise verursachte. Daher ist es wahrscheinlich, dass andere Faktoren als die replikative Kapazität des Virus zu der Bildung der Läsionen beitragen. Die Deletion von Genen in NYVAC verhindert das Auftreten von Läsionen.

[0271] Zusammen zeigen die Ergebnisse in diesem Beispiel und in den vorhergehenden Beispielen einschließlich Beispiel 11 das hochgradig abgeschwächte Wesen von NYVAC im Vergleich zu WR und den früher angewendeten Vacciniavirus-Impfstoffstämmen WYETH und COPENHAGEN. In der Tat war das pathogene Profil von NYVAC in den getesteten Tiermodellsystemen ähnlich jenem von ALVAC, einem Pockenvirus, von dem bekannt ist, dass es nur in Vogel-Spezies produktiv repliziert. Die offensichtlich eingeschränkte Kapazität von NYVAC, auf Zellen, die von Menschen (Tabelle 16) und anderen Spezies einschließlich Maus, Schwein, Hund und Pferd stammen, produktiv zu replizieren, liefert eine erhebliche Barriere, die potenzielle Übertragung auf nicht geimpfte Kontakte oder die allgemeine Umwelt limitiert oder verhindert, zusätzlich zum Liefern eines Vektors mit reduzierter Wahrscheinlichkeit der Verbreitung unter den geimpften Individuen.

[0272] Signifikanterweise ist gezeigt worden, dass NYVAC-basierende Impfstoffkandidaten wirksam sind. NYVAC-Rekombinanten, die fremde Genprodukte einer Zahl von Pathogenen exprimieren, haben immunologische Reaktionen gegen die fremden Genprodukte in einigen Tierspezies einschließlich den Primaten hervorgerufen. Insbesondere war eine NYVAC-basierende Rekombinante, die das Tollwut-Glycoprotein exprimiert, in der Lage, Mäuse gegen eine letale Tollwut-Herausforderung zu schützen. Die Potenz der NYVAC-basieren-

den Tollwut-Glycoprotein-Rekombinante war vergleichbar zum PD_{50}-Wert für eine COPENHAGEN-basierende Rekombinante, die das Tollwut-Glycoprotein im tk-Lokus enthält (Tabelle 20). Es ist auch gezeigt worden, dass NYVAC-basierende Rekombinanten Masernvirus-neutralisierende Antikörper in Kaninchen und Schutz gegen Herausforderung mit Pseudotollwutvirus und Japanischem Enzephalitisvirus in Schweinen hervorruft. Der hochgradig abgeschwächte NYVAC-Stamm verleiht Sicherheits-Vorteile bei menschlichen und tierärztlichen Anwendungen (Tartaglia et al., 1990). Darüber hinaus kann die Verwendung von NYVAC als ein allgemeines Labor-Expressionsvektorsystem die biologischen Gefahren, die mit der Verwendung des Vacciniavirus assoziiert sind, bedeutend reduzieren.

[0273] Nach den folgenden Kriterien zeigen die Ergebnisse dieses Beispiels und der Beispiele hierin einschließlich Beispiel 11, dass NYVAC hochgradig abgeschwächt ist: a) keine nachweisbare Verhärtung oder Ulceration an der Stelle der Beimpfung (Kaninchenhaut); b) schnelle Beseitigung des infektiösen Virus von der intradermalen Stelle der Beimpfung (Kaninchenhaut); c) Abwesenheit einer testikulären Entzündung (Nacktmäuse); d) deutlich reduzierte Virulenz (intrakraniale Herausforderung, sowohl drei Wochen alte als auch neugeborene Mäuse); e) deutlich reduzierte Pathogenität und Versagen, sich in immundefizienten Subjekten zu verbreiten (Nackt- und Cyclophosphamid-behandelte Mäuse); und f) dramatisch reduzierte Fähigkeit, sich auf einer Vielzahl von menschlichen Gewebekulturzellen zu replizieren. Dennoch, obwohl es hochgradig abgeschwächt ist, behält NYVAC als ein Vektor die Fähigkeit, starke Immunreaktionen auf extrinsische Antigene zu induzieren.

TABELLE 16 Replikation von COPENHAGEN (VC-2), NYVAC und ALVAC in Vogel- oder Menschen abgeleiteten Zelllinien

Zellen	Stunden nach Infektion	Ertrag[a]			% Ertrag
		VC-2	NYVAC	ALVAC	
CEF	0	3,8[b]	3,7	4,5	
	24	8,3	7,8	6,6	
	48	8,6	7,9	7,7	
	72	8,3	7,7	7,5	25
	72A[c]	< 1,4	1,8	3,1	
MRC-5	0	3,8	3,8	4,7	
	72	7,2	4,6	3,8	0,25
	72A	2,2	2,2	3,7	
WISH*	0	3,4	3,4	4,3	
	72	7,6	2,2	3,1	0,0004
	72A	-[d]	1,9	2,9	
DETROIT	0	3,8	3,7	4,4	
	72	7,2	5,4	3,4	1,6
	72A	1,7	1,7	2,9	
HEL	0	3,8	3,5	4,3	
	72	7,5	4,6	3,3	0,125
	72A	2,5	2,1	3,6	
JT-1	0	3,1	3,1	4,1	
	72	6,5	3,1	4,2	0,039
	72A	2,4	2,1	4,4	
HNK	0	3,8	3,7	4,7	
	72	7,6	4,5	3,6	0,079
	72A	3,1	2,7	3,7	

a: Ertrag von NYVAC 72 Stunden nach Infektion, ausgedrückt als ein Prozentsatz des Ertrags von VAC-2 nach 72 Stunden auf der selben Zelllinie.
b: Titer, ausgedrückt als LOG_{50} pfu pro ml.
c: Probe wurde in der Anwesenheit von 40 µg/ml Cytosin-Arabinosid inkubiert.
d: Nicht bestimmt.
*: ATCC #CCL25 Menschliche Amnionzellen.

Tabelle 17. Verhärtung und Ulceration an der Stelle der intradermalen Beimpfung der Kaninchenhaut

VIRUS-STAMM	DOSIS[a]	VERHÄRTUNG		ULCERATION	
		Größe[b]	Tage[c]	Größe	Tage
WR	10^4	386	30	88	30
	10^5	622	35	149	32
	10^6	1057	34	271	34
	10^7	877	35	204	35
	10^8	581	25	88	26
WYETH	10^4	32	5	--[d]	--
	10^5	116	15	--	--
	10^6	267	17	3	15
	10^7	202	17	3	24
	10^8	240	29	12	31
VC-2	10^4	64	7	--	--
	10^5	86	8	--	--
	10^6	136	17	--	--
	10^7	167	21	6	10
	10^8	155	32	6	8
NYVAC	10^4	--	--	--	--
	10^5	--	--	--	--
	10^6	--	--	--	--
	10^7	--	--	--	--
	10^8	--	--	--	--

[a] pfu von angezeigtem Vacciniavirus in 0,1 ml PBS, intradermal beimpft in eine Stelle.
[b] durchschnittliche maximale Größe der Läsionen (mm^2)
[c] durchschnittliche Zeit nach dem Beimpfen für vollständige Heilung der Läsion.
[d] keine Läsion wahrnehmbar.

Tabelle 18. Persistenz von Pockenvirus an der Stelle der intradermalen Beimpfung

Virus	Inoculum-Dosis	Gesamt-gewonnenes Virus
WR	8,0[a]	6,14
	7,0	6,26
	6,0	6,21
WYETH	8,0	3,66
	7,0	4,10
	6,0	3,59
VC-2	8,0	4,47
	7,0	4,74
	6,0	3,97
NYVAC	8,0	0
	7,0	0
	6,0	0

a: ausgedrückt als $\log_{10}$ pfu.

Tabelle 19. Virulenz-Studien in Mäusen, deren Immunsystem beeinträchtigt ist

Pockenvirus-Stamm	LD_{50}[a]	
	Nacktmäuse	Cyclophosphamid-behandelte Mäuse
WR	422	42
VC-2	$> 10^9$	$< 1{,}65 \times 10^5$
WYETH	$1{,}58 \times 10^7$	$1{,}83 \times 10^6$
NYVAC	$>5{,}50 \times 10^8$	$7{,}23 \times 10^8$
ALVAC	$> 10^9$	$\geq 5{,}00 \times 10^{8b}$

a: Berechnete 50%-letale Dosis (pfu) für Nackt- oder Cyclophosphamid-behandelte Mäuse durch die angezeigten Vacciniaviren und für ALVAC auf intraperitonealem Weg.
b: 5 von 10 Mäusen starben bei der höchsten Dosis von 5×10^8 pfu

Tabelle 20. Vergleichende Wirksamkeit von NYVAC-RG und ALVAC-RG in Mäusen

Rekombinante	PD_{50}[a]
VV-RG	3,74
ALVAC-RG	3,86
NYVAC-RG	3,70

a: Vier bis sechs Wochen alte Mäuse wurden in die Fußsohle mit 50–100 µl eines Bereichs von Verdünnungen (2,0–8,0 $\log_{10}$ Gewebekultur-Infektionsdosis 50% ($TCID_{50}$) von entweder dem VV-RG (Kieny et al., 1984); ALVAC-RG (vCP65) oder NYVAC-RG (vP879) beimpft. Am Tag 14 wurden die Mäuse jeder Gruppe durch intrakraniale Beimpfung mit 30 µl eines lebenden CVS-Tollwutvirusstamms entsprechend 15 letale Dosis 50% (LD_{50}) pro Maus herausgefordert. Am Tag 28 wurden die überlebenden Mäuse gezählt und eine protektive Dosis 50% (PD_{50}) wurde berechnet.

Bezugsbeispiel 6 – KONSTRUKTION VON TROVAC-REKOMBINANTEN, DIE DIE HÄMAGGLUTININ-GLYCOPROTEINE VON VOGEL-INFLUENZAVIREN EXPRIMIEREN

[0274] Dieses Beispiel beschreibt die Entwicklung von Geflügelpockenvirus-Rekombinanten, die die Hämagglutiningene von drei Serotypen des Vogel-Influenzavirus exprimieren.

Zellen und Viren.

[0275] Plasmide, die cDNA-Clone der H4-, H5- und H7-Hämagglutiningene enthalten, wurden von Dr. Robert Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee erhalten. Der Stamm des FPV, bezeichnet als FP-1, ist früher beschrieben worden (Taylor et al., 1988a, b). Er ist ein Impfstoffstamm, der in der Impfung von einem Tag alten Küken nützlich ist. Der parentale Virusstamm Duvette wurde in Frankreich als ein Geflügelpocken-Schorf von einem Huhn erhalten. Das Virus wurde durch ungefähr 50 serielle Passagen in embryonierten Hühnereiern gefolgt von 25 Passagen auf Hühnerembryofibroblasten (CEF)-Zellen abgeschwächt. Dieses Virus wurde im September 1980 durch Rhone Merieux, Lyon, Frankreich, erhalten und eine Haupt-Virussaat etabliert. Das Virus wurde durch Virogenetics im September 1989 erhalten, wo es vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unterzogen wurde. Ein Plaque-Isolat wurde weiter in primären CEF-Zellen amplifiziert, und ein Virusbestand, bezeichnet als TROVAC, wurde etabliert. Der Virusbestand, der im in vitro-Rekombinationstest verwendet wurde, um TROVAC-AIH5 (vFP89) und TROVAC-AIH4 (vFP92) zu produzieren, war weiter durch 8 Passagen in primären CEF-Zellen amplifiziert worden. Der Virusbestand, der verwendet wurde, um TROVAC-AIH7 (vFP100) zu produzieren, war weiter durch 12 Passagen in primären CEF-Zellen amplifiziert worden.

Konstruktion eines Geflügelpocken-Insertionsglasmids am F8-Lokus.

[0276] Plasmid pRW731.15 enthält ein 10 kbp-PvuII-PvuII-Fragment, das von genomischer TROVAC-DNA cloniert wurde. Die Nucleotidsequenz wurde an beiden Strängen für ein 3659 bp-PvuII-EcoRV-Fragment bestimmt. Diese Sequenz ist in **Fig. 11** gezeigt (SEQ ID NR: 77) gezeigt. Die Grenzen eines offenen Leserahmens, der in diesem Labor als F8 bezeichnet wurde, wurden innerhalb dieser Sequenz bestimmt. Der offene Leserahmen beginnt an Position 495 und endet an Position 1887. Eine Deletion wurde von Position 779 bis Position 1926 wie unten beschrieben durchgeführt.

[0277] Plasmid pRW761 ist ein Subclon von pRW731.15, der ein 2430 bp-EcoRV-EcoRV-Fragment enthält. Plasmid pRW761 wurde vollständig mit XbaI verdaut und teilweise mit SspI verdaut. Eine 3700 bp-XbaI-SspI-Bande wurde isoliert und mit den durch Annealing angelagerten doppelsträngigen Oligonucleotiden JCA017 (SEQ ID NR:37) und JCA018 (SEQ ID NR:38) ligiert.

JCA017 (SEQ ID NO:37) 5' CTAGACACTTTATGTTTTTTAATATCCGGTCTT

AAAAGCTTCCCGGGGATCCTTATACGGGGAATAAT 3'

JCA018 (SEQ ID NO:38) 5' ATTATTCCCCGTATAAGGATCCCCCGGGAA

GCTTTTAAGACCGGATATTAAAAAACATAAAGTGT 3'

[0278] Das Plasmid, das aus dieser Ligierung resultierte, wurde als pJCA002 bezeichnet. Plasmid pJCA004 enthält ein nicht-geeignetes Gen, das an den Vacciniavirus-H6-Promotor in Plasmid pJCA002 gebunden ist. Die Sequenz des Vacciniavirus-H6-Promotors ist früher beschrieben worden (Taylor et al., 1998a, b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989). Das Plasmid pJCA004 wurde mit EcoRV und BamHI verdaut, was das nicht-geeignete Gen und einen Teil des 3'-Endes des H6-Promotors deletiert. Die angelagerten Oligonucleotide RW178 (SEQ ID NR:48) und RW179 (SEQ ID NR:49) wurden mit EcoRV und BamHI geschnitten und zwischen die EcoRV- und BamHI-Stellen von JCA004 inseriert, um pRW846 zu bilden.

RW178 (SEQ ID NO:48): 5' TCATTATCGCGATATCCGTGTTAACTAGCTA
GCTAATTTTTATTCCCGGGATCCTTATCA 3'

RW179 (SEQ ID NO:49): 5' GTATAAGGATCCCGGGAATAAAAATTAGCT
AGCTAGTTAACACGGATATCGCGATAATGA 3'

[0279] Das Plasmid pRW846 enthält daher den H6-Promotor 5' von EcoRV im ORF-befreiten F8-Lokus. Die HincII-Stelle 3' des H6-Promotors in pRW846 wird von Translations-Stoppcodons, einer transkriptionellen Stoppsequenz, die durch die frühen Promotoren von Vacciniavirus erkannt werden (Yuen et al., 1987), und einer SmaI-Stelle gefolgt.

Konstruktion des Geflügelpocken-Insertionsplasmids am F7-Lokus.

[0280] Das ursprüngliche nicht ORF-befreite F7-Insertionsplasmid pRW731.13 enthielt ein genomisches 5,5 kb FP-PvuII-Fragment in der PvuII-Stelle von pUC9. Die Insertionsstelle war eine einmalige HincII-Stelle in diesen Sequenzen. Die Nucleotidsequenz, die in Fig. 12 gezeigt ist (SEQ ID NR:78) wurde für eine 2356 bp-Region bestimmt, die die einmalige HincII-Stelle umfasst. Die Analyse dieser Sequenz legte offen, dass die einmalige HincII-Stelle (Fig. 12, unterstrichen) innerhalb eines ORF gelegen war, der ein Polypeptid von 90 Aminosäuren codiert. Der ORF beginnt mit einem ATG an Position 1531 und endet an Position 898 (die Positionen sind durch Pfeile in Fig. 12 markiert).

[0281] Die Arme für das ORF-befreite Insertionsplasmid wurden durch PCR unter Verwendung von pRW731.13 als Matrize abgeleitet. Ein 596 bp-Arm (als HB bezeichnet), der mit der Region stromaufwärts des ORF korrespondiert, wurde mit den Oligonucleotiden F73PH2 (SEQ ID NR:50) (5'-GACAATCTAAGTCCTATTAGAC-3') und F73PB (SEQ ID NR:51) (5'-GGATTTTTAGGTAGACAC-3') amplifiziert. Ein 270 bp-Arm (als EH bezeichnet), der mit der Region stromabwärts des ORF korrespondiert, wurde unter Verwendung der Oligonucleotide F75PE (SEQ ID NR:52) (5'-TCATCGTCTTCATCATCG-3') und F73PH1 (SEQ ID NR:53) (5'-GTCTTAAACTTATTGTAAGGGTATACCTG-3') amplifiziert.

[0282] Das Fragment EH wurde mit EcoRV verdaut, um ein 126 bp-Fragment herzustellen. Die EcoRV-Stelle ist am 3'-Ende, und das 5'-Ende wurde durch PCR gebildet, um das 3'-Ende einer HincII-Stelle zu enthalten. Dieses Fragment wurde in pBS-SK (Stratagene, La Jolla, CA) inseriert, mit HincII verdaut, um Plasmid pF7D1 zu bilden. Die Sequenz wurde durch Didesoxynucleotid-Sequenzanalyse bestätigt. Das Plasmid pF7D1 wurde mit ApaI linearisiert, unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase stumpf beendet und an das 596 bp-HB-Fragment ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pF7D2 bezeichnet. Die gesamte Sequenz und Orientierung wurden durch Nucleotidsequenzanalyse bestätigt.

[0283] Das Plasmid pF7D2 wurde mit EcoRV und BglII verdaut, um ein 600 bp-Fragment herzustellen. Dieses Fragment wurde in pBS-SK inseriert, das mit ApaI verdaut, mit T4-DNA-Polymerase stumpf beendet und in der Folge mit BamHI verdaut worden ist. Das resultierende Plasmid wurde als pF7D3 bezeichnet. Dieses Plasmid enthält einen HB-Arm von 404 bp und einen EH-Arm von 126 bp.

[0284] Das Plasmid pF7D3 wurde mit XhoI linearisiert und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase in der Anwesenheit von 2 mM dNTPs stumpf beendet. Dieses linearisierte Plasmid wurde mit den durch Annealing angelagerten Oligonucleotiden F7MCSB (SEQ ID NR:54) (5'-AACGATTAGTTAGTTACTAAAAGCTTGCTGCAGCCCGGGTTTTTTATTAGTTTAGTTAGTC-3') und F7MCSA (SEQ ID NR:55) (5'-GACTAACTAACTAATAAAAAACCCGGGCTGCAGCAAGCTTTTTGTAACTAACTAATCGTT-3') ligiert. Dies wurde durchgeführt, um eine multiple Clonierungsregion zu inserieren, die die Restriktionsstellen für HindIII, PstI und SmaI zwischen den EH- und HB-Armen enthält. Das resultierende Plasmid wurde als pF7D0 bezeichnet.

Konstruktion des Insertionsplasmids für das H4-Hämagalutinin am F8-Lokus.

[0285] Eine cDNA-Kopie, die das Vogelinfluenza H4 codiert, das von A/Ty/Min/833/80 abgeleitet wurde, wurde von Dr. R. Webster im Plasmid pTM4H833 erhalten. Das Plasmid wurde mit HindIII und NruI verdaut und unter Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase in der Anwesenheit von dNTPs stumpf beendet. Das stumpf-endende 2,5 kbp-HindIII-NruI-Fragment, das die H4-codierende Region enthält, wurde in die HincII-Stelle von pIBI25 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT) inseriert. Das resultierende Plasmid pRW828 wurde teilweise mit BanII geschnitten, das lineare Produkt isoliert und mit HindIII wieder geschnitten. Das Plasmid pRW828, jetzt mit einer 100 bp-HindIII-BanII-Deletion, wurde als ein Vektor für die syntheti-

schen Oligonucleotide RW152 (SEQ ID NR:56) und RW153 (SEQ ID NR:57) verwendet. Diese Oligonucleotide repräsentieren den 3'-Teil des H6-Promotors von der EcoRV-Stelle und richteten das ATG des Promotors mit dem ATG der H4-cDNA aus.

RW152 (SEQ ID NO:56): 5' GCACGGAACAAAGCTTATCGCGATATCCGTTA
AGTTTGTATCGTAATGCTATCAATCACGATTCTGTTCC
TGCTCATAGCAGAGGGCTCATCTCAGAAT 3'

RW153 (SEQ ID NO:57): 5' ATTCTGAGATGAGCCCTCTGCTATGAGCAGGA
ACAGAATCGTGATTGATAGCATTACGATACAAACTTA
ACGGATATCGCGATAAGCTTTGTTCCGTGC 3'

[0286] Die Oligonucleotide wurden durch Annealing angelagert, mit BanII und HindIII geschnitten und in den oben beschriebenen HindIII-BanII-deletierten pRW828-Vektor inseriert. Das resultierende Plasmid pRW844 wurde mit EcoRV und DraI geschnitten, und das 1,7 kbp-Fragment, das die 3'-H6-geförderte H4-codierende Sequenz enthält, wurde zwischen die EcoRV- und HincII-Stellen von pRW846 (früher beschrieben) inseriert, um Plasmid pRW848 zu bilden. Das Plasmid pRW848 enthält daher die H4-codierende Sequenz, verknüpft mit dem Vacciniavirus-H6-Promotor, im ORF-befreiten F8-Lokus des Geflügelpockenvirus.

Konstruktion eines Insertionsplasmids für H5-Hämagglutinin am F8-Lokus.

[0287] Ein cDNA-Clon von Vogelinfluenza H5, abgeleitet von A/Türkei/Irland/1378/83, wurde in Plasmid pTH29 von Dr. R. Webster erhalten. Die synthetischen Oligonucleotide RW10 (SEQ ID NR:58) bis RW13 (SEQ ID NR:61) wurden gebildet, um das Translationsstart-Codon des früher beschriebenen Vacciniavirus-H6-Promotors mit dem ATG des H5-Gens zu überlappen. Die Sequenz setzt sich durch die 5'-SalI-Stelle des H5-Gens fort und beginnt wieder an der 3'-H5-DraI-Stelle, die das H5-Stoppcodon enthält.

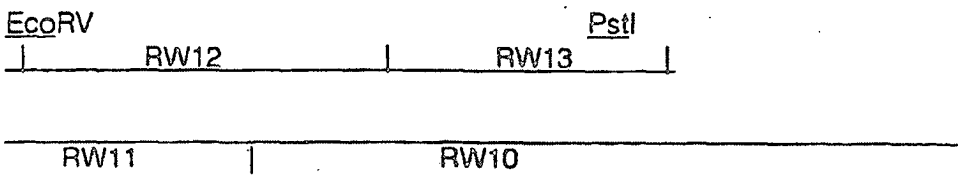
RW10 (SEQ ID NO:58): 5' GAAAAATTTAAAGTCGACCTGTTTTGTTGAGT
TGTTTGCGTGGTAACCAATGCAAATCTGGTC
ACT 3'

RW11 (SEQ ID NO:59): 5' TCTAGCAAGACTGACTATTGCAAAAAGAAGCA
CTATTTCCTCCATTACGATACAAACTTAACG
GAT 3'

RW12 (SEQ ID NO:60): 5' ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGGAAA
TAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGCTAGAAGT
GACCAGATTTGCATTGGT 3'

RW13 (SEQ ID NO:61): 5' TACCACGCAAACAACTCAACAAAACAGGTCG
ACTTTAAATTTTTCTGCA 3'

[0288] Die Oligonucleotide wurden bei 95°C für drei Minuten durch Annealing angelagert, gefolgt von langsamem Abkühlen auf Zimmertemperatur. Dies resultiert in der folgenden doppelsträngigen Struktur mit den angezeigten Enden.



[0289] Clonieren der Oligonucleotide zwischen die EcoRV- und PstI-Stellen von pRW742B resultierte in pRW744. Das Plasmid pRW742B enthält den Vacciniavirus-H6-Promotor verknüpft mit einem nicht-geeigneten Gen, das an der HincII-Stelle vom vorher beschriebenen pRW731.15 inseriert wurde. Verdauung mit PstI und

EcoRV eliminiert das nicht-geeignete Gen und das 3'-Ende des H6-Promotors. Das Plasmid pRW744 enthält jetzt den 3'-Teil des H6-Promotors, der das ATG der Vogelinfluenza H5 überlappt. Das Plasmid enthält auch die H5-Sequenz durch die 5'-SalI-Stelle und die 3'-Sequenz des H5-Stoppcodons (enthaltend eine DraI-Stelle). Verwendung der DraI-Stelle entfernt das H5-3'-nicht-codierende Ende. Die Oligonucleotide fügen ein Transkriptions-Stoppsignal hinzu, das durch die frühe Vacciniavirus-RNA-Polymerase erkannt wird (Yuen et al., 1987). Um das H6-gesteuerte H5-Konstrukt fertig zu stellen, wurde die H5-codierende Region als ein 1,6 kbp-SalI-DraI-Fragment von pTH29 isoliert. Plasmid pRW744 wurde teilweise mit DraI verdaut, das lineare Fragment isoliert, mit SalI wieder geschnitten, und das Plasmid, bei dem jetzt 8 Basen zwischen SalI und DraI deletiert waren, wurde als ein Vektor für das 1,6 kbp-pTH29-SalI- und DraI-Fragment verwendet. Das resultierende Plasmid pRW759 wurde mit EcoRV und DraI geschnitten. Das 1,7 kbp-PRW759-EcoRV-DraI-Fragment, das den 3'-H6-Promotor und das H5-Gen enthält, wurde zwischen die EcoRV- und HincII-Stellen von pRW846 (vorher beschrieben) inseriert. Das resultierende Plasmid pRW849 enthält das H6-gesteuerte Vogelinfluenzavirus-H5-Gen in dem ORF-befreiten F8-Lokus.

Konstruktion eines Insertionsvektors für N7-Hämagglutinin am F7-Lokus.

[0290] Plasmid pCVH71, das das H7-Hämagglutinin von A/CK/VIC/1/85 enthält, wurde von Dr. R. Webster erhalten. Ein EcoRI-BamHI-Fragment, das das H7-Gen enthält, wurde mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase stumpf beendet und in die HincII-Stelle von pIBI25 als PRW827 inseriert. Die synthetischen Oligonucleotide RW165 (SEQ ID NR:62) und RW166 (SEQ ID NR:63) wurden durch Annealing angelagert, mit HincII und StyI geschnitten und zwischen die EcoRV- und StyI-Stellen von pRW827 inseriert, um pRW845 herzustellen.

RW165 (SEQ ID NO:62): 5' GTACAGGTCGACAAGCTTCCCGGGTATCGCG
ATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAATACTCAAATT
CTAATACTCACTCTTGTGGCAGCCATTCACACAAATG
CAGACAAAATCTGCCTTGGACATCAT 3'

RW166 (SEQ ID NO:63): 5' ATGATGTCCAAGGCAGATTTTGTCTGCATTTG
TGTGAATGGCTGCCACAAGAGTGAGTATTAGAATTTG
AGTATTCATTACGATACAAACTTAACGGATATCGCGA
TACCCGGGAAGCTTGTCGACCTGTAC 3'

[0291] Die Oligonucleotide RW165 (SEQ ID NR:62) und RW166 (SEQ ID NR:63) verknüpfen den 3'-Teil des H6-Promotors mit dem H7-Gen. Das 3'-nicht-codierende Ende des H7-Gens wurde durch Isolieren des linearen Produkts eines ApaLI-Verdaus von pRW845, nochmaligem Schneiden mit EcoRI, Isolieren des größten Fragments und Annealing mit den synthetischen Oligonucleatiden RW227 (SEQ ID NR:64) und RW228 (SEQ ID NR:65) entfernt. Das resultierende Plasmid war pRW854.

RW227 (SEQ ID NO:64): 5' ATAACATGCGGTGCACCATTTGTATAT
AAGTTAACGAATTCCAAGTCAAGC 3'

RW228 (SEQ ID NO:65): 5' GCTTGACTTGGAATTCGTTAACTTATA
TACAAATGGTGCACCGCATGTTAT 3'

[0292] Das Stoppcodon von H7 in PRW854 wird von einer HpaI-Stelle gefolgt. Das unmittelbare H6-gesteuerte H7-Konstrukt im ORF-befreiten F7-Lokus (unten beschrieben) wurde durch Einfügen des pRW854-EcoRV-HpaI-Fragments in pRW858, das mit EcoRV geschnitten und an seiner PstI-Stelle stumpf beendet worden war, hergestellt. Plasmid pRW858 (unten beschrieben) enthält den H6-Promotor in einem ORF-befreiten F7-Insertionsplasmid.

[0293] Das Plasmid pRW858 wurde durch Insertion eines 850 bp-SmaI/HpaI-Fragments, das den H6-Promotor, gebunden an ein nicht-geeignetes Gen, enthält, in die vorher beschriebene SmaI-Stelle von pF7D0 konstruiert. Die nicht-geeigneten Sequenzen wurden durch Verdau von pRW858 mit EcoRV (die Stelle 24 bp stromaufwärts des 3'-Endes des H6-Promotors) und PstI ausgeschnitten. Das resultierende 3,5 kb-Fragment wurde isoliert und unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase in der Anwesenheit von 2 mM dNTPs stumpf beendet. Dieses stumpf endende Fragment wurde in ein 1700 bp-EcoRV/HpaI-Fragment, das von pRW854 stammt (vorher beschrieben), ligiert. Dieses EcoRV/HpaI-Fragment enthält das ge-

samte AIV-HA (H7)-Gen, 3' angrenzend an die 24 äußersten 3' bp des VV-H6-Promotors. Das resultierende Plasmid wurde als pRW861 bezeichnet.

[0294] Der 126 bp-EH-Arm (früher definiert) wurde in pRW861 verlängert, um die Rekombinationsfrequenz mit genomischer TROVAC-DNA zu erhöhen. Um dies zu erreichen, wurde ein 575 bp-AccI/SnaBI-Fragment von pRW 731.13 (früher definiert) abgeleitet. Das Fragment wurde isoliert und zwischen die AccI- und NaeI-Stellen von pRW861 inseriert. Das resultierende Plasmid, das einen EH-Arm von 725 bp und einen HB-Arm von 404 bp flankierend zum AIV-H7-Gen enthielt, wurde als pRW869 bezeichnet. Plasmid pRW869 besteht daher aus der H7-codierenden Sequenz, die mit ihrem 5'-Ende an den Vacciniavirus-H6-Promotor gebunden ist. Der linke flankierende Arm besteht aus 404 bp der TROVAC-Sequenz und der rechte flankierende Arm aus 725 bp der TROVAC-Sequenz, die die Insertion zum ORF-befreiten F7-Lokus leitet.

Entwicklung von TROVAC-Vogelinfluenzavirus-Rekombinanten.

[0295] Insertionsplasmide, die die Vogelinfluenzavirus-HA-codierenden Sequenzen enthalten, wurden individuell in TROVAC-infizierte primäre CEF-Zellen durch Verwendung des früher beschriebenen Calciumphosphat-Präzipitationsverfahrens (Panicali et al., 1982; Piccini et al., 1987) transfiziert. Positive Plaques wurden auf der Basis von Hybridisierung an HA-spezifische radioaktiv-markierte Sonden ausgewählt und sequenziellen Runden von Plaqueaufreinigung unterzogen, bis eine reine Population erreicht wurde. Eine repräsentative Plaque wurde dann amplifiziert, um einen Virusbestand zu produzieren. Plasmid pRW849 wurde in einem in vitro-Rekombinationstest verwendet, um rekombinantes TROVAC-AIH5 (vFP89) zu produzieren, das das H5-Hämagglutinin exprimiert. Plasmid pRW848 wurde verwendet, um rekombinantes TROVAC-AIH4 (vFP92) zu produzieren, das das H4-Hämagglutinin exprimiert. Plasmid pRW869 wurde verwendet, um das rekombinante TROVAC-AIH7 (vFP100) zu produzieren, das das N7-Hämagglutinin exprimiert.

Immunfluoreszenz.

[0296] In Influenzavirus-infizierten Zellen wird das HA-Molekül als ein Vorläufermolekül am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und glycosyliert. Während der Passage zu der Plasmamembran unterzieht es sich extensiver post-translationeller Modifikation, die in der proteolytischen Spaltung in die Disulphid-verknüpften HA_1- und HA_2-Untereinheiten und der Insertion in die Wirtszellmembran gipfelt, wo es in der Folge in reife virale Hüllen inkorporiert wird. Um nachzuweisen, ob die in den mit den TROVAC-AIV-rekombinanten Viren infizierten Zellen, die in HA-Molekülen produzierten Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Indirekte Immunfluoreszenz wurde wie beschrieben (Taylor et al., 1990) durchgeführt. Oberflächenexpression des H5-Hämagglutinins in TROVAC-AIH5, des H4-Hämagglutinins in TROVAC-AIH4 und des H7-Hämagglutinins in TROVAC-AIH7 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz bestätigt. Die Expression des H5-Hämagglutinins wurde unter Verwendung eines Pools von monoclonalen Antikörpern, die spezifisch für das H5HA sind, nachgewiesen. Die Expression das H4HA wurde unter Verwendung eines monospezifischen Ziegen-anti-H4-Serums analysiert. Die Expression des H7HA wurde unter Verwendung eines H7-spezifischen monoclonalen Antikörperpräparats analysiert.

Immunpräzipitation.

[0297] Es ist bestimmt worden, dass die Sequenz an und um die Spaltungsstelle des Hämagglutinin-Moleküls eine wichtige Rolle im Bestimmen der viralen Virulenz spielt, da Spaltung des Hämagglutinin-Polypeptids für Viruspartikel notwendig ist, um infektiös zu sein. Die Hämagglutinin-Proteine der virulenten H5- und H7-Viren besitzen mehr als eine basische Aminosäure am Carboxy-Ende von HA1. Es wird angenommen, dass dies zellulären Proteasen, die eine Reihe von basischen Aminosäuren erkennen, ermöglicht, das Hämagglutinin zu spalten, und dem infektiösen Virus ermöglicht, sich sowohl in vitro als auch in vivo zu verbreiten. Die Hämagglutinin-Moleküle der avirulenten H4-Stämme sind in Gewebekultur nicht gespalten, außer wenn exogenes Trypsin zugefügt wird.

[0298] Um nachzuweisen, dass die Hämagglutinin-Moleküle, die durch die TROVAC-Rekombinanten exprimiert werden, authentisch prozessiert wurden, wurden Immunpräzipitations-Experimente wie beschrieben (Taylor et al., 1990) unter Verwendung der oben beschriebenen spezifischen Reagenzien durchgeführt.

[0299] Immunpräzipitations-Analyse des H5-Hämagglutinins, das durch TROVAC-AIH5 (vFP89) exprimiert wird, zeigte, dass das Glycoprotein als die zwei Spaltungsprodukte HA_1 und HA_2 mit den ungefähren Molekulargewichten von 44 beziehungsweise 23 kDa offenkundig ist. Keine solchen Proteine wurden von nicht-infizierten Zellen oder Zellen, die mit parentalen TROVAC infiziert wurden, präzipitiert. Eine ähnliche Immunprä-

zipitations-Analyse des Hämagglutinin, das durch TROVAC-AIH7 (vFP100) exprimiert wird, zeigte spezifische Präzipitation des HA_2-Spaltungsprodukts. Das HA_1-Spaltungsprodukt wurde nicht erkannt. Von nicht-infizierten CEF-Zellen oder TROVAC-infizierten CEF-Zellen wurden keine Proteine spezifisch präzipitiert. Im Gegensatz dazu zeigte die Immunpräzipitations-Analyse des Expressionsprodukts von TROVAC-AIH4 (vFP92) nur Expression des Vorläuferproteins HA_0. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Fehlen der Spaltung der Hämagglutinine von avirulenten Unterarten in Gewebekultur. Keine H4-spezifischen Proteine wurden in nicht-infizierten CEF-Zellen oder Zellen, die mit TROVAC infiziert wurden, nachgewiesen. Herstellung von rekombinantem Virus durch Rekombination, in situ-Hybridisierung von Nitrocellulosefiltern und Screenen auf B-Galactosidase-Aktivität sind wie früher beschrieben (Panicali et al., 1982; Perkus et al., 1989).

Bezugsbeispiel 7 – HERSTELLUNG EINER NYVAC- UND ALVAC-BASIERENDEN REKOMBINANTE, DIE DAS GEN ENTHÄLT, DAS MENSCHLICHEN TUMORNEKROSEFAKTOR – α (TNF-α) CODIERT

[0300] TNF-α ist ein Cytokin, das durch CTLs produziert wird. Es ist eines der Produkte dieser Zellen, das für das Abtöten von Tumorzellen während einer Immunreaktion verantwortlich ist. Es ist früher gezeigt worden, dass die Injektion von rekombinantem TNF die Nekrose und Rückbildung einer Vielzahl von etablierten murinen Krebsarten vermitteln könnte (Asher et al., 1987). Die genauen Mechanismen für diese anti-Tumor-Aktivität bleiben unklar, obwohl TNF offensichtlich die vaskuläre Versorgung von Tumoren beeinflusst (Asher et al., 1987). Sowohl die sezernierten als auch die Membran-gebundenen Formen von TNF-α können für seine anti-Tumor-Aktivitäten kritisch sein (Kriegler et al., 1987).

[0301] Plasmid pE4, das das menschliche Nekrosefaktor-α-Gen enthält, wurde von E. coli extrahiert, die mit diesem Plasmid transformiert worden sind. Die pE4-transformierten E. coli wurden von ATCC (ATCC #CLN-39894) erhalten. Das PCR-Fragment PCR-TNF4 (755 bp) wurde unter Verwendung von pE4 als Matrize und den Oligonucleotiden TNF3 (SEQ ID NR:66); 5'-ATCATCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'), das die äußerste 3'-Region des Vaccinia-H6-Promotors (von der NruI-Stelle bis zum Ende; Perkus et al., 1989) und die ersten 21 bp der TNF-α-codierenden Sequenz enthält, und dem Oligonucleotid TNF2 (SEQ ID NR:67) (5'-ATCATCTCTAGAATAAAAATCACAGGGCAATGATCCC-3') hergestellt, enthaltend die letzen 15 bp der TNF-α-codierenden Sequenz, ein frühes Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal (T_5NT; Yuen und Moss, 1986) und eine XbaI-Restriktionsstelle. Ein vollständiger NruI/XbaI-Verdau wurde durchgeführt, und das resultierende 735 bp-Fragment wurde isoliert und in das 4,8 kb-NruI/XbaI-Fragment, das durch den Verdau des generischen Insertionsplasmids pVQH6C5LSP erhalten wurde, inseriert. Das resultierende Plasmid wurde als pMAW048 bezeichnet. Die Nucleotidsequenz der gesamten H6-TNF-α-Expressionskassette wurde, wie von Goebel et al. (1990) beschrieben, bestätigt.

[0302] Plasmid pVQH6C5LSP wurde auf folgende Weise abgeleitet:
Ein C5-Insertionsvektor, der 1535 bp stromaufwärts von C5 einen Polylinker, enthaltend KpnI, SmaI, XbaI- und NotI-Stellen, und 404 bp von Kanarienpocken-DNA (31 bp der C5-codierenden Sequenz und 373 bp der stromabwärts-Sequenz) enthält, wurde auf folgende Weise abgeleitet. Eine genomische Genbank von Kanarienpocken-DNA wurde im Cosmid-Vektor pVK102 konstruiert (Knauf et al., 1982), mit pRW764.5 sondiert und ein Clon, der ein 29 kb-Insert enthält, identifiziert (pHCOS1). Ein 3,3 kb-ClaI-Fragment von pHCOS1, enthaltend die C5-Region, wurde identifiziert. Sequenzanalyse des ClaI-Fragments wurde verwendet, um die Sequenz in **Fig. 8** (SEQ ID NR:68) von den Nucleotiden 1-1372 auszudehnen.

[0303] Der C5-Insertionsvektor wurde wie folgt konstruiert. Die 1535 bp-stromaufwärts-Sequenz wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonucleotide C5A (SEQ ID NR:69) (5'-ATCATCGAATTCTGAATGTTAAATGTTATACTTG-3') und C5B (SEQ ID NR:75) (5'-GGGGGTACCTTTGAGAGTACCACTTCAG-3') und aufgereinigter genomischer Kanarienpocken-DNA als Matrize hergestellt. Dieses Fragment wurde mit EcoRI (innerhalb von Oligo-C5A) verdaut und in EcoRI/SmaI-verdautes pUC8 cloniert, was pC5LAB herstellte. Der 404 bp-Arm wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonucleotide C5C (SEQ ID NR:71)

(5′-GGGTCTAGAGCGGCCGCTTATAAAGATCTAAAATGCATAATTTC-3′) und

C5DA (SEQ ID NO:72)

(5′-ATCATCCTGCAGGTATTCTAAACTAGGAATAGATG-3′)

hergestellt.

[0304] Dieses Fragment wurde mit PstI (innerhalb von Oligo-C5DA) verdaut und in SmaI/PstI-verdautes pC5LAB cloniert, was pC5L herstellte.

[0305] pC5L wurde innerhalb des Polylinkers mit Asp718 und NotI verdaut, mit alkalischer Phosphatase behandelt und an die mit Kinase behandelten und durch Annealing angelagerten Oligonucleotide CP26 (SEQ ID NR:73)

(5'-GTACGTGACTAATTAGCTATAAAAAGGATCCGGTACCCTCGAGTCTAGAATCG ATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCAC-3') und CP27 (SEQ ID NO:74) (5'-GGCCGTGATTAACTAGTCATAAAAACCCGGGATCGATTCTAGACTCGAGGGTA CCGGATCCTTTTTATAGCTAATTAGTCAC-3')

(enthaltend eine untaugliche X718-Stelle, Translations-Stoppcodons in sechs Leserahmen, ein frühes Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal (Yuen und Moss, 1987), BamHI-, KpnI-, XhoI-, XbaI-, ClaI- und SmaI-Restriktionsstellen, ein frühes Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal, Translations-Stoppcodons in sechs Leserahmen und eine untaugliche NotI-Stelle) ligiert, was Plasmid pC5LSP herstellte.

[0306] Der frühe/späte H6-Vacciniavirus-Promotor (Perkus et al., 1989) wurde durch PCR von einem Plasmid, das den Promotor enthält, unter Verwendung der Oligonucleotide CP30 (SEQ ID NR:75) (5'-TCGGGATCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCG-3') und CP31 (SEQ DI NO:76) (5'-TAGCTCGAGGGTACCTACGATACAAACTTAACGGATATCG-3') abgeleitet. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und XhoI verdaut (Stellen, gebildet an den 5'- und 3'-Enden durch die PCR) und in ähnlich verdautes pC5LSP ligiert, was pVQH6C5LSP herstellte.

[0307] Plasmid pMAW048 wurde in in vitro-Rekombinationstests mit ALVAC (CPpp) als Rettungsvirus verwendet, um das rekombinante Virus vCP245 zu ergeben. Insertion mit diesem Plasmid ersetzt die zwei Kopien des C5-offenen Leserahmens mit der menschlichen TNF-α-Expressionskassette. Fig. 15 zeigt die Nucleotidsequenz der H6/TNF-α-Sequenz und der flankierenden Regionen innerhalb von vCP245 (SEQ ID NR:79). Der H6-Promotor beginnt an Position 74. Das TNF-α-Startcodon ist bei Position 201, und das TNF-α-Stoppcodon ist bei Position 902. Die Positionen 1 bis 73 und Positionen 903 bis 965 flankieren die H6/TNF-α-Expressionskassette.

[0308] Das PCR-Fragment PCR-TNFH6 (156 bp) wurde von Plasmid pBSH6 unter Verwendung der Oligonucleotide H65PH (SEQ ID NR:80) (5'-ATCATCAAGCTTGATTCTTTATTCTATAC-3'), enthaltend eine HindIII-Stelle in den anfänglichen 21 bp der H6-Promotorregion, und TNFH6 (SEQ DI NO:81) (5'-CATGCTTTCAGTGCTCATTACGATACAAACTTAACGG-3'), enthaltend die 19 äußersten 3'-Nucleotide des H6-Promotors und die 18 äußersten 5'-Nucleotide der TNF-codierenden Sequenz, amplifiziert.

[0309] Plasmid pBSH6 wurde auf folgende Weise hergestellt. Der Vaccinia-H6-Promotor durch die EcoRV-Stelle wurde von einem Plasmid, das den synthetischen H6-Promotor enthält (Perkus et al., 1989), unter Verwendung von PCR und den Primern H6PCR2 (SEQ ID NR:82) (5'-TTAACGGATATCGCGATAATG-3') und H6PCR1 (SEQ ID NR:83) (5'-ACTACTAAGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG-3') abgeleitet, was eine 5'-HindIII-Stelle bildete. Dieses 122 bp PCR-abgeleitete Fragment wurde mit HindIII und EcoRV verdaut, gefolgt von Ligierung an ein ähnlich verdautes pBS-SK$^+$ (Stratagene, La Jolla, CA), was Plasmid pBSH6 herstellte. Die Insertion wurde durch Nucleotidsequenz-Analyse bestätigt.

[0310] Das PCR-Fragment PCR-TNF (721 bp) wurde von Plasmid pE4 unter Verwendung der Oligonucleotide TNF1 (SEQ ID NR:84) (5'-ATGAGCACTGAAAGCATG-3'), enthaltend die anfänglichen 18 Nucleotide der TNF-α-codierenden Sequenz, und TNF2 (SEQ DI NO:67) amplifiziert. Das PCR-Fragment PCR-TNF-Fusion (859 bp) wurde unter Verwendung von PCR-TNFH6 und PCR-TNF als Matrizen und der Oligonucleotide H65PH (SEQ ID NR:80) und TNF2 (SEQ ID NR:67) als Primer hergestellt. PCR-TNF-Fusion wurde mit HindIII und XbaI verdaut, und das resultierende 841 bp-Fragment wurde in pBS-SK$^+$ (Stratagene, La Jolla, CA), verdaut mit HindIII und XbaI, inseriert. Das resultierende Plasmid wurde als pMAW047 bezeichnet, und die H6-TNF-Kassette wurde durch Nucleotidsequenz-Analyse wie früher beschrieben (Goebel et al., 1990) bestätigt.

[0311] Das 841 bp-HindIII/XbaI-Fragment, das die H6-TNF-α-Expressionskassette enthält, wurde von pMAW047 isoliert, unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase in der Anwesenheit von 2 mM dNTPs stumpf beendet und in das Vaccinia-Insertionsplasmid pSD541 inseriert. Das resultierende Plasmid wurde als pMAW049 bezeichnet.

[0312] Plasmid pSD541 wurde auf folgende Weise abgeleitet. Die flankierenden Arme für die ATI-Region wurden durch PCR unter Verwendung von Subclonen der Copenhagen-HindIII-A-Region als Matrize hergestellt.

Die Oligonucleotide MPSYN267 (SEQ ID NR:85) (5'-GGGCTCAAGCTTGCGGCCGCTCATTAGACAAGCG-AATGAGGGAC-3') und MPSYN268 (SEQ ID NR:86) (5'-AGATCTCCCGGGCTCGAGTAATTAATTAATT-TTTATTACACCAGAAAAGACGGCTTGAGATC-3') wurden verwendet, um den 420 bp-Vaccinia-Arm rechts der ATI-Deletion abzuleiten. Die synthetischen Oligonucleotide MPSYN269 (SEQ ID NR:87) (5'-TAATTACTCGAGCCCGGGAGATCTAATTTAATTTAATTTATATAACTCATTTTTGAATATACT-3') und MPSYN270 (SEQ ID NO:88) (5'-TATCTCGAATTCCCGCGGCTTTAAATGGACGGAACTCTTTTCCCC-3 wurden verwendet, um den 420 bp-Vaccinia-Arm links der Deletion abzuleiten. Die linken und rechten Arme wurden durch PCR zusammen fusioniert und sind durch eine Polylinker-Region, die die Restriktionsstellen für BglII, SmaI und XhoI bestimmt, getrennt. Das PCR-erzeugte Fragment wurde mit HindIII und EcoRI verdaut, um klebende Enden zu erzeugen, und in pUC8 ligiert, das mit HindIII und EcoRI verdaut wurde, um pSD541 herzustellen.

[0313] Das Plasmid pMAW047 wurde in in vitro-Rekombinationstests (Piccini et al., 1987) mit NYVAC (vP866; Tartaglia et al., 1992) als das Rettungsvirus verwendet. Rekombination mit diesem Plasmid ersetzt den ATI-offenen Leserahmen mit der H6-TNF-α-Expressionskassette. Das rekombinante NYVAC-Virus, enthaltend die H6-TNF-α-Kassette, wurde als vP1200 bezeichnet. Fig. 16 zeigt die Nucleotidsequenz der H6/TNF-α-Expressionskassette, die in die NYVAC-Rekombinante vP1200 inkorporiert wurde, und flankierende NYVAC-Sequenzen (SEQ ID NR:89). Der H6-Promotor beginnt an Position 59. Das TNF-α-Startcodon ist bei Position 185, und das TNF-α-Stoppcodon ist bei Position 884. Die Positionen 1 bis 58 und Positionen 885 bis 947 flankieren die H6/TNF-α-Expressionskassette.

Tabelle 21. Expression von menschlichem TNF-α durch vP1200 und vCP245

Probe	Beschreibung	TNF-α (ng/ml)
vP1196	NYVAC-CMVgB + pp65	0
vP1200	NYVAC-TNF-α	> 240
CPpp	ALVAC	0
vCP245	ALVAC-TNF-α	59

[0314] Die Expression von TNF-α durch vP1200 (NYVAC-TNF-α) und vCP245 (ALVAC-TNF-α) wurde durch ELISA-Test unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, Kat.#1915-01) gemessen. Proben wurden durch Infektion von Vero-Zellen (NYVAC-Rekombinanten) oder primären Hühnerembryofibroblasten (ALVAC) mit rekombinantem oder parentalen Virus hergestellt. Die Zellen wurden geerntet, wenn der CPE vollständig war, und die infizierten Zelllysate wurden für den ELISA-Test nach Ultraschall-Behandlung und Klärung durch Zentrifugation bei 500 × g für 10 min verwendet. Eine Kontrolle, vP1196, die die zwei Cytomegalie-Virus-Proteine gB und pp65 exprimiert, wurde in der selben Weise wie die TNF-α-Rekombinanten hergestellt. Die andere Kontrolle, parentaler ALVAC, war ein teilweise aufgereinigter Virusbestand. Alle Proben enthielten ungefähr 10^7 PFU/ml Virus. Die in Tabelle 21 gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl vP1200 als auch vCP245 menschliches TNF-α exprimieren. Expression von solchen Spiegeln in vivo kann therapeutisch sein.

Bezugsbeispiel 8 – NYVAC- UND ALVAC-BASIERENDE p53-REKOMBINANTE VIREN

[0315] Das nucleäre Phosphoprotein p53 wird in normalen Zellen in sehr niedrigen stationären Spiegeln gefunden. Die Expression von p53 ist während des Zellzyklus streng reguliert und kann in die Kontrolle der Zellproliferation involviert sein. Die molekularen Mechanismen, durch die p53 seine Tumorsuppressor-Aktivität ausübt, bleiben unbekannt, obwohl p53 in zwei konformativen Stadien zu existieren scheint. Eine Form ist einmalig für Wildtyp p53 und ist mit der Fähigkeit assoziiert, das Fortschreiten durch den Zellzyklus zu blockieren, während die zweite Form mit der Fähigkeit assoziiert ist, Zellproliferation zu fördern und Wildtyp- und mutanten Formen gemeinsam ist (Literaturübersicht von Ulrich et al., 1992). p53 ist das Gen, von dem gefunden wird, dass es am häufigsten in einer weiten Vielzahl von menschlichen Tumoren mutiert ist (Literaturübersicht von Hollstein et al., 1991).

[0316] Der wahrscheinlich am meisten untersuchte Krebs, der mit einer p53-Mutation assoziiert ist, ist Brustkrebs. Es ist bekannt, dass eine p53-Mutation in der Überexpression des p53-Genprodukts in primären Brustkrebspatienten resultiert (Davidoff et al., 1991). Es wurde gefunden, dass die Basis für die p53-Überexpression aus einem post-trankriptionellen Mechanismus resultiert, da p53-spezifische mRNA-Spiegel in Tumoren mit

Proteinexpression in hohem und niedrigem Spiegel ähnlich war. Darüber hinaus wurde gefunden, dass die p53-mRNA von überexprimierenden Tumoren Missense-Mutationen in hoch konservierten Regionen des Gens enthält. Es wurde gefunden, dass diese Mutationen in der Folge stabilere p53-Proteinformen hervorbringen, die mit dem Hitzeschock-Protein 70 (HSP-70) Komplexe bilden. Da HSP-70-Proteine mit Antigenverarbeitung in Verbindung gebracht worden sind, kann die humorale Reaktion auf p53, die in einer Untergruppe von Brustkrebs-Patienten beobachtet wurde, nicht nur aus einmaligen Prozessierungs/Präsentations-Arten für Komplexe resultiert haben, solch eine Assoziation kann auch zelluläre anti-p53-Proteinreaktionen hervorrufen (Davidoff et al., 1992). Solche zellulären anti-p53-Immunreaktionen können letztendlich für die Immuntherapie von solchen Krebsarten relevanter sein.

Herstellung von Pockenvirus-basierenden rekombinanten Viren, die Wildtyp- und mutante Formen des menschlichen p53-Genprodukts exprimieren

[0317] Die drei Plasmide p53wtXbaISP6/T3, p53-217XbaI und p53-238XbaI, die menschliche Wildtyp-p53-Gensequenzen beziehungsweise zwei mutante Formen von p53 enthalten, wurden von Dr. Jeffrey Marks (Duke University) erhalten. Das p53-217XbaI enthält ein p53-Gen, das ein p53-Produkt codiert, dem Codon 217 fehlt, während p53-238XbaI ein p53-Genprodukt mit einer Cystein-zu-Arginin-Substitution bei Aminosäure 238 codiert. Die Sequenz der Wildtyp-p53-cDNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde früher beschrieben (Lamb und Crawford, 1986; **Fig. 3**).

[0318] Alle drei p53-Gene waren individuell 3'-angrenzend an den von Perkus et al., 1989 beschriebenen modifizierten Vacciniavirus-H6-Promotor. Diese Manipulationen wurden auf folgende Weise durchgeführt. Ein 227 bp PCR-abgeleitetes Fragment wurde unter Verwendung der Oligonucleotide MM002 (SEQ ID NR:90) (5'-GATCTGACTGCGGCTCCTCCATTACGATACAAACTTAACGG-3') und RW425 (SEQ ID NO:91) (5'-GTGGGTAAGGGAATTCGGATCCCCGGGTTAATTAATTAGTGATAC-3') und dem Plasmid pRW825 als Matrize hergestellt. PCR unter Verwendung dieser Oligonucleotide amplifiziert die Vaccinia-H6-Promotorsequenzen von pRW825 so, dass das 3'-Ende des Promotors genau an die äußerst 5'-gelegene Region der p53-codierenden Sequenz gebunden ist. Plasmid pWR825 enthält den Vacciniavirus-H6-Promotor (Perkus et al., 1989), gebunden an ein nicht-geeignetes Gen.

[0319] PCR wurde auch verwendet, um ein 480 bp- und ein 250 bp-Fragment von p53wtXbaISP6/T3 herzustellen. Das 480 bp-Fragment wurde mit den Oligonucleotiden MM003 (SEQ ID NR:92) (5'-GTTTG-TATCGTAATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC-3') und MM008 (SEQ ID NO:93) (5'-CATTACGATACAAACTTAACGGATATCGCGACGCGTTCACACAGGGCAGGTCTTGGC-3') abgeleitet. Dieses Fragment enthält den 3'-Teil der Vacciniavirus-H6-Promotorsequenzen und den 5'-Teil der p53-codierenden Sequenzen durch die SgrAI-Stelle. Das 250 bp-Fragment wurde durch Amplifikation mit den Oligonucleotiden MM05 (SEQ ID NR:94) (5'-TACTACCTCGAGCCCGGGATAAAAACGCGTTCAGTCTGAGTCAGGC-CC-3') und MM007 (SEQ ID NO:95) (5'-GTGTGAACGCGTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCAG-CTGCGTGGGCGT GAGCGCTTC-3') abgeleitet. Dieses PCR-Fragment enthält das 3'-Ende der p53-codierenden Sequenzen, beginnend an der StuI-Restriktionsstelle. Die 480 bp- und 250 bp-PCR-Fragmente wurden so hergestellt, dass das 5'-Ende des MM005/MM007-abgeleiteten (SEQ ID NR:94/95) Fragments mit dem 3'-Ende des MM003/MM008-abgeleiteten (SEQ ID NR:92/93) Fragments überlappt.

[0320] Die 227 bp-, 480 bp- und 250 bp PCR-abgeleiteten Fragmente wurden gepoolt und durch PCR unter Verwendung der Oligonucleotide MM006 (SEQ ID NO:96) (5'-ATCATCGGATCCCCCGGGTTCTTTATTCTA-TAC-3') und MM005 (SEQ ID NR:94) fusioniert. Das fusionierte 783 bp-PCR-Produkt enthält den H6-Promotor 5'-angrenzend an den 5'-Teil der p53-codierenden Sequenz (durch die SgrAI-Restriktionsstelle), gefolgt vom Ende der p53-codierenden Sequenz, beginnend an der StuI-Stelle. Dem Ende der p53-codierenden Sequenz folgend wurden ein T_5NT-Sequenzmotiv, das die frühe Vaccinia-Transkriptionsterminierung liefert (Yuen und Moss, 1986), und eine einmalige XhoI-Stelle zugefügt. Es sollte bemerkt werden, dass das endgültige H6-p53-PCR-Fusionsprodukt (783 bp) nicht die p53-codierenden Sequenzen zwischen den SgrAI- und StuI-Restriktionsstellen enthält.

[0321] Die 783 bp-Fusion wurde mit BamHI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende) verdaut und in das Plasmid pSD550 inseriert, um Plasmid pMM105 zu erbringen. Plasmid pSD550 ermöglicht die Insertion von fremden Genen in den Vaccinia-I4L-Lokus durch Ersetzen der I4L-codierenden Sequenz. Dieses Plasmid wurde zuerst durch Verdauen dieses Plasmids mit BglII und SmaI von pSD548 (Tartaglia et al., 1992) abgeleitet. Dieses verdaute Plasmid wurde dann ligiert, um die Oligonucleotide 539A (SEQ ID NR:97) (5'-AGAAAAATCAGTTAGCTAAGATCTCCCGGGCTCGAGGGTACCGGATCCTGATTAGTTAATTTTTGT-3') und 539B (SEQ ID NO:98) (5'-GATCACAAAAATTAACTAATCAGGATCCGGTACCCTCGAGCCCGGGA-

GATCTTAGCTAACTGATTTTTCT-3') durch Annealing anzulagern, um pSD550 herzustellen.

[0322] Die Plasmide, die das intakte p53-Gen (Wildtyp- oder mutante Formen) 3'-angrenzend an den H6-Promotor enthalten, wurden durch vorheriges Verdauen von pMM105 mit SgrAI und StuI hergestellt. Ein 795 bp-SgrAI/StuI-Fragment wurde von p53wtXbaISP6/T3 und p53-238XbaI isoliert, während ein 792 bp-Fragment von p53-217XbaI isoliert wurde. Diese Fragmente wurden individuell an das SgrAI/StuI-verdaute pMM105-Plasmid ligiert, um pMM106, pMM108 beziehungsweise pMM107 zu ergeben.

[0323] Die Plasmide pMM106, pMM107 und pMM108 wurden in Standard-in vitro-Rekombinationsexperimenten (Piccini et al., 1987) mit NYVAC (vP866; Tartaglia et al., 1992) als das Rettungsvirus verwendet, um die rekombinanten Viren vP1101, vP1096 beziehungsweise vP1098 herzustellen. Fig. 17 zeigt die Nucleotidsequenz der Wildtyp-p53-Expressionskassette und der flankierenden Regionen innerhalb von vP1101 (SEQ ID NR:99). Der H6-Promotor beginnt bei Position 145. Das p53-Startcodon ist bei Position 269, und das p53-Stoppcodon ist bei Position 1450. Positionen 1 bis 144 und Positionen 1451 bis 1512 flankieren die H6/p53-Expressionskassette. Die Sequenzen innerhalb von vP1096 und vP1098 sind identisch, außer dass vP1096 eine 3-Basen-Deletion von Nucleotid 920 bis 922 enthält, während vP1101 eine Punktmutation bei Nucleotid 980 (T oder C) enthält.

[0324] Sowohl Immunfluoreszenz- als auch Immunpräzipitationstests wurden unter Verwendung eines monoclonalen p53-spezifischen Antikörpers (pAB1801, Oncogene Science, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Marks) durchgeführt, um Expression von p53 in vP1101-, vP1098- und vP1096-infizierten Vero-Zellen zu zeigen. Diese Tests wurden wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) durchgeführt. Der Immunfluoreszenztest zeigte p53-spezifische fluoreszente Färbung von Zellen, die mit vP1101, vP1096 oder vP1098 infiziert wurden. Das p53-Antigen war sowohl im Kern als auch im Cytoplasma der infizierten Zellen lokalisiert. Die Kernfärbung war jedoch intensiver in vP1101-infizierten Zellen. Diese Ergebnisse sind ähnlich zu jenen, die von Ronen et al. (1992) unter Verwendung von Replikations-kompetentem Vaccinia, um Wildtyp- und mutante Formen von p53 zu exprimieren, berichtet wurden. In Vero-Zellen, die mit dem parentalen-NYVAC-Virus vP866 infiziert wurden, wurde keine p53-spezifische fluoreszente Färbung beobachtet.

[0325] ALVAC (CPpp)-p53-Insertionsplasmide wurden durch Ausschneiden der p53-Expressionskassetten von pMM106, pMM107 und pMM108 durch Verdau mit BamHI und XhoI und dem einzelnen Inserieren von ihnen in BamHI/XhoI-verdautes pNVQC5LSP-7 konstruiert. Das 1320 bp-BamHI/XhoI-Fragment, das die H6-p53-Expressionskassette von pMM106 und pMM108 enthält, wurde in pNVQC5LSP-7 inseriert, um pMM110 beziehungsweise pMM112 zu ergeben, während das 1317 bp-BamHI/XhoI-Fragment, das von pMM107 abgeleitet und in pNVQC5LSP-7 inseriert wurde, pMM111 ergab.

[0326] Das Plasmid pNVQC5LSP-7 wurde auf folgende Weise abgeleitet. pC5LSP (definiert in Beispiel 1) wurde mit BamHI verdaut und an die durch Annealing angelagerten Oligonucleotide CP32 (SEQ ID NR:100) (5'-CATCTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAGAACGAAGACTATCTGCTCGTTAATTAAT-TAGGTCGACG-3') und CP33 (SEQ ID NO:101) (5'-CATCCGTCGACCTAATTAATTAACGACGACATAGTCTCGTTCTCGCCTGCCTGAT-GACTAATTAATTAA-3') ligiert, um pVQC5LSP6 herzustellen. pVQC5LSP6 wurde mit EcoRI verdaut, mit alkalischer Phosphatase behandelt und an die selbst-annelierten, mit Kinasen behandelte Oligonucleotide CP29 (SEQ ID NR:102) (5'-AATTGCGGCCGC-3') ligiert, mit NotI verdaut und wurde linear aufgereinigt, gefolgt von Selbstligierung. Diese Vorgehensweise brachte eine NotI-Stelle in pVQC5LSP6 ein, was pNVQC5LSP-7 herstellte.

[0327] Die Insertionsplasmide pMM110, pMM111 und pMM112 wurden in in vitro-Rekombinations-Standardexperimenten (Piccini et al., 1987) mit ALVAC (CPpp) als das Rettungsvirus verwendet, um vCP207, vCP193 beziehungsweise vCP191 zu ergeben. Bestätigung der Expression des p53-Genprodukts wurde durch Immunpräzipitationstests, die wie oben beschrieben durchgeführt wurden, erreicht. Fig. 18 stellt die Nucleotidsequenz der H6/p53 (Wildtyp)-Expressionskassette und der flankierenden Regionen von vCP207 (SEQ ID NR:103) dar. Der H6-Promotor beginnt bei Position 109. Das p53-Startcodon liegt bei Position 233, und das p53-Stoppcodon liegt bei Position 1414. Positionen 1 bis 232 und Positionen 1415 bis 1483 flankieren die H6/p53-Expressionskassette. Die Nucleotidsequenz ist identisch mit jener innerhalb von vCP193 und vCP191, außer dass vCP193 eine 3-Nucleotid-Deletion von Nucleotid 973 bis 975 enthält, während vCP191 eine Punktmutation bei Nucleotid 94 (T zu C) enthält.

[0328] Eine Auflistung der rekombinanten NYVAC- und ALVAC-basierenden p53-Viren ist in Tabelle 22 geliefert.

TABELLE 22. Rekombinante NYVAC- und ALVAC-basierende p53-Viren

Rekombinantes Virus	Parentales Virus	Gen-Insertion
vP1101	NYVAC	W.t. 53
vP1096	NYVAC	p53 (-AS 217)
vP1098	NYVAC	p53 (AS238; C zu R)
vCP207	ALVAC	W.t. 53
vCP193	ALVAC	p53 (-AS 217)
vCP191	ALVAC	p53 (AS 238; C zu R)

Bezugsbeispiel 9 – NUTZEN VON NYVAC- UND ALVAC-BASIERENDEN REKOMBINANTEN VIREN, DIE DAS MAGE-1-GEN ENTHALTEN

[0329] Das menschliche Melanom-assoziierte Antigen MZ2-E wird durch das MAGE-1-Gen codiert (Literaturübersicht von van der Bruggen und Van der Eynde, 1992). MAGE-1 wird in primären Melanom-Tumorzellen, Melanom-abgeleiteten Zelllinien und bestimmten Tumoren, die nicht von Melanom-Ursprung sind, aber nicht in normalen Zellen, außer im Hoden, exprimiert (Coulie et al., 1993). Aus immunologischer Sicht ist von Interesse, dass bekannt ist, dass CTLs von Melanom-tragenden Patienten, die vom HLA-A1-MHC-Haplotyp sind, ein Nonapeptid des MZ2-E-Genprodukts erkennen (Traveseri et al., 1992). Daher liefert die Definition eines solchen Antigens einen Mechanismus für gezielte Immuntherapie für Melanompatienten vom Typ-HLA (HLA-A1).

Herstellung von rekombinanten NYVAC- und ALVAC-basierenden Viren, die das MAGE-1-Gen enthalten

[0330] Das PCR-Fragment PCR-N6 (162 bp) wurde unter Verwendung von pBSH6 (in Beispiel 14 beschrieben) als Matrize und der Oligonucleotide H65PH (SEQ ID NR:80) und M1-4 (SEQ ID NO:104) (5'-CAGACTCCTCTGCTCAAGAGACATTACGATACAAACTTAACG-3') synthetisiert, das zu mindest 18 bp des H6-Promotors und die anfänglichen 24 Nucleotide des MAGE-1-Gens enthält. Ein zweites PCR-Fragment (PCR-M1) wurde von Plasmid pTZ18RMAGE1 unter Verwendung der Oligonucleotide M1-1 (SEQ ID NR:105) (5'-ATGTCTCTTGAGCAGAGGAGTCTG-3' und M1-2 (SEQ ID NO:106) (5'-CAGGCCATCATAGGAGAGACC-3') amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment repräsentiert die anfänglichen 546 bp der MAGE-1-codierenden Sequenz.

[0331] Das Plasmid pTZ18RMAGE-1 enthält einen cDNA-Clon des MAGE-1-Gens. Dieses Gen codiert das menschliche MZE-2-Melanom-Abstoßungsgen. Dieses Plasmid wurde von Dr. Lloyd Old (Memorial Sloan-Kettering, NY, NY) zur Verfügung gestellt, der das Plasmid ursprünglich von Dr. Thierry Boon (Ludwig Inst. for Cancer Research, Brüssel, Belgien) erhalten hatte.

[0332] Das PCR-Fusionsprodukt PCR-H6M1 wurde unter Verwendung von PCR-H6 und PCR-M1 als Matrizen und der Oligonucleotide H65PH (SEQ ID NR:80) und M1-2 (SEQ ID NR:106) als Primer hergestellt. Ein vollständiger HindIII/BlgII-Verdau von PCR-H6M1 wurde durchgeführt, und die resultierenden 556 bp wurden für die nachfolgenden Clonierungsschritte aufgereinigt.

[0333] Das PCR-Fragment PCR-M3' (535 bp) wurde von pTZ18RMAGE-1 unter Verwendung der Oligonucleotide M1-3 (SEQ ID NR:107) (5'-GTGGCTGATTTGGTTGGTTTTCTG-3') das 24 Nucleotide enthält, die komplementär zum MAGE-1-Gen an einer Region ungefähr 200 bp stromaufwärts der M1-2-Oligonucleotidsequenz ist, und M1-5 (SEQ ID NR:108) (5'-ATCATCTCTAGAAAAAAAATCACATAGCTGGTTTCAG-3'), das die terminalen 15 Nucleotide der MAGE-1-codierenden Sequenz, einem frühen Vaccinia-Transkriptions-Terminierungssignal (T_5NT; Yuen und Moss, 1986), und eine XbaI-Restriktionsstelle enthält, amplifiziert. PCR-M3' wurde mit BglII und XbaI verdaut. Das resultierende 414 bp-Fragment wurde isoliert und in HindIII/XbaI-verdautes pBS-SK (+) mit dem 556 bp-HindIII/BlgII-verdauten PCR-Fragment PCR-H6M1 co-inseriert. Das resultierende Plasmid, das die gesamte H6-MAGE-1-Expressionskassette enthält, wurde als pMAW034 bezeichnet. Die H6-MAGE-1-Kassette wurde durch Nucleotidsequenzanalyse wie bei Goebel et al. (1990) bestätigt.

[0334] Das 864 bp-NruI/XbaI-Fragment von pMAW034 wurde isoliert und in pVQH6C5LSP (in Beispiel 14 be-

schrieben) inseriert, das in ähnlicher Weise verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde als pMAW036 bezeichnet. Dieses Plasmid diente als das Insertionsplasmid für das Ersetzen der zwei C5-ORFs im ALVAC-Genom mit der H6-MAGE-1-Expressionskassette.

[0335] Plasmid pMAW036 wurde in in vitro-Rekombinations-Standardexperimenten mit ALVAC als das Rettungsvirus verwendet. Das rekombinante Virus wurde durch einen in situ-Plaquehybridisierungs-Test unter Verwendung von MAGE-1-spezifischen radioaktiv-markierten DNA-Sonden identifiziert. Rekombinante Plaques wurden plaqueaufgereinigt und amplifiziert. Die resultierende ALVAC-basierende Rekombinante, die das MAGE-1-Gen enthält, wurde als vCP235 bezeichnet. Fig. 19 zeigt die Nucleotidsequenz der H6/MAGE-1-Expressionskassette und der flankierenden Region, enthalten in vCP235 (SEQ ID NR:109). Der H6-Promotor beginnt bei Position 74. Das MAGE-1-Startcodon liegt bei Position 201, und das MAGE-1-Stoppcodon liegt bei Position 1031. Positionen 1 bis 73 und Positionen 1032 bis 1094 flankieren die H6/MAGE-1-Expressionskassette.

[0336] Das NYVAC (vP866)-Insertionsplasmid pMAW037 wurde durch anfängliches Verdauen von pMAW034 mit NruI/BamHI hergestellt. Das resultierende 879 bp-Fragment wurde isoliert und in NruI/BamHI-verdautes pSPHAH6 inseriert. Das resultierende Plasmid wurde als pMAW037 bezeichnet.

[0337] Plasmid pSPHAH6 wurde auf folgende Weise hergestellt. Plasmid pSD544 (enthaltend Vacciniasequenzen, die die Stelle des HA-Gens umgeben, das mit einer Polylinker-Region und Translations-Stoppcodons in sechs Leserahmen ersetzt wurde) wurde mit XhoI innerhalb des Polylinkers verdaut und mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase-I gefüllt und mit alkalischer Phosphatase behandelt. SP126 (enthaltend den Vaccinia-H6-Promotor) wurde mit HindIII verdaut, mit Klenow behandelt und der H6-Promotor durch Verdau mit SmaI isoliert. Ligierung des H6-Promotorfragments an pSD544 erzeugte SPHA-H6, das den H6-Promotor in der Polylinker-Region enthielt (in der Richtung der HA-Transkription).

[0338] Plasmid pMAW037 wurde in in vitro-Rekombinations-Standardexperimenten (Piccini et al., 1987) mit NYVAC (vP866) als das Rettungsvirus verwendet. Fig. 20 zeigt die Nucleotidsequenz der H6/MAGE-1-Expressionskassette und der flankierenden Regionen innerhalb von pMAW037 (SEQ ID NR:110). Der H6-Promotor beginnt bei Position 52. Das MAGE-1-Startcodon liegt bei Position 179, und das MAGE-1-Stoppcodon liegt bei Position 1009. Positionen 1 bis 51 und Positionen 1010 bis 1084 flankieren die H6/MAGE-1-Expressionskassette.

Bezugsbeispiel 10 – HERSTELLUNG VON ALVAC- UND NYVAC-BASIERENDEN CEA-REKOMBINANTEN VIREN

[0339] Das CEA-Gen wurde im Plasmid pGEM.CEA bereitgestellt, das die CEA-codierende Sequenz (2109 Nucleotide) so wie 5'- und 3'-untranslatierte Regionen enthält (Dr. J. Schlom, NCI-NIH). Das 5'-Ende des CEA-Konstrukts wurde modifiziert, um die 5'-untranslatierten Sequenzen zu entfernen und den Vaccinia-H6-Promotor vor das ATG-Startcodon von CEA zu platzieren. Dies wurde durch PCR mit dem Oligonucleotidpaar CEA1 (SEQ ID NR:111) (5'-TATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGTCTCCCTCG-3') und CEA2 (SEQ ID NO:112) (5'-TGCTAGATCTTTATCTCTCGACCACTGTATG-3') und dem Plasmid pGEM.CEA als Matrize erreicht. Das resultierende Fragment verknüpft die dreißig 3' Nucleotide des H6-Promotors mit dem CEA-Startcodon, erstreckt sich 22 Nucleotide über die ApaI-Stelle bei Position 278 der CEA-codierenden Sequenz und endet mit einer BglII-Stelle, die durch den PCR-Primer CEA2 (SEQ ID NR:114) eingebracht wurde. Vor dem Clonieren wurde dieses Fragment mit EcoRV (die Stelle, die innerhalb des 3'-Endes des H6-Promotors lokalisiert ist) und BglII verdaut. Das verdaute 5'-PCR-Fragment wurde dann in eine 3-Weg-Ligierung mit zwei Fragmenten, die von Plasmid pI4L.H6 abgeleitet wurden, eingeschlossen: ein NcoI/BglII-Vektorfragment und ein NcoI/EcoRV-Fragment, das den 5'-Teil des H6-Promotors enthält. Das resultierende Plasmid, das als pI4L.H6.CEA-5' bezeichnet wurde, enthält den Volllängen-H6-Promotor, gebunden an ein 5'-CEA-Fragment, das sich vom ATG-Codon durch die ApaI-Stelle bei Position 278 erstreckt.

[0340] Das 3'-Ende von CEA wurde modifiziert, um die untranslatierte 3'-Region von CEA zu entfernen und ein frühes Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal (T_5NT) gefolgt von einer Reihe von Restriktionsstellen XhoI, XbaI, SmaI, HindIII) nach dem TAG-Stoppcodon zu platzieren. Dies wurde durch PCR mit dem Oligonucleotidpaar CEA3 (SEQ ID NR:113) (5'-CTATGAGTGTGGAATCCAGAACG-3') und CEA4 (SEQ ID NO:114) (5'-TCAGAAGCTTCCCGGGTCTAGACTCGAGATAAAAACTATATCAGAGCAACC-3') und Plasmid pGEM.CEA als Matrize erreicht. Das resultierende Fragment erstreckt sich von einer Position, die 32 Nucleotide 5'-der CEA-HindII-Stelle bei Position 1203 lokalisiert ist, bis zum 3'-Ende der codierenden Sequenz. Dieses Fragment wurde als ein HindII/HindIII-Fragment in ein HindII/HindIII-verdautes pGEM.CEA-Vektorfrag-

ment cloniert. Das resultierende Plasmid, das als pGEM.CEA-3' bezeichnet wurde, enthält das gesamte CEA-Gen, wie es in pGEM.CEA gefunden wird, mit einem 3'-Ende, das modifiziert ist, um die untranslatierte 3'-Region zu entfernen und sie mit einem T_5NT-Signal gefolgt von XhoI-, XbaI-, SmaI- und HindIII-Restriktionsstellen zu ersetzen.

[0341] Um ein ALVAC-C3-Donorplasmid herzustellen, das CEA enthält, wurde ein BamHI/ApaI-Fragment, das den H6-Promotor, verknüpft mit dem 5'-Ende von CEA, enthält, von pI4L.H6.CEA-5' erhalten, einem ApaI/XhoI-Fragment, das den Rest der CEA-codierenden Sequenz (plus T_5NT) enthält, wurde von pGEM.CEA-3' erhalten, und ein BamHI/XhoI-C3-Vektorfragment wurde von Plasmid p126.C3 abgeleitet. Nach folgender 3-Weg-Ligierung wurde das Plasmid pH6.CEA.C3 erhalten. Dieses Plasmid enthält die Volllängen-H6-CEA-Expressionskassette, die zwischen die linken und rechten flankierenden Arme von ALVAC-DNA inseriert wurde, die die Insertion zu den C3-Stellen am ALVAC-Genom lenkt. Transkription von CEA ist von rechts nach links orientiert.

[0342] Plasmid p126.C3, ein ALVAC-C3-Donorplasmid, wurde wie folgt abgeleitet. Dieses Plasmid enthält eine Insertion, das aus cDNA besteht, die vom Plasmodium falciparum-SERA-Gen (Li et al., 1989; Bzik et al., 1989; Knapp et al., 1989; BEACHTE: SERA ist auch als SERP I und p126 bekannt) unter der Kontrolle des frühen Entomopockenvirus 42K-Promotors abgeleitet wurde.

A. Methodik zur Herstellung von p126.C3.

1. Konstruktion der P. falciparum FCR3-Stamm-Blutstadium-cDNA Genbank.

[0343] Gesamt-RNA von menschlichen Erythrocyten, die mit dem P. falciparum FCR3-Stamm infiziert wurden, wurde von Dr. P. Delplace zur Verfügung gestellt (INSERM-U42). Poly-A^+-RNA wurde von dieser Probe unter Verwendung von Oligo(dT)-Cellulose (Stratagene, La Jolla, CA.), wie von Avivi und Leder (1972) beschrieben und von Kingston (1987) modifiziert, isoliert. Kurz, Gesamt-RNA wurde mit Oligo(dT)-Cellulose in Bindungspuffer (0,5 mM NaCl, 0,01 M Tris-Cl, pH 7,5) gemischt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Poly-A^+-RNA/Oligo(dT)-Cellulosekomplexe wurden durch Zentrifugieren pellettiert und 3 mal mit Bindungspuffer gewaschen. Aufgereinigte poly-A^+-RNA wurde von der Oligo(dT)-Cellulose in Elutionspuffer (0,01 M Tris-Cl, pH 7,5) eluiert. Eine zweite Elution mit DEPC-behandeltem dH_2O wurde durchgeführt, die Eluate wurden gepoolt und die poly-A^+-RNA durch Ethanolpräzipitation gewonnen.

[0344] Die aufgereinigte poly-A^+-RNA wurde als eine Matrize für die Synthese des ersten Strangs der cDNA durch reverse Transkriptase in einer Reaktion, die mit Oligo(dT) geprimt wurde, verwendet (Watson and Jackson, 1985; Klickstein und Neve, 1987). Für diese Reaktion wurde 12 µg poly-A^+-RNA mit 105 Einheiten AMV-reverser Transkriptase (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, FL.) in 100 mM Tris-Cl, pH 8,3, 30 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 25 mM DTT, 80 Einheiten RNasin, 1 mM von jedem dNTP und 24 µg/ml Oligo$(dT)_{12-18}$ als Primer für 2 Stunden bei 42°C inkubiert. Nach organischen Extraktionen wurde doppelsträngige cDNA durch Verwendung von DNA-Polymerase-I und RNase-H mit dem ersten Strang der cDNA als Matrize erhalten (Watson und Jackson, 1985: Klickstein und Neve, 1987). Der erste Strang der cDNA wurde mit 25 Einheiten DNA-Polymerase-I und 1 Einheit RNase-H in 20 mM Tris-Cl, pH 6, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM KCl, 500 µg/ml BSA, 25 mM DTT und 0,1 mM von jedem dNTP bei 12°C für eine Stunde inkubiert, gefolgt von einer Stunde bei Zimmertemperatur, um den zweiten Strang der cDNA zu synthetisieren. Die doppelsträngige cDNA wurde durch organische Extraktionen und Ethanolpräzipitation gewonnen.

[0345] Die doppelsträngige Blutstadium-cDNA wurde dann sequenziell mit T4-DNA-Polymerase, um stumpfe Enden zu bilden, und EcoRI-Methylase behandelt, um die internen EcoRI-Stellen zu schützen. EcoRI-Verknüpfer wurden dann zugefügt, gefolgt von Verdau mit EcoRI und Größenselektion auf einem 5–25% Saccharose-Gradienten. Die Fraktionen, die lange cDNAs (1–10 Kb) enthielten, wurden gepoolt und in den EcoRI-gespaltenen Lambda-ZAPII-Vektor (Stratagene, La Jolla, CA.) ligiert. Der resultierende Phage wurde verpackt und verwendet, um den XL-1-Blue-E.coli-Stamm (Stratagene) zu infizieren. Der Phage wurden dann von diesen Zellen geerntet und durch einen zusätzlichen Zyklus der Infektion von XL-1-Blue amplifiziert, um einen hohen Titer der FCR3-Stamm-Blutstadium-cDNA-Genbank zu produzieren.

2. Screenen der cDNA-Genbank nach SERA-cDNA-Clonen.

[0346] Die cDNA-Genbank des FCR3-Stamms wurde durch Plaquehybridisierung mit ^{32}P-endmarkierten Oligonucleotiden, die von veröffentlichten Sequenzen von SERA abgeleitet wurden, gescreent, um cDNA nachzuweisen. Die cDNA-Genbank war auf einem Rasen von XL-1-Blue (Stratagene) in 150 mm-Schalen in einer

Dichte von 100 000 Plaques pro Schale ausgebreitet. Plaques wurden auf Nitrocellulosefilter transferiert, die dann in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH für 2 Minuten, 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-Cl, pH 8 für 5 Minuten, 0,2 M Tris-Cl, pH 7,5/2X SSC für eine Minute eingeweicht und für 2 Stunden in einem 80°C-Vacuumofen gebacken wurden. Die Filter wurden in 6X SSC, 5X Denhardts, 20 mM NaH_2PO_4, 500 µg/ml Lachssperma-DNA für zwei Stunden bei 42°C vorhybridisiert. Die Hybridisierungen wurden in 0,4% SDS, 6X SSC, 20 mM NaH_2PO_4, 500 µg/ml Lachssperma-DNA für 18 Stunden bei 42°C nach der Zugabe von einem ^{32}P-markierten Oligonucleotid durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter 3 mal mit 6X SSC, 0,1% SDS abgespült, für 10 Minuten bei Zimmertemperatur gewaschen und für 5 Minuten bei 58°C gewaschen. Die Filter wurden dann einem Röntgenfilm bei –70°C ausgesetzt.

[0347] Plaques, die mit der Oligonucleotidsonde hybridisierten, wurden aus den Schalen entnommen und in SM-Puffer (100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,01% Gelatine), enthaltend 4% Chloroform, resuspendiert. Verdünnungen von solchen Phasenbeständen wurden verwendet, um XL-1-Blue zu infizieren, die Plaques wurden auf Nitrocellulose transferiert, und die Filter wurden mit ^{32}P-markierten Oligonucleotiden hybridisiert. Gut isolierte positive Plaques wurden selektiert und zwei zusätzlichen Runden der Aufreinigung wie gerade beschrieben unterzogen.

3. Isolierung von SERA-cDNA-enthaltenden Plasmiden von positiven Phagen-Clonen.

[0348] SERA-cDNAs im pBluescript-Plasmidvektor (Stratagene) wurden durch ein in vivo-Ausschneide-Protokoll, das für die Verwendung mit dem Lambda-ZAPII-Vektor (Stratagene) entwickelt wurde, erhalten. Kurz, die aufgereinigten rekombinanten Lambda-Phagenbestände wurden mit XL-1-Blue-Zellen und dem filamentösen R408-Helferphagen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2X YT-Medium (1% NaCl, 1% Hefeextrakt, 1,6% Bacto-Trypton) wurde die Inkubation für 3 Stunden bei 37°C, gefolgt von 20 Minuten bei 70°C fortgesetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden filamentöse Phagenpartikel, die das pBluescript-Phagemid (mit der cDNA-Insertion) enthielten, im Überstand gewonnen. Verdünnungen des gewonnenen filamentösen Phagenbestands wurden mit XL-1-Blue gemischt und ausplattiert, um Kolonien zu erhalten, die pBluescript-Plasmide mit SERA-cDNA-Insertionen enthalten.

4. Herstellung von Malaria-cDNA durch PCR.

[0349] Durch die Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der 5'-Teil der codierenden Sequenz von SERA mit spezifischen Oligonucleotidprimern und dem ersten Strang der cDNA als Matrize amplifiziert (Saiki et al., 1988, Frohman et al., 1988). Ein SERA-spezifischer erster Strang der cDNA wurde durch reverse Transkriptase unter Verwendung der oben beschriebenen Reaktionsbedingungen und spezifischen Oligonucleotiden als Primer synthetisiert. RNA wurde in der Folge durch Behandlung mit RNase-A vor der PCR eliminiert. Der GenAmp-DNA Amplifizierungs-Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT.) wurde für die PCR verwendet. Kurz, der erste Strang der cDNA in 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% Gelatine wurde mit 200 µM eines jeden dNTPs, 1 µM eines jeden Primers und 2,5 Einheiten Taq-Polymerase gemischt. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Perkin Elmer Cetus) mit 1 Zyklus von Denaturierung, Annealing und Extension bei 94°C für 2 Minuten, 43°C für 3 Minuten und 72°C für 40 Minuten; 40 Zyklen bei 94°C für 1 Minute, 43°C für 2 Minuten und 72°C für 4 Minuten, gefolgt von einer endgültigen Extension von 72°C für 20 Minuten aufgearbeitet.

[0350] Der Einbau von Restriktionsstellen in die Primer, die für die PCR verwendet wurden, ermöglichte das Clonieren von amplifizierter SERA-cDNA in die Plasmidvektoren. Clone, die cDNAs enthielten, die von zwei unabhängigen PCRs abgeleitet wurden, wurden für jede SERA-cDNA erhalten, die amplifiziert wurde, um Taq-Polymerase-Fehler zu kontrollieren.

B. Ergebnisse

1. Isolierung Clonierung und Charakterisierung von SERA-cDNA.

[0351] Wir haben überlappende cDNA-Clone isoliert, die die SERA-codierende Sequenz vom FCR3-Stamm von P. falciparum umspannen. Die p126.6-cDNA, die sich von der EcoRI-Stelle an Position 1892 (Nummerierung basierend auf dem SERP I-Gen des FCBR-Stamms; Knapp et al., 1989) durch das 3'-Ende der codierenden Sequenz erstreckt, wurde von der Genbank der Blutstadium-cDNA-Lambda-ZAPII-cDNA durch Hybridisierung an ein SERA-spezifisches Oligonucleotid JAT2 (SEQ ID NR:115) (5'-GTCTCAGAACGTGTTCATGT-3') isoliert, das vom 3'-Ende der SERA-codierenden Sequenz abgeleitet ist (Bzik et al., 1989; Knapp et al., 1989). Clone, die vom 5'-Ende der SERA-codierenden Sequenz abgeleitet wurden, wurden durch PCR mit den Pri-

mern JAT15 (SEQ ID NR:116) (5'-CACGGATCCATGAAGTCATATATTTCCTT-3') und JAT16 (SEQ ID NR:117) (5'-GTGAAGCTTAATCCATAATCTTCAATAATT-3') und der cDNA-Matrize des ersten Strangs von SERA (erhalten mit dem Oligonucleotidprimer JAT17 (SEQ ID NR:118) (5'-GTGAAGCTTTTATACATAACAGAAATAACA-3')) erhalten und wurden in pUC19 (New England Biolabs, Beverly, MA.) cloniert. Diese 1923 bp-cDNAs erstrecken sich vom Startcodon bis zu einem Punkt, der 31 bp 3' der internen EcoRI-Stelle liegt (Position 1892). Durch DNA-Sequenzanalyse wurde gefunden, dass eine solche cDNA, p126.8, einen Taq-Polymerase-Fehler bei Nucleotid 1357 enthält. Dieser Fehler, eine A-zu-G-Substitution, befindet sich innerhalb des 315 bp-KpnI/NdeI-Restriktionsfragments. Eine zweite SERA-5'-cDNA, p126.9, hat keine Mutationen innerhalb dieses KpnI/NdeI-Fragments. Eine nicht-mutierte 5'-SERA-cDNA wurde durch Ersetzen des 315 bp KpnI/NdeI-Fragments in p126.8 mit dem analogen Fragment von p126.9 hergestellt, um p126.14 herzustellen. Volllängen-SERA-cDNA wurde durch Ligieren der p126.14-5'-cDNA als ein XmaI/EcoRI-Fragment in ein teilweise EcoRI/XmaI-verdautes p126.6-Vektorfragment hergestellt, um p126.15 herzustellen.

[0352] Die vollständige Nucleotidsequenz der p126.15-SERA-cDNA-Insertion wurde bestimmt und ist in den **Fig. 21A** und **Fig. 21B** (SEQ ID NR:119) zusammen mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz (SEQ ID NR:120) gezeigt. Diese cDNA enthält einen 2955 bp-offenen Leserahmen, der 984 Aminosäuren codiert und identisch zu dem SERA-Allel II-Gen im FCR3-Stamm und dem FCBR-SERP I-Gen ist (Li et al., 1989, Knapp et al., 1989).

[0353] Die SERA-cDNA wurde von p126.15 als ein 3 Kb-XmaI/EcoRV-Fragment isoliert und das XmaI-Ende in ein XmaI/BglII-verdautes pCOPCS-5H-Vektorfragment ligiert. Ein DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment wurde verwendet, um die pCOPCS-5H-BglII-Stelle zu füllen, die daraufhin an das EcoRV-Ende ligiert wurde, um p126.16 herzustellen. In diesem Plasmid ist SERA unter der Kontrolle des frühen/späten Vaccinia-H6-Promotors.

2. Modifizierung der SERA-cDNA.

[0354] Das 3'-Ende der SERA-cDNA wurde modifiziert, um ein frühes Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal (T_5NT; Yuen und Moss, 1987) und eine Reihe von Restriktionsstellen (XhoI, SmaI, SacI) unmittelbar nach dem TAA-Stoppcodon zu platzieren. Dies wurde durch PCR mit den Oligonucleotiden JAT51 (DEQ ID NO:121) (5'-TAGAATCTGCAGGAACTTCAA-3'), JAT52 (SEQ ID NO:122) (5'-CTACACGAGCTCCCGGGCTCGAGATAAAAATTATACATAACAGAAATAACATTC-3') und dem Plasmid p126.16 als Matrize erreicht. Das resultierende ~300 bp amplifizierte Fragment wurde als ein PstI/SacI-Fragment in p126.16 amplifiziert, das mit PstI und SacI verdaut wurde, um p126.17 herzustellen.

[0355] Das 5'-Ende der SERA-cDNA in p126.17 wurde modifiziert, um einige Restriktionsstellen (HindIII, SmaI, BamHI) und den 42K-Entomopocken-Promotor vor das ATG-Startcodon zu platzieren. Dies wurde durch PCR mit den Oligonucleotiden JAT53 (SEQ ID NR:123) (5'-CTAGAGAAGCTTCCCGGGATCCTCAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGAAGT-CATATATTTCCTTGT-3'), JAT54 (SEQ ID NO:124) (5'-ACTTCCGGGTTGACTTGCT-3') und Plasmid p126.16 als Matrize erreicht. Das resultierende amplifizierte 250 bp-Fragment wurde als ein HindIII/HindII-Fragment in p126.17 amplifiziert, das mit HindIII und HindII verdaut wurde, um p126.18 herzustellen. Dieses Plasmid enthält eine Kassette, die aus der SERA-cDNA, die von den 42K-Entomopocken-Promotor gesteuert wird, mit einem frühen Vaccinia-Transkriptions-Stoppsignal und flankiert von den Restriktionsstellen an den 5'- (HindIII, SmaI, BamHI) und 3' (XhoI, SmaI, SacI)-Enden besteht.

[0356] Die 42K-Promotor/SERA-Kassette wurde von p126.18 als ein BamHI/XhoI-Fragment isoliert und in ein BamHI/XhoI-verdautes pSD553-Vektorfragment cloniert. Das resultierende Plasmid wird als p126.ATI bezeichnet.

3. Herstellung von p126.C3.

[0357] Die 42K/SERA-Expressionskassette wurde von p126.ATI als ein BamHI/XhoI-Fragment isoliert und in ein BamHI/XhoI-verdautes VQCP3L-Vektorfragment cloniert. Das resultierende Plasmid, bezeichnet als p126.C3, ist ein ALVAC-C3-Donorplasmid.

4. Erzeugung von pSD553.

[0358] Das pSD553-Vaccinia-Donorplasmid wurde für die Herstellung von p126.ATI verwendet. Es enthält das Vaccinia-K1L Gen aus dem Wirtsbereich (Gillard et al., 1986) innerhalb von flankierenden Copenha-

gen-Vaccinia-Armen, was die ATI-Region (ORFs A25L, A26L; Goebel et al., 1990a, b) ersetzt. pSD553 wurde wie folgt konstruiert.

[0359] Die linken und rechten Vaccinia-flankierenden Arme wurden durch PCR unter Verwendung von pSD414, einem pUC8-basierenden Clon von Vaccinia-SalI B (Goebel et al., 1990a, b), als Matrize konstruiert. Der linke Arm wurde unter Verwendung der synthetischen Desoxyoligonucleotide MPSYN267 (SEQ ID NR:85) (5'-GGGCTGAAGCTTGCTGGCCGCTCATTAGACAAGCGAATGAGGGAC-3') und MPSYN268 (SEQ ID NO:86) (5'-AGA TCT CCC GGG CTC GAG TAA TTA ATT AAT TTT TAT TAC ACC AGA AAA GAC GGC TTG AGA TC-3') als Primer synthetisiert. Der rechte Arm wurde unter Verwendung der synthetischen Desoxyoligonucleotide MPSYN269 (SEQ ID NR:87) (5'-TAA TTA CTC GAG CCC GGG AGA TCT AAT TTA ATT TAA TTT ATA TAA CTC ATT TTT TGA ATA TAC T-3') und MPSYN270 (SEQ ID NO:88) (5'-TAT CTC GAA TTC CCG CGG CTT TAA ATG GAC GGA ACT CTT TTC CCC-3') als Primer synthetisiert. Die zwei PCR-abgeleiteten DNA-Fragmente, die die linken und rechten Arme enthalten, wurden in einer weiteren PCR-Reaktion kombiniert. Das resultierende Produkt wurde mit EcoRI/HindIII geschnitten und ein 0,9 kb-Fragment isoliert. Das 0,9 kb-Fragment wurde mit pUC8 ligiert, das mit EcoRI/HindIII geschnitten wurde, was in Plasmid pSD541 resultierte. Die Polylinker-Region, die am Vaccinia-Deletionslokus lokalisiert war, wurde wie folgt expandiert. pSD541 wurde mit BglII/XhoI geschnitten und mit den durch Annealing angelagerten komplementären synthetischen Desoxyoligonucleotiden MPSYN333 (SEQ ID NR:125) (5'-GAT CTT TTG TTA ACA AAA ACT AAT CAG CTA TCG CGA ATC GAT TCC CGG GGG ATC CGG TAC CC-3')/MPSYN334 (SEQ ID NO:126) (5'-TCG AGG GTA CCG GAT CCC CCG GGA ATC GAT TCG CGA TAG CTG ATT AGT TTT TGT TAA CAA AA-3') ligiert, was Plasmid pSD552 herstellte. Das K1L-Wirtsbereichsgen wurde als ein 1 kb BglII (teilweise)/HpaI-Fragment von Plasmid pSD452 (Perkus et al., 1990) isoliert. pSD552 wurde mit BglII/HpaI geschnitten und mit dem K1L-enthaltenden Fragment ligiert, was pSD553 herstellte.

5. Erzeugung von VQCP3L.

[0360] Das VQCP3L-ALVAC-Donorplamid wurde für die Herstellung von p126.C3 verwendet und wurde wie folgt konstruiert. Das Insertionsplasmid VQCP3L wurde wie folgt abgeleitet. Ein 8,5 kb-Kanarienpocken-BglII-Fragment wurde in die BamHI-Stelle des pBS-SK-Plasmidvektors cloniert, um pWW5 zu bilden. Nucleotid-Sequenzanalyse eines subgenomischen 7351 bp-Fragments von ALVAC, das die C3-Insertionsstelle enthält, ist in den **Fig. 14A** bis **Fig. 14C** (SEQ ID NR:127) dargestellt. Der C3-ORF ist zwischen den Nucleotiden 1458 bis 2897 lokalisiert. Um ein Donorplasmid für die Insertion von fremden Genen in den C3-Lokus mit dem vollständigen Ausschneiden des C3-offenen Leserahmens zu konstruieren, wurden PCR-Primer verwendet, um die 5'- und 3'-Sequenzen relativ zu C3 zu amplifizieren. Die Primer für die 5'-Sequenz waren RG277 (SEQ ID NR:128) (5'-CAGTTGGTACCACTGGTATTTTATTTCAG-3') und RG278 (SEQ ID NO:129) (5'-TATCTGAATTCCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCAAATGTGAGTTAATATTAG-3'). Die Primer für die 3'-Sequenzen waren RG279 (SEQ ID NR:130) (5' TCGCTGAATTCGATATCAAGCTTATCGATTTTTATGACTAGTTAATCAAATAAAAAGCATACAAGC-3') und RG280 (SEQ ID NO:131) (5'-TTATCGAGCTCTGTAACATCAGTATCTAAC-3').

[0361] Die Primer wurden gestaltet, um eine multiple Clonierungsstelle, flankiert von Vaccinia-Transkriptions- und -Translations-Stoppsignalen einzuschließen. Geeignete Restriktionsstellen (Asp718 und EcoRI für den linken Arm und EcoRI und SacI für den rechten Arm), die es den zwei Armen ermöglicht, in den Asp718/SacI-verdauten pBS-SK-Plasmidvektor zu ligieren, waren auch am 5'-Ende und 3'-Ende des linken Arms und des rechten Arms eingeschlossen. Das resultierende Plasmid wurde als pC31 bezeichnet. Ein 908 bp-Fragment von Kanarienpocken-DNA unmittelbar stromaufwärts des C3-Lokus wurde durch Verdau von Plasmid pWW5 mit NisI und SspI erhalten. Ein 604 bp-Fragment von Kanarienpocken und DNA wurde durch PCR unter Verwendung von Plasmid pWW5 als Matrize und der Oligonucleotide CP16 (SEQ ID NR:132) (5'-TCCGGTACCGCGGCCGCAGATATTTGTTAGCTTCTGC-3') und CP17 (SEQ ID NO:133) (5'-TCGCTCGAGTAGGATACCTACCTACTACCTACG-3') abgeleitet. Das 604 bp-Fragment wurde mit Asp718 und XhoI verdaut (die Stellen sind an den 5'-Enden der Oligonucleotide CP16 beziehungsweise CP17 vorhanden) und in Asp718-XhoI-verdautes und mit alkalischer Phosphatase behandeltes IBI25 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT) cloniert, was Plasmid SPC3LA erzeugte. SPC3LA wurde innerhalb von IBI25 mit EcoRV und innerhalb der Kanarienpocken-DNA mit NsiI verdaut und an das 908 bp-NsiI-SspI-Fragment ligiert, was SPCPLAX erzeugte, das 1444 bp der Kanarienpocken-DNA stromaufwärts des C3-Lokus enthält. Ein 2178 bp-BglII-StyI-Fragment der Kanarienpocken-DNA wurde von den Plasmiden pXX4 (das ein 6,5 kb-NsiI-Fragment von Kanarienpocken-DNA enthält, die in die PstI-Stelle von pBS-SK cloniert wurde) isoliert. Ein 279 bp-Fragment von Kanarienpocken-DNA wurde durch PCR unter Verwendung von Plasmid pXX4 als Matrize und der Oligonucleotide CP19 (SEQ ID NR:134) (5'-TCGCTCGAGCTTTCTTGACAATAACATAG-3') und CP20 (SEQ ID NO:135) (5'-TAGGAGCTCTTTATACTACTGGGTTACAAC-3') isoliert. Das 279 bp-Fragment wurde

mit XhoI und SacI verdaut (die Stellen sind an den 5'-Enden der Oligonucleotide CP19 beziehungsweise CP20 vorhanden) und in SacI-XhoI-verdautes und mit alkalischer Phosphatase behandeltes IBI25 cloniert, was das Plasmid SPC3RA erzeugte. Um zusätzliche einmalige Stellen zu dem Polylinker hinzuzufügen, wurde pC3I innerhalb der Polylinker-Region mit EcoRI und ClaI verdaut, mit alkalischer Phosphatase behandelt und an die mit Kinase behandelten und durch Annealing angelagerten Oligonucleotide CP12 (SEQ ID NR:136) (5'-AATTCCTCGAGGGATCC-3') und CP13 (SEQ ID NO:137) (5'-CGGGATCCCTCGAGG-3') (enthaltend ein klebendes EcoRI-Ende, eine XhoI-Stelle, eine BamHI-Stelle und ein klebendes Ende, das mit ClaI kompatibel ist) ligiert, was Plasmid SPCP3S erzeugte. SPCP3S wurde innerhalb der Kanarienpocken-Sequenzen stromabwärts des C3-Lokus mit StyI und SacI (pBS-SK) verdaut und an ein 261 bp-BglII-SacI-Fragment von SPC3RA und das 2178 bp-BglII-StyI-Fragment von pXX4 ligiert, was Plasmid CPRAL herstellte, das 2572 bp von Kanarienpocken-DNA stromabwärts des C3-Lokus enthält. SPCP3S wurde innerhalb der Kanarienpocken-Sequenzen stromaufwärts des C3-Lokus mit Asp718 (in pBS-SK) und AccI verdaut und an ein 1436 bp-Asp718-AccI-Fragment von SPCPLAX ligiert, was Plasmid CPLAL herstellte, das 1457 bp von Kanarienpocken-DNA stromaufwärts des C3-Lokus enthält. Das abgeleitete Plasmid wurde als SPCP3L bezeichnet. VQCP3L wurde von pSPCP3L durch Verdau mit XmaI, Phosphatase-Behandlung des linearisierten Plasmids und Ligierung an die durch Annealing angelagerten, mit Kinase behandelten Oligonucleotide CP23 (SEQ ID NR:138) (5'-CCGGTTAATTAATTAGTTATTAGACAAGGTGAAAACGAAACTATTTGTAGCTTAATTAATTAGGTCACC-3') und CP24 (SEQ ID NO:139) (5'-CCGGGGTCGACCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTCGTTTTCACCTTGTCAATAACTAATTAATTAA-3') abgeleitet.

[0362] DNA-Sequenzanalyse von pH6.CEA.C3 zeigte eine Deletion eines Nucleotids (T) an Position 1203 der CEA-codierenden Sequenz (Eliminierung einer HindII-Stelle), die während eines vorherigen Clonierungsschritts erfolgte. Diese Deletion wurde durch Ersetzen eines 1047 Nucleotid-MscI-Fragments (das sich von Position 501 bis 1548 erstreckt) von pH6.CEA.C3 mit dem analogen, nicht mutierten MscI-Fragment von pGEM.CEA korrigiert. Das resultierende Plasmid wurde als pH6.CEA.C3.2 bezeichnet.

[0363] CEA ist in ALVAC durch Rekombination zwischen dem NotI-linearisierten pH6.CEA.C3.2-Donorplasmid und ALVAC-Rettungsvirus inseriert worden. Rekombinanten, die CEA enthalten, sind durch Plaquehybridisierung mit einer DNA-Sonde, die von der CEA-codierenden Sequenz (einem NruI/XhoI-Fragment, das die Volllängen-CEA-codierende Sequenz enthält) abgeleitet ist, identifiziert worden.

[0364] Ein NruI/XhoI-Fragment, das das 3'-Ende des H6-Promotors, gebunden an die Volllängen-CEA-codierende Sequenz, enthält, wurde von pH6.CEA.C3.2 isoliert. Dieses Fragment wurde an ein NruI/XhoI-verdautes pSPHA.H6-Vektorfragment ligiert, das vom pSD544-HA-Donorplasmid durch die Insertion eines Fragments, das den H6-Promotor enthält, abgeleitet wurde. Das resultierende Plasmid wurde als pH6.CEA.HA bezeichnet und enthält die CEA-codierende Sequenz, gebunden an den regenerierten H6-Promotor. Das pH6.CEA.HA-Donorplasmid lenkt die Insertion der H6/CEA-Expressionskassette zu der HA-Stelle von NYVAC. Die Transkription von CEA ist von links nach rechts orientiert.

[0365] Plasmid pSD544 wurde wie folgt abgeleitet. pSD456 ist ein Subclon der Copenhagen-Vaccinia-DNA, die das HA-Gen (A56R; Goebel et al., 1990a, b) und umgebende Regionen enthält. pSD456 wurde als Matrize für die Polymerasekettenreaktionen zur Synthese der linken und rechten Vaccinia-Arme, die den A56R-ORF flankieren, verwendet. Der linke Arm wurde unter Verwendung der synthetischen Oxyoligodesoxynucleotide MPSYN279 (SEQ ID NO:140) (5' CCCCCCGAATTCGTCGACGATTGTTCATGGCAAGAT 3') und MPSYN280 (SEQ ID NO:141) (5'-CCCGGGGGATCCCTCGAGGGTACCAAGCTTAATTAATTAAATATTAGTATAAAAAGTGATTTATTTTT-3') als Primer synthetisiert. Der rechte Arm wurde unter Verwendung von MPSYN281 (SEQ ID NR:142) (5'-AAGCTTGGTACCCTCGAGGGATCCCCCGGGTAGCTAGCTAATTTTTCTTTTACGTATTATATATGTAATAAACGTTC-3') und MPSYN312 (SEQ ID NO:143 (5'-TTTTTTCTGCAGGTAAGTATTTTTAAAACTTCTAACACC-3') als Primer synthetisiert. Gel-aufgereinigte PCR-Fragmente für die linken und rechten Arme wurde in einer weiteren PCR-Reaktion kombiniert. Das resultierende Produkt wurde mit EcoRI/HindIII geschnitten. Das resultierende 0,9 kb-Fragment wurde Gelaufgereinigt und in pUC8 ligiert, der mit EcoRI/HindIII geschnitten wurde, was in Plasmid pSD544 resultierte. Die **Fig. 22** und **Fig. 23** zeigen die Nucleotidsequenzen der H6/CEA-Expressionskassetten und der flankierenden Regionen in den Plasmiden pH6.CEA.C3.2 beziehungsweise pH6.CEA.HA (SEQ ID NR:144 beziehungsweise 145). In **Fig. 22** beginnt der H6-Promotor bei Position 57. Das CEA-Startcodon beginnt bei Position 181, und das Stoppcodon endet bei Position 2289. Positionen 1 bis 58 und 2290 bis 2434 flankieren die H6/CEA-Expressionskassette. In **Fig. 23** beginnt der H6-Promotor bei Position 60. Das CEA-Startcodon beginnt bei Position 184, und das Stoppcodon endet bei Position 2292. Positionen 1 bis 59 und 2293 bis 2349 flankieren die H6/CEA-Expressionskassette.

Bezugsbeispiel 11 – MURINES IL-2 IN ALVAC UND NYVAC

Insertion von murinem IL-2 in ALVAC.

[0366] Das Plasmid pmut-1 (ATCC Nr. 37553) enthält das murine IL-2-Gen von der American Type Culture Collection, Rockville, MD. Das IL-2-Gen wurde unter die Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors (Perkus et al., 1989) platziert, und das nicht codierende 3'-Ende von IL-2 wurde auf folgende Weise entfernt.

[0367] Die Matrize pRW825, die den H6-Promotor und ein nicht-geeignetes Gen enthält, wurde in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Primern MM104 (SEQ ID NR:146) 5' ATCATCGGATCCCTGCAGCCCGGGTTAATTAATTAGTGATAC 3' und MM105 (SEQ ID NO:147) 5' GAGCTGCATGCTGTACATTACGATACAAACTTAACGGA 3' verwendet. Das 5'-Ende von MM104 enthält BamHI-, PstI- und SmaI-Stellen, gefolgt von einer Sequenz, die vom 5'-Ende des H6-Promotors in Richtung zum 3'-Ende primt. Das 5'-Ende von MM105 überlappt das 5'-Ende von IL-2, und MM105 primt vom 3'-Ende des H6-Promotors in Richtung zum 5'-Ende. Das resultierende 228 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment enthält die H6-gesteuerten am äußeren Ende 5'-gelegenen Basenpaare von IL-2.

[0368] Das Matrizen-Plasmid pmut-1 wurde in einer zweiten PCR mit den Primern MM106 (SEQ ID NR:148) 5' CGTTAAGTTTGTATCGTAATGTACAGCATGCAGCTG 3' und MM107 (SEQ ID NO:149) 5' GAGGAGGAATTCCCCGGGTTATTGAGGGCTTGTTGAGA 3' verwendet. Das 5'-Ende von MM106 überlappt das 3'-Ende des H6-Promotors und primt vom 5'-Ende von IL-2 in Richtung zum 3'-Ende. Das 5'-Ende von MM107 enthält EcoRI- und SmaI-Stellen, gefolgt von einer Sequenz, die vom 3'-Ende von IL-2 in Richtung zum 5'-Ende primt. Das resultierende 546 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment wurde mit dem obigen 228 Basenpaar PCR-Produkt gepoolt und mit MM104 und MM107 geprimt. Das resultierende 739 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment, das das H6-gesteuerte IL-2-Gen enthält, wurde mit BamHI und EcoRI verdaut, was ein 725 Basenpaar-Fragment für die Insertion zwischen die BamHI- und EcoRI-Stellen von pBS-SK (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) herstellte, was pMM151 ergab.

[0369] Das 755 Basenpaar-pMM151-BamHI-XhoI-Fragment, das das H6-gesteuerte IL-2-Gen enthält, wurde zwischen die BamHI- und XhoI-Stellen des C3-Vektors pCP3LSA-2 inseriert. Das resultierende Plasmid pMM153 enthält das H6-gesteuerte IL-2-Gen im C3-Lokus.

[0370] Die Nucleotidsequenz des murinen IL-2 vom Translations-Startcodon bis zum Stoppcodon ist in Fig. 24 angegeben (SEQ ID NR:150).

[0371] Das C3-Vektorplasmid pCP3LSA-2 wurde auf folgende Weise abgeleitet. Plasmid SPCP3L (Beispiel 17) wurde mit NsiI und NotI verdaut und ein 6433 bp-Fragment isoliert und an die durch Annealing angelagerten Oligonucleotide CP34 (SEQ ID NR:151) 5' GGCCGCGTCGACATGCA 3' und CP35 (SEQ ID NR:152) 5' TGTCGACGC 3' ligiert, was Plasmid pCP3LSA-2 herstellte.

[0372] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM153 und ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP275 her, das das Vaccinia-H6-gesteuerte murine IL-2-Gen im C3-Lokus enthält.

Insertion von murinem IL-2 in NYVAC.

[0373] Das oben definierte Plasmid pMM151 wurde mit BamHI/XhoI verdaut, und ein 755 Basenpaar-Fragment, das das H6-gesteuerte IL-2-Gen enthält, wurde isoliert. Dieses BamHI/XhoI-Fragment wurde zwischen die BamHI- und XhoI-Stellen des NYVAC-TK-Vektors pSD542 inseriert. Das resultierende Plasmid pMM154 enthält das H6-gesteuerte IL-2-Gen im TK-Lokus.

[0374] Plasmid pSD542 wurde auf folgende Weise abgeleitet. Um die Polylinker-Region zu modifizieren, wurde das TK-Vektorplasmid pSD513 (Beispiel 7) mit PstI/BamHI geschnitten und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN288 (SEQ ID NR:153) 5' GGTCGACGGATCCT 3' und MPSYN289 (SEQ ID NR:154) 5'GATCAGGATCCGTCGACCTGCA 3' ligiert, was in Plasmid pSD542 resultierte.

[0375] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM154 und NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1239 her, das das H6-gesteuerte murine IL-2-Gen im TK-Lokus enthält.

Expression von murinem IL-2 in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten.

ELISA-Assay.

[0376] Der Spiegel der Expression von murinem IL-2, das durch die ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vCP275 und vP1239 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines ELISA-Kits von Genzyme Corporation, Cambridge, MA. (InterTest-2X™ Maus-IL-2-ELISA-Kit, Genzyme Corporation Code # 2122-01) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von Maus-L-929-Zellen enthielten (2 × 10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP275 oder vP1239 infiziert, das murines IL-2 exprimiert, oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von murinem IL-2 unter Verwendung des InterTest-2X™ Maus-IL-2-ELISA-Kits, wie vom Hersteller (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) vorgegeben, getestet. Der InterTest-2X™ Maus-IL-2-ELISA-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurden subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Die Menge an sezerniertem murinen IL-2 ist als pg/ml ausgedrückt, was äquivalent zu pg/10^6 Zellen ist (Tabelle 23).

Tabelle 23

Rekombinantes Virus	Sezerniertes murines IL-2
vCP275	160 pg/ml
vP1239	371 pg/ml

Bezugsbeispiel 12 – MENSCHLICHES IL-2 IN ALVAC UND NYVAC

Insertion von menschlichem IL-2 in ALVAC.

[0377] Das Plasmid pTCGF-11 (ATCC Nr. 39673) enthält das menschliche IL-2-Gen von der American Type Culture Collection, Rockville, MD. Das IL-2-Gen wurde unter die Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors (Perkus et al., 1989) platziert, zwei Codons wurden korrigiert, und das nicht-codierende 3'-Ende von IL-2 wurde auf folgende Weise entfernt.

[0378] Das Matrizenplasmid pRW825, das den H6-Promotor und ein nicht geeignetes Gen enthält, wurde in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Primern MM104 (SEQ ID NR:146) 5' ATCATCGGATCCCTGCAGCCCGGGTTAATTAATAGTGATAC 3' und MM109 (SEQ ID NO:255) 5' GAGTTGCATCCTGTACATTACGATACAAACTTAACGGA 3' verwendet. Das 5'-Ende von MM104 enthält BamHI-, PstI- und SmaI-Stellen, gefolgt von einer Sequenz, die vom 5'-Ende des Vaccinia-H6-Promotors in Richtung zum 3'-Ende primt. Das 5'-Ende von MM109 überlappt das 5'-Ende von IL-2, und MM105 primt vom 3'-Ende des H6-Promotors in Richtung zum 5'-Ende. Das resultierende 230 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment enthält die H6-gesteuerten, äußerst 5'-gelegenen Basenpaare von IL-2.

[0379] Das Matrizenplasmid pTCGF-11 wurde in einer PCR mit den Primern MM108 (SEQ ID NR:156) 5' CGTTAAGTTTGTATCGTAATGTACAGGATGCAACTC 3' und MM112 (SEQ ID NO:157) 5' TTGTAGCTGTGTTTTCTTTGTAGAACTTGAAGTAGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGTGC AAGACTTAGTGCAATGCAAGAC 3' verwendet. Das 5'-Ende von MM108 überlappt das 3'-Ende des H6-Promotors und primt vom 5'-Ende von IL-2 in Richtung zum 3'-Ende. MM112 primt von Position 100 in der menschlichen IL-2-Sequenz (**Fig. 25**) in Richtung zum 5'-Ende. Das resultierende 118 Basenpaar-Fragment enthält die äußerst 3'-gelegenen Basenpaare des H6-Promotors und 5' 100 bp des IL-2-Gens.

[0380] Plasmid pTCGF-11 von der American Type Culture Collection wurde sequenziert, und die Sequenz wurde mit der publizierten Sequenz (Clark et al., 1984) verglichen. Zwei Mutationen, die in Aminosäure-Änderungen resultierten, wurden entdeckt. Die Oligonucleotidprimer MM111 (SEQ ID NR:158) 5' TTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTTCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTAC 3' und MM112 wurden verwendet, um diese zwei Basenänderungen in pTCGF-11 zu korrigieren.

[0381] Die korrigierte Nucleotidsequenz von menschlichem IL-2 vom Translations-Startcodon bis zum Stoppcodon ist in **Fig. 25** (SEQ ID NR:159) angegeben.

[0382] Mit Ausnahme einer stummen G-zu-T-Änderung in pTCGF-11 bei Position 114 ist die Sequenz in

Fig. 25 die selbe wie die IL-2-Sequenz, die in Clark et al., 1984 beschrieben wurde. Das T an Position 41 in der Sequenz in Fig. 25 ist ein C in pTCGF-11, und die Codonänderung ist von leu zu pro. Das T an Position 134 in der Sequenz in Fig. 25 ist ein C in pTCGF-11, und die Codonänderung ist von leu zu ser. Die vorausgesagten Aminosäuresequenzen von anderen menschlichen, bovinen, murinen, ovinen und porcinen IL-2-Isolaten wurden mit der Sequenz in Clark et al., 1984 verglichen; die Codons an den Positionen 41 und 134 sind beide als leu konserviert.

[0383] Die Matrize pTCGF-11 wurde in einer PCR mit den Primern MM110 (SEQ ID NR:160) 5' GAGGAGGAATTCCCCGGGTCAAGTCAGTGTTGAGATGA 3' und MM111 verwendet. Das 5'-Ende von MM110 enthält EcoRI- und SmaI-Stellen, gefolgt von einer Sequenz, die vom 3'-Ende von IL-2 in Richtung zum 5'-Ende primt. MM111 primt von Position 75 in Richtung zum 3'-Ende von IL-2. Das resultierende 400 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment wurde mit den obigen 230 und 118 Basenpaar PCR-Produkten gepoolt und mit MM104 und MM110 geprimt. Das resultierende 680 Basenpaar PCR-abgeleitete Fragment, das das Vaccinia-H6-gesteuerte IL-2-Gen enthält, wurde mit BamHI und EcoRI verdaut und zwischen die BamHI- und EcoRI-Stellen von pBS-SK (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) inseriert, was pRW956 ergab.

[0384] Plasmid pRW956 wurde mit BamHI/XhoI verdaut, und ein 700 bp-Fragment, das das H6-gesteuerte IL-2-Gen enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde zwischen die BamHI- und XhoI-Stellen des C3-Vektorplasmids pCP3LSA-2 (Beispiel 18) inseriert. Das resultierende Plasmid pRW958 enthält das H6-gesteuerte IL-2-Gen im C3-Lokus.

[0385] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pRW958 und dem ALVAC-Rettungsvirus erzeugte das rekombinante Virus vCP277, das das H6-gesteuerte menschliche IL-2-Gen im C3-Lokus enthält.

Insertion des menschlichen IL-2 in NYVAC.

[0386] Das oben definierte Plasmid pRW956 wurde mit BamHI/XhoI verdaut, und ein 700 Basenpaar-Fragment wurde isoliert. Dieses Fragment, das das Vaccinia-H6-gesteuerte menschliche IL-2-Gen enthält, wurde zwischen die BamHI- und XhoI-Stellen von NYVAC-TK-Vektorplasmid pSD542 (Beispiel 18) inseriert. Das resultierende Plasmid pRW957 enthält das H6-gesteuerte menschliche IL-2-Gen im TK-Lokus.

[0387] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pRW957 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1241 her, das das H6-gesteuerte menschliche IL-2-Gen im TK-Lokus enthält

Expression von menschlichem IL-2 in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten. ELISA-Assay.

[0388] Der Spiegel der Expression von menschlichem IL-2, das durch die ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vCP277 und vP1241 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines menschlichen Interleukin-2 ELISA-Kits von Collaborative Biomedical Products, Inc., Becton Dickinson, Bedford, MA. (IL-ISA 2™ Kat. Nr. 30020) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von menschlichen HeLa-Zellen enthielten (2×10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP277 oder vP1241 infiziert, das menschliches IL-2 exprimiert, oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von menschlichem IL-2 unter Verwendung des IL-ISA 2™ ELISA-Kits für menschliches Interleukin-2, wie vom Hersteller (Collaborative Biomedical Products, Inc., Becton Dickinson, Bedford, MA) vorgegeben, getestet. Der IL-ISA 2™-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Der Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurde subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Der IL-ISA 2™ KitIL-2 quantifiziert menschliches IL-2 in Biological Response Modifiers Program (BRMP)-Einheiten (Gerrard et al., 1993). Die Menge an sezerniertem menschlichen IL-2 ist als BRMP E/ml ausgedrückt, was äquivalent zu BRMP E/10^6 Zellen ist (Tabelle 24).

Tabelle 24

Rekombinantes Virus	Sezerniertes menschliches IL-2
vCP277	850 BRMP E/ml
vP1241	953 BRMP E/ml

Bezugsbeispiel 13 – MURINES IFNγ IN ALVAC UND NYVAC

Insertion von murinem IFNγ in ALVAC.

[0389] Plasmid pms10 wurde von ATCC (#63170) erhalten. Plasmid pms 10 enthält cDNA, die die gesamte Maus-IFNγ-codierende Sequenz mit der flankierenden Region, cloniert in die PstI-Stelle von pBR322, umspannt.

[0390] Plasmid pMPI3H enthält den Vaccinia-I3L-Promotor (Perkus et al., 1985; Schmitt und Stunnenberg, 1988) in pUC8. Plasmid pMPI3H ist für die Spaltung an einer HpaI-Stelle innerhalb des Promotors und an einer Stelle in der stromabwärtsliegenden Polylinker-Region gebildet, um das stromabwärts-Hinzufügen des 3'-Endes des I3L-Promotors, gebunden an ein fremdes Gen, zu ermöglichen.

Verknüpfung des murinen IFNγ-Gens mit dem I3L-Promotors; Konstruktion von pMPI3mIF.

[0391] Murine IFNγ-codierenden Sequenzen mit Bindung an den I3L-Promotor wurden durch PCR unter Verwendung der Oligonucleotide MPSYN607 (SEQ ID NR:161) 5' TAATCATGAACGCTACACACTGC 3' und MPSYN608 (SEQ ID NO:162 5' CCCGGATCCCTGCAGTTATTGGGACAATCTCTT 3' als Primer und Plasmid pms 10 als Matrize synthetisiert. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI geschnitten, und ein 510 bp-Fragment wurde isoliert und mit dem Vektorplasmid pMPI3h ligiert, das mit HpaI/BamHI geschnitten wurde. Nach Bestätigung der Sequenz wurde das resultierende Plasmid als pMPI3mIF bezeichnet.

Insertion der I3L/murinen IFNγ-Kassette in den C3-Lokus; Konstruktion von pMPC3I3mIF.

[0392] Plasmid pMPI3mIF wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit BamHI geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/murine IFNγ-Kassette enthielt, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem Vektorplasmid pVQC3LSA-3 ligiert, das mit SmaI/BamHI geschnitten wurde, was im Insertionsplasmid pMPC3I3mIF resultierte.

[0393] Die Nucleotidsequenz der I3L/murinen IFNγ-Expressionskassette ist in **Fig. 26** angegeben (SEQ ID NR:163). Das Startcodon für das murine IFNγ-Gen ist bei Position 101, und das Stoppcodon ist bei Position 596.

[0394] Plasmid pVQC3LSA-3 wurde auf folgende Weise abgeleitet. Das ALVAC-C3-Lokus-Insertionsplasmid VQCP3L (Beispiel 17) wurde mit NsiI und NotI verdaut und ein 6503 bp-Fragment isoliert und an die durch Annealing angelagerten Oligonucleotide CP34 (SEQ ID NR:151) 5' GGCCGCGTCGACATGCA 3' und CP35 (SEQ ID NR:152) 5' TGTCGACGC 3' ligiert, was Plasmid VQCP3LSA-3 herstellte. (Beachte: Plasmid VQCP3LSA-3 ist identisch zu den Plasmiden VQCP3LSA-5 und VQCP3LSA, die in den folgenden Beispielen verwendet werden; siehe z.B. Beispiele 24, 25, 26.)

[0395] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMPC3I3mIF und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP271 her, das das I3L-gesteuerte murine IFNγ-Gen im C3-Lokus enthält.

Insertion von murinem IFNγ in NYVAC. Insertion der I3L/murinen IFNγ-Kassette in den TK-Lokus; Konstruktion von pMPTKI3mIF.

[0396] Das oben definierte Plasmid pMPI3mIF wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit BamHI geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/murine IFNγ-Kassette enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem NYVAC-TK-Vektorplasmid pSD542 (Beispiel 18) ligiert, das mit SmaI/BamHI geschnitten wurde, was im Insertionsplasmid pMPTKI3mIF resultierte.

[0397] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMPTKI3mIF und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1237 her, das das I3L-geförderte murine IFNγ-Gen im TK-Lokus enthält.

Expression von murinem IFNγ in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten.

ELISA-Assay.

[0398] Der Spiegel der Expression von murinem IFNγ, das durch die ALVAC- und NYVAC-basierenden Re-

kombinanten vCP271 und vP1237 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines ELISA-Kits von Genzyme Corporation, Cambridge, MA. (InterTest-γ Kit, Genzyme Corporation, Kat. # 1557-00) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von Maus-L-929-Zellen enthielten (2 × 10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP271 oder vP1237 infiziert, das murines IFNγ exprimiert, oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von murinem IFNγ unter Verwendung des InterTest-γ Kits, wie vom Hersteller (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) vorgegeben, getestet. Der InterTest-γ-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Der Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurde subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Die Menge an sezerniertem murinen IFNγ wird als Nanogramm/ml ausgedrückt, was äquivalent zu ng/10^6 Zellen ist (Tabelle 25).

Tabelle 25

Rekombinantes Virus	Sezerniertes murines IFNγ
vCP271	972 ng/ml
vP1237	3359 ng/ml

Biologischer Test.

[0399] Die biologische Aktivität von murinem IFNγ, das von ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten exprimiert wird, wurde unter Verwendung eines standardisierten IFNγ-Bio-Tests (Vogel et al., 1991) quantifiziert. Dieser Test quantifiziert die IFN-Aktivität durch Titrieren seiner Fähigkeit, L-929-Zellen vor VSV (vesikuläres Stomatitisvirus)-induziertem cytopathischen Effekt (CPE) zu schützen.

[0400] Konfluente Monolayer von Maus-L-929-Zellen (2 × 10^6 Zellen/Schale) wurden pseudo-infiziert oder mit NYVAC, vP1237, ALVAC oder vCP271 in einer moi von 5 infiziert. Die Schalen wurden in doppelter Ausführung beimpft. Nach dem 1 Stunden-Adsorptionszeitraum wurde 1 ml frisches Medium zu jeder Schale zugefügt, und sie wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Überstände von beiden Schalen wurden gepoolt, durch einen 0,22 µm-Filter gefiltert und auf IFN-Aktivität, wie unten ausführlich beschrieben, getestet. Zweifache Reihenverdünnungen der Überstände wurden getestet, beginnend bei unverdünnt für pseudo-infizierte, NYVAC- und ALVAC-infizierte Schalen oder 1:100 und 1:1000 für vCP271- und vP1237-infizierte Schalen.

[0401] Im IFNγ-Bio-Test wurde 50 µl Medium zu allen Schalen einer Platte mit 96 Vertiefungen zugefügt, gefolgt von 50 µl einer Reihenverdünnung eines Bestands von kommerziellem murinen IFN-γ (Genzyme Corporation, MG-IFN, Lot # B3649) oder einem Kulturüberstand, wie oben beschrieben. Als nächstes wurden 50 µl von L-929-Zellen (3 × 10^4 Zellen) zu jeder Vertiefung zugefügt, und die Platten wurden über Nacht bei 37°C platziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 100 µl VSV (moi von 0,1) infiziert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der CPE bewertet. Die Vertiefung, die den selben CPE wie VSV in der Abwesenheit von Interferon ergab, wurde definiert, dass sie 1 Einheit/ml Interferon aufweist. Dieses Verfahren deckte sich gut mit dem Interferon-Standard.

[0402] Die Interferonkonzentration in den Überständen wird als der Kehrwert der Verdünnung festgelegt, die ähnlichen CPE ergab wie der Standard bei 1 Einheit/ml Interferon. Für pseudo-infizierte, NYVAC- und ALVAC-infizierte Zellen werden weniger als 20 Einheiten/ml Interferon produziert. Für vP1237 werden 14 000 Einheiten/ml IFN-γ produziert, und für vCP271 werden 3 600 Einheiten/ml IFN-γ produziert. vP1237 produzierte vierfach größere Spiegel von IFN-γ als vCP271, was die oben gesehenen Ergebnisse durch den ELISA-Test bestätigt. Das Fehlen des Schutzes, der durch Überstände von pseudo-infizierten oder Zellen, die mit dem parentalen Virus infiziert waren, verliehen wird, zeigt, dass die schützende Aktivität in Überständen von vP1237- und vCP271-infizierten Zellen IFN-γ ist. Dies wurde durch einen Neutralisierungstest bestätigt, der zeigte, dass Antiseren gegen IFN-γ (Genzyme Corporation, monoclonales Hamster-anti-murines IFN-γ, 1222-00, Lot #B3847) aber nicht Antiseren gegen murines IFN-α/β (Lee Biomolecular Research, INC., San Diego, CA, Nr. 25301, Lot. #89011) oder murines IFN-β (Lee Biomolecular Research, Inc., Nr. 25101, Lot. #87065) in der Lage waren, die schützende Aktivität zu neutralisieren, die durch diese Rekombinanten produziert wurde.

Bezugsbeispiel 14 – MENSCHLICHES IFNγ IN ALVAC UND NYVAC

Insertion von menschlichem IFNγ in ALVAC.

[0403] Plasmid p52 wurde von ATCC (Nr. 65949) erhalten. Plasmid p52 enthält cDNA, die die Carboxy-termi-

nalen 2/3 der menschlichen IFNγ-codierenden Sequenz mit der nicht-translatierten 3'-Region codiert, die in die PstI-Stelle von pBR322 cloniert wurde.

Verknüpfung vom menschlichen IFNγ-Gen mit dem I3L-Promotor; Konstruktion von pMPI3hIF.

[0404] (A) Die fehlende Region des menschlichen IFNγ-Gens wurde unter Verwendung der langen, überlappenden PCR-Primer MPSYN615 (SEQ ID NR:164)

5'

TAATCATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTT

CTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGC 3' und MPSYN616

(SEQ ID NO:165) 5'

TTCTTCAAAATGCCTAAGAAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATCTGAATGACCTGCA

TTAAAATATTTCTTAAGGTTTTCTGCTTCTTTTACATATGGGTCCTGGC 3'

ohne fremde Matrize synthetisiert. Das Ende von MPSYN615 ist zum Clonieren in die HpaI-Stelle von pMPI3H (Beispiel 20) konstruiert. Es gibt 25 bp Überlappung zwischen MPSYN615/MPSYN616. Ein 179 bp-PCR-Produkt wurde isoliert.

[0405] (B) Der Rest des menschlichen IFNγ-Gens wurde unter Verwendung der PCR-Primer MPSYN617 (SEQ ID NR:166) 5' TCTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAG 3' und MPSYN618 (SEQ ID NO:167) 5' CCCGGATCCCTGCAGTTACTGGGATGCTCTTCGA 3' mit dem Plasmid p52 als Matrize synthetisiert. MPSYN617 hat eine 25 bp-Überlappung mit der fehlenden Region; MPSYN618 ist zum Clonieren in die stromabwärts gelegene BamHI-Stelle von pMP13H konstruiert. Ein ca. 350 bp-PCR-Fragment wurde isoliert.

[0406] (A+B) Kombinations-PCR wurde unter Verwendung der isolierten Fragmente von (A) und (B) oben und der externen Primer MPSYN615 und MPSYN618 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI verdaut, und ein ca. 510 bp-Fragment wurde isoliert. Dieses Fragment wurde in pMPI3H cloniert, das mit HpaI/BamHI geschnitten wurde.

[0407] Nach der Sequenzbestätigung wurde das resultierende Plasmid als pMPI3hIF bezeichnet. pMPI3hIF enthält das menschliche IFNγ-Gen unter der Kontrolle des I3L-Promotors.

Insertion der I3L/menschlichen IFNγ-Kassette in den C3-Lokus; Konstruktion von pMPC3I3hIF.

[0408] Plasmid pMPI3hIF wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit BamHI geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/menschliche IFNγ-Kassette enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem ALVAC-C3-Vektorplasmid pVQC3LSA-3 (Beispiel 20) ligiert, das mit SmaI/BamHI geschnitten wurde, was im ALVAC-Insertionsplasmid pMPC3I3hIF resultierte.

[0409] Die Nucleotidsequenz der I3L/menschlichen IFNγ-Expressionskassette ist in **Fig. 27** (SEQ ID NR:168) angegeben. Das Startcodon für das menschliche IFNγ-Gen ist bei Position 101, und das Stoppcodon ist bei Position 599.

[0410] Rekombination zwischen Donorplasmid pMPC3I3hIF und ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP278 her, das das I3L-gesteuerte menschliche IFNγ-Gen im C3-Lokus enthält.

Insertion von menschlichem IFNγ in NYVAC. Insertion der I3L/menschlichen IFNγ-Kassette in den TK-Lokus; Konstruktion von pMPTKI3hIF.

[0411] Das oben beschriebene Plasmid pMPI3hIF wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit BamHI geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/menschliche IFNγ-Kassette enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem NYVAC-TK-Vektorplasmid pSD542 (Beispiel 18) ligiert, das mit SmaI/BamHI geschnitten wurde, was im NYVAC-Insertionsplasmid pMPTKI3hIF resultierte.

[0412] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMPTKI3hIF und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1244 her, das das Vaccinia-I3L-gesteuerte menschliche IFNγ-Gen im TK-Lokus enthält.

Expression von menschlichem IFNγ in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten

ELISA-Test

[0413] Der Spiegel der Expression von menschlichem IFNγ, das durch die ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vCP278 und vP1244 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines menschlichen Interferon-γ ELISA-Kits von Genzyme Corporation, Cambridge, MA. (InterTest-γ™ Kit, Genzyme Corporation, Kat. # 1556-00) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von menschlichen HeLa-Zellen enthielten (2×10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP278 oder vP1244 infiziert, das menschliches IFNγ exprimiert, oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von menschlichem IFNγ unter Verwendung des InterTest-γ Kits, wie vom Hersteller (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) vorgegeben, getestet. Der InterTest-γ-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Der Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurde subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Die Menge an sezerniertem menschlichen IFNγ wird als Nanogramm/ml ausgedrückt, was äquivalent zu ng/10^6 Zellen ist (Tabelle 26).

Tabelle 26

Rekombinantes Virus	Sezerniertes menschliches IFNγ
vCP278	9 ng/ml
vP1244	15 ng/ml

Beispiel 7 – Murines IL-2 plus IFNγ in ALVAC

Insertion von murinem IFNγ in den C6-Lokus von ALVAC; Zugabe vom ALVAC-murinen IL-2-rekombinanten Virus.

Ableitung vom C6.Insertionsvektor.

[0414] Der ALVAC-C6-Insertionsvektor pC6L wurde wie folgt abgeleitet. Ein 3,0 kb-Kanarienpocken-HindIII-Fragment, das den gesamten C6-ORF enthält, wurde in die HindIII-Stelle von pBS-SK (Stratagene) cloniert, um Plasmid pC6HIII3kb zu bilden. Die Nucleotidsequenz des Kanarienpocken-Inserts in pC6HIII3kb ist in Fig. 28 (SEQ ID NR:169) gezeigt. In Fig. 28 ist der C6-ORF zwischen den Nucleotiden 377 und 2254 lokalisiert.

[0415] Die Extension der Kanarienpocken-Sequenz rechts von pC6HIII3kb wurde durch Sequenzanalyse von überlappenden Kanarienpocken-Clone erhalten. Um ein Donorplasmid für die Insertion von fremden Genen in den C6-Lokus mit dem vollständigen Ausschneiden des C6-offenen Leserahmens zu konstruieren, wurden die flankierenden 5'- und 3'-Arme durch die Verwendung von PCR-Primern und genomischer Kanarienpocken-DNA als Matrize synthetisiert. Der 380 bp-5'-flankierende Arm wurde unter Verwendung der Primer C6A1 (SEQ ID NR:170) 5' ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3' und C6B1 (SEQ ID NO:171) 5' GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCATTTTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTTAA 3' synthetisiert. Der 1155 bp-3'-flankierende Arm wurde unter Verwendung der Primer C6C1 (SEQ ID NR:172) 5' CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAACTAGTCAAATGAGTATATATAATTGAAAAAGTAA 3' und C6D1 (SEQ ID NO:173) 5' GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAACTTAAGTTG 3' synthetisiert. Die oben synthetisierten linken und rechten flankierenden Arme wurden durch PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer C6A1 und C6D1 kombiniert, was ein Volllängen-Produkt von 1613 bp herstellte. Dieses PCR-Produkt wurde nahe der Enden mit SacI/KpnI geschnitten und in pBS-SK cloniert, das mit SacI/KpnI geschnitten wurde, was das C6-Insertionsplasmid pC6L herstellte. pC6L enthält im C6-Deletionslokus eine Multiclonierungs-Region, die flankiert ist von Translations-Stoppcodons und T5NT-transkriptionalen Terminatoren (Yuen und Moss, 1986). Die Sequenz von pC6L ist in Fig. 29 (SEQ ID NR:174) dargestellt. In Fig. 29 ist die Multiclonierungs-Region zwischen Nucleotid 407 und Nucleotid 428 lokalisiert.

[0416] Die durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotide VQC (SEQ ID NR:175) 5' TTAATCAGGATCCTTAATTAATTAGTTATTAGACAAGGTGAAACGAAACTATTTGTA GCTTAATTAATTAG-CTGCAGCCCGGG 3' und VQN (SEQ ID NO:176) 5' CCCGGGCTGCAGCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTCGTTTTCACCTTGTCTAATAACTAATTAATTAAGG ATCCTGATTAA 3' wurden in pBS-SK ligiert, was in einem dazwischen liegenden Plasmid resultierte. Plasmid pMM117 enthält ein SmaI/EcoRI-Polylinker-Fragment von diesem dazwischen liegenden Plasmid, das den SmaI/EcoRI-Polylinker von pC6L ersetzt.

[0417] Plasmid pMP42GPT enthält das Escherichia coli-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (Ecogpt-Gen) (Pratt und Subramani, 1983) unter der Kontrolle eines Entomopocken-Promotors (EPV 42kDa). Die 31 bp-EPV 42 kDa-Promotorsequenz (SEQ ID NR:177), die in pMP42GPT verwendet wird, ist 5' CAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAA 3'.

Insertion der 42kDa/Ecogpt-Kassette in den C6-Lokus; Konstruktion von pMP117gpt-B.

[0418] Plasmid pMP42GPT wurde mit EcoRI geschnitten, und ein 0,7 kb-Fragment, das die 42kDa/Ecogpt-Expressionskassette enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde in das Vektorplasmid pMM117 inseriert, das mit EcoRI in beiden Richtungen geschnitten wurde, was pMP117gpt-A und pMP117gpt-B herstellte.

Insertion der I3L/murinen IFNγ-Kassette in den C6-Lokus; Konstruktion von pMPC6mIFgpt.

[0419] Plasmid pMPI3mIF (Beispiel 20) wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit PstI (teilweiser Verdau) geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/murine INFγ-Kassette enthält, wurde isoliert. Das Vektorplasmid pMP117gpt-B wurde mit SmaI (teilweiser Verdau) geschnitten, und lineare Volllängen-DNA wurde isoliert. Dies wurde mit PstI geschnitten, und das größte Fragment wurde isoliert. Vektor und die Insertions-Fragmente wurden ligiert, was im Insertionsplasmid pMPC6mIFgpt resultierte. Zusätzlich zu der I3L/murine INFγ-Expressionskassette enthält das Plasmid pMPC6mIFgpt die 42kDa/Ecogpt-Expressionskassette, um Selektion von Rekombinanten durch die Verwendung von Mycophenolsäure zu ermöglichen (Boyle und Coupar, 1988; Falkner und Moss, 1988).

[0420] Rekombination wurde zwischen dem Donorplasmid pMPC6mIFgpt und dem Rettungsvirus vCP275 (Beispiel 18) erreicht. Das rekombinante Virus wurde plaqueaufgereinigt. Das resultierende ALVAC-basierende rekombinante Virus enthält das Vaccinia-I3L-gesteuerte murine IFNγ-Gen so wie das EPV-42kDa-gesteuerte Ecogpt-Gen, beide im C6-Lokus, und das Vaccinia-H6-gesteuerte murine IL-2-Gen im C3-Lokus.

Expression von murinem IL-2 in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten: Vergleich mit Rekombinanten, die murines IL-2 und murines IFNγ co-exprimieren.

ELISA-Test.

[0421] Der Spiegel der Expression von murinem IL-2, das durch die ALVAC-basierenden Rekombinanten vCP275 und vCP288 und die NYVAC-basierenden Rekombinanten vP1239 und vP1243 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines murinen Interleukin-2 ELISA-Kits von Collaborative Biomedical Products, Inc., Becton Dickinson, Bedford, MA. (Maus-IL-2 ELISA Kit, Kat. Nr. 30032) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von murinen L929-Zellen enthielten (2×10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP275 oder vP1239, das murines IL-2 exprimiert, mit dem rekombinanten Virus vCP288 oder vP1234, das murines IL-2 und murines IFNγ co-exprimiert, infiziert oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von murinem IL-2 unter Verwendung des Maus-Interleukin-2 ELISA-Kits, wie vom Hersteller (Collaborative Biomedical Products, Inc., Becton Dickinson, Bedford, MA) vorgegeben, getestet. Der Maus-Interleukin-2 ELISA-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Der Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurde subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Der Maus-Interleukin-2 ELISA-Kit quantifiziert murines IL-2 in Biological Response Modifiers Program (BRMP)-Einheiten (Gerrard et al., 1993). Die Menge an sezerniertem murinen IL-2 wird als BRMP E/ml ausgedrückt, was äquivalent zu BRMP E/10^6 Zellen ist (Tabelle 27).

Tabelle 27

Rekombinantes Virus	Exprimierte Cytokine	Sezerniertes murines IL-2
vCP275	mIL-2	1838 BRMP E/ml
vCP288	mIL-2 + mIFNγ	2124 BRMP E/ml
vP1239	mIL-2	5030 BRMP E/ml
vP1243	mIL-2 + mIFNγ	4353 BRMP E/ml

[0422] Von den in Tabelle 27 berichteten Ergebnissen ist es offensichtlich, dass Co-Expression von murinem IFNγ den Spiegel der murinen IL-2-Expression durch ALVAC- oder NYVAC-basierende Rekombinanten nicht beeinflusst. Der Spiegel der murinen IL-2-Expression unter den Bedingungen dieses Tests ist in Übereinstimmung mit den in Tabelle 23 dargestellten Ergebnissen, die auf einem unterschiedlichen murinen IL-2 ELISA-Test basierten (Intertest-2X™, Genzyme Corporation, Cambridge, MA) auch ungefähr zweimal so hoch für NYVAC-basierende Rekombinanten als er es für ALVAC-basierende Rekombinanten ist.

Beispiel 8 – MENSCHLICHES IL-2 PLUS IFNγ IN ALVAC

Insertion von menschlichem IFNγ in den C6-Lokus von ALVAC; Zugabe zum ALVAC-menschlichen IL-2-rekombinanten Virus.

Insertion der I3L/menschlichen IFNγ-Kassette in den C6-Lokus; Konstruktion von pMPC6I3hIF.

[0423] Plasmid pMPI3hIF (Beispiel 21) wurde mit HindIII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet. Die DNA wurde dann mit BamHI geschnitten, und ein 0,6 kb-Fragment, das die I3L/menschliche IFNγ-Kassette enthält, wurde isoliert. Das ALVAC-C6-Vektorplasmid pMM117 (Beispiel 22) wurde mit BamHI (teilweise)/SmaI geschnitten, und das größte Fragment wurde isoliert. Diese Fragmente wurden ligiert, was im Insertionsplasmid pMPC6I3hIF resultierte.

[0424] Rekombination wurde zwischen Donorplasmid pMPC6I3hIF und Rettungsvirus vCP277 (Beispiel 19) erzielt. Die Rekombinanten sind plaqueaufgereinigt. Das resultierende ALVAC-basierende rekombinante Virus enthält das Vaccinia-I3L-gesteuerte menschliche IFNγ-Gen im C6-Lokus und das Vaccinia-H6-gesteuerte menschliche IL-2-Gen im C3-Lokus (vCP277+IFNγ).

Bezugsbeispiel 15 – MURINES IL-4 IN ALVAC UND NYVAC

Murines IL-4 in ALVAC.

[0425] Plasmid p2A-E3, das das murine IL-4-Gen (m IL-4) enthält, wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 37561) erhalten. Das murine IL-4-Gen wurde unter die Kontrolle des Vaccinia-E3L-Promotors durch PCR, wie unten beschrieben, platziert.

[0426] Der Vaccinia-E3L-Promotor, ein starker früher Promotor, ist unmittelbar stromaufwärts des Vaccinia-E3L-offenen Leserahmens lokalisiert (Goebel et al., 1990).

[0427] Die Nucleotidsequenz der E3L/murinen IL-4-Expressionskassette ist in Fig. 30 dargestellt (SEQ ID NR:178). In Fig. 30 ist das Startcodon des murinen IL-4-Gens bei Nucleotidposition 68, und das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 488.

[0428] Das mIL-4-Gen wurde durch PCR mit den Oligonucleotidprimern MIL45 (SEQ ID NR:179) 5'

CTCACCCGGGTACCGAATTCGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGC

TGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAAAATGGGTCTCAACCCCCAG 3' und MIL43

(SEQ ID NO:180) 5'

TTAGGGATCCAGATCTCGAGATAAAAACTACGAGTAATCCATTTGCATGATGCTC

3' und Plasmid p2A-E3 (ATCC) als Matrize amplifiziert. Das resultierende Fragment enthielt das mIL-4-Gen, gebunden an den Vaccinia E3L-Promotor und flankiert von den XmaI-/KpnI-/EcoRI- und den XhoI/BglII/BamHI-Stellen an den 5'-beziehungsweise 3'-Enden. Das amplifizierte E3L/mIL-4-Fragment wurde mit XmaI/BamHI verdaut und an ein XmaI/BamHI-verdautes pVQCP3LSA-5-Vektorfragment ligiert. Das Plasmid pVQCP3LSA-5 (das selbe wie VQCP3LSA-3, Beispiel 20) ist ein ALVAC-C3-Lokus-Insertionsplasmid. Das resultierende C3-Donorplasmid wurde als pC3.MIL4.2 bezeichnet. Eine Expressionskassette, die aus dem E. coli-gpt-Gen, gebunden an den Entomopocken-42kDa-Promotor enthält, wurde als ein SmaI-Fragment vom Plasmid pMP42GPT (Beispiel 22) isoliert, dann in ein SmaI-verdautes pC3.MIL4.2-Vektorfragment cloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pC3MIL4.gpt bezeichnet.

[0429] Die Rekombination wurde zwischen dem Donorplasmid pC3MIL4.gpt und dem ALVAC-Rettungsvirus unter Verwendung des Mycophenolsäure-Selektionssystems (Beispiel 22) erreicht. Das rekombinante Virus ist plaqueaufgereinigt. Das resultierende rekombinante Virus enthält das murine IL-4-Gen unter der Kontrolle des Vaccinia-E3L-Promotors so wie das Ecogpt-Gen unter der Kontrolle des EPV-42kDa-Promotors, beide im C3-Lokus von ALVAC.

Murines IL-4 in NYVAC.

[0430] Das mIL-4-Gen wurde durch PCR mit den Primern MIL45 (SEQ ID NR:179) und MIL43 (SEQ ID NR:180) und Plasmid p2A-E3 (ATCC) als Matrize amplifiziert. Das resultierende Fragment enthielt das mIL-4-Gen, gebunden an den Vaccinia-E3L-Promotor und flankiert von den XmaI-/KpnI-/EcoRI- und den XhoI-/BglII/BamHI-Stellen an den 5'- beziehungsweise 3'-Enden. Das amplifizierte E3L/mIL-4-Fragment wurde mit XmaI/BamHI verdaut. Das NYVAC-TK-Insertionsplasmid pSD542 (Beispiel 18) wurde mit XmaI/BamHI verdaut und an das XmaI/BamHI-verdaute PCR-Fragment ligiert. Das resultierende TK-Donorplasmid wurde als pTK-mIL4 bezeichnet.

[0431] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pTK-mIL4 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1248 her, das das Vaccinia-E3L-gesteuerte murine IL-4-Gen im TK-Lokus enthält.

Bezugsbeispiel 16 – MENSCHLICHES IL-4 IN ALVAC UND NYVAC

Menschliches IL-4 in ALVAC.

[0432] Plasmid pcD-hIL-4, das das menschliche IL-4-Gen enthält, wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 57593) erhalten.

[0433] Das PCR-Fragment PCRhIL4-I wurde unter Verwendung von Plasmid pcD-hIL-4 als Matrizen-DNA und der synthetischen Oligonucleotide E3LIL4-C (SEQ ID NR:181) 5' GCTGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAAAATGGGTCTCACCTCCCAACT6 3' und E3LYL4-D (SEQ ID NO:182) 5' ATCATCTCTAGAATAAAAATCAGCTCGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCATG 3' als Primer synthetisiert.

[0434] Die Oligonucleotide E3LIL4-A (SEQ ID NR:183) 5' ATCATCAAGCTTGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGT-TAGTTCTCTCTAAAA 3' und E3LIL4-B (SEQ ID NO:184) 5' TTTTAGAGAGAACTAACACAACCAGCAATAAAACTGAACCTACTTTATCATTTTTTTATTC 3' wurden durch Annealing angelagert, um Fragment II herzustellen, das die Vaccinia-E3L-Promotorsequenz (Beispiel 24) enthält.

[0435] Ein zweites Fursions-PCR-Produkt (PCRhIL4-II) wurde unter Verwendung von PCR-Fragment PCRhIL4-I und Fragment II (annelierte Oligos) als DNA-Matrize und E3LIL4-D und E3LIL4-E (SEQ ID NR:185) 5' ATCATCAAGCTTGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAG 3' als Oligonucleotidprimer erhalten. Ein vollständiger HindIII/XbaI-Verdau von PCRhIL4-II erbrachte ein 536 bp-Fragment, das in der Folge isoliert wurde. Ein vollständiger HindIII/XbaI-Verdau von pBS-SK+ (Stratagene) wurde durchgeführt und das 2,9 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was in Plasmid pBShIL4 resultierte.

[0436] Fig. 31 (SEQ ID NR:186) stellt die Nucleotidsequenz der Expressionskassette dar, die aus dem E3L-gesteuerten menschlichen IL-4-Gen besteht. Das Startcodon für das menschliche IL-4-Gen ist bei Nucleotidposition 62, und das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 521.

[0437] Ein vollständiger XbaI-Verdau von Plasmid pBShIL4 wurde durchgeführt. Die Enden wurden unter Ver-

wendung des Klenow-Fragments von E. coli-Polymerase aufgefüllt. Dieses linearisierte Plasmid wurde dann mit XhoI verdaut, und das 536 bp-Fragment, das den E3L-Promotor und das menschliche IL4-Gen enthält, wurde isoliert. Das C3-Insertionsvektorplasmid VQCP3LSA (das selbe wie pVQCP3LSA-3, Beispiel 20) wurde mit XhoI/SmaI vollständig verdaut und das 6,5 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was im Insertionsplasmid pC3hIL4 resultierte.

[0438] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pC3hIL4 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP290 her, das das Vaccinia E3L-gesteuerte menschliche IL-4-Gen im C3-Lokus enthält.

Menschliches IL-4 in NYVAC.

[0439] Plasmid pBShIL4 (oben diskutiert) enthält die E3L/menschliches IL-4-Expressionskassette in pBS-SK. Ein vollständiger XbaI-Verdau von Plasmid pBShIL4 wurde durchgeführt. Die Enden wurde unter Verwendung des Klenow-Fragments von E. coli-Polymerase aufgefüllt. Dieses linearisierte Plasmid wurde dann mit XhoI verdaut, und das 536 bp-Fragment, das den E3L-Promotor und das menschliche IL-4-Gen enthält, wurde isoliert. Das NYVAC-TK-Insertionsvektorplasmid pSD542 (Beispiel 18) wurde mit XhoI/SmaI vollständig verdaut und das 3,9 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was im Insertionsplasmid pTKhIL4 resultierte.

[0440] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pTKhIL4 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1250 her, das das Vaccinia E3L-gesteuerte menschliche IL-4-Gen im TK-Lokus enthält.

Bezugsbeispiel 17 – MENSCHLICHES GMCSF IN ALVAC UND NYVAC

Menschliches GMCSF in ALVAC.

[0441] Das Plasmid GMCSF, das das Gen enthält, das den menschlichen Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (hGMCSF) codiert, wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 39754) erhalten.

[0442] Das PCR-Fragment GMCSF-I wurde unter Verwendung von Plasmid GMCSF als Matrizen-DNA und E3LGMC-A (SEQ ID NR:187) 5' GCTGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAAAATGTGGCTGCAGAGCCTGCTG 3' und E3LGMC-B (SEQ ID NO:188) 5' ATCATCCTCGAGATAAAAATCACTCCTGGACTGGCTCCCAGCAGT-CAAAGGGG 3' als Oligonucleotidprimer synthetisiert.

[0443] Die synthetischen Oligonucleotide E3LSMA-B (SEQ ID NR:189) 5' ATCATCCCCGGGGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGT-TAGTTCTCTCTAAAA 3' und E3LIL4-B (SEQ ID NO:184; Beispiel 25) wurden anneliert, um Fragment GMCSF-P herzustellen, das die Vaccinia-E3L-Promotorsequenz enthält.

[0444] Ein Fusions-PCR-Produkt (GMCSF-II) wurde unter Verwendung der Fragmente GMCSF-I und GMCSF-P als DNA-Matrizen und E3LSMA-A (SEQ ID NR:190) 5' ATCATCCCCGGGGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAG3' und E3LGMC-B als Oligonucleotidprimer erhalten. Ein vollständiger XhoI/SmaI-Verdau von GMCSF-II erbrachte ein 0,5 kb-Fragment, das in der Folge isoliert wurde. Ein vollständiger XhoI/SmaI-Verdau von pBS-SK+ wurde durchgeführt und das 2,9 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was in Plasmid pBSGMCSF resultierte, das die Vaccinia-E3L/hGMCSF-Expressionskassette enthält.

[0445] Die Nucleotidsequenz der Vaccinia E3L/hGMCSF-Expressionskassette ist in **Fig. 32** (SEQ ID NR:191) angegeben. In **Fig. 32** ist das Startcodon für hGMCSF bei Nucleotidposition 62, das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 494.

[0446] Ein vollständiger XhoI/SmaI-Verdau von pBSGMCSF (oben) wurde durchgeführt, und das 0,5 kb-Fragment, das den Vaccinia-E3L-Promotor und das hGMCSF-Gen enthält, wurde isoliert. Das ALVAC-C3-Insertionsplasmid VQCP3LSA (Beispiel 20) wurde mit XhoI/SmaI vollständig verdaut und das 6,5 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was in Plasmid pC3hGMCSF resultierte.

[0447] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pC3hGMCSF und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP285 her, das das Vaccinia-E3L-gesteuerte menschliche GMCSF-Gen im C3-Lokus enthält.

Menschliches GMCSF in NYVAC.

[0448] Ein vollständiger XhoI/SmaI-Verdau von pBSGMCSF wurde durchgeführt, und das 0,5 kb-Fragment, das den Vaccinia-E3L-Promotor und das hGMCSF-Gen enthält, wurde isoliert. pSD542 (Beispiel 18) wurde mit XhoI/SmaI vollständig verdaut und das 3,9 kb-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert, was in Plasmid pTKhGMCSF resultierte.

[0449] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pTKhGMCSF und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1246 her, das das Vaccinia-E3L-gesteuerte menschliche GMCSF-Gen im TK-Lokus enthält.

Expression von menschlichem GMCSF in ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten. ELISA-Test.

[0450] Der Spiegel der Expression von menschlichem GMCSF, das durch die ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vCP285 und vP1246 produziert wurde, wurde unter Verwendung eines ELISA-Kits von Genzyme Corporation, Cambridge, MA. (Factor-Test Human GM-CSF ELISA-Kit, Genzyme Corporation, Produktcode GM-TE.) quantifiziert. Schalen in doppelter Ausführung, die konfluente Monolayer von menschlichen HeLa-Zellen enthielten (2×10^6 Zellen/Schale), wurden mit dem rekombinanten Virus vCP285 oder vP1246 infiziert, das menschliches GMCSF exprimiert, oder mit ALVAC- oder NYVAC-parentalem Virus infiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Überstände geerntet und auf Expression von menschlichem GMCSF unter Verwendung des Factor-Test Human GM-CSF ELISA-Kits, wie vom Hersteller (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) vorgegeben, getestet. Der Factor-Test Human GM-CSF ELISA-Kit ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay, der das multiple Antikörper-Sandwich-Prinzip anwendet. ELISA-Platten wurden bei 490 nm gelesen. Der Hintergrund von ALVAC- oder NYVAC-Proben wurde subtrahiert, und die Werte von den doppelten Schalen wurden gemittelt. Die Menge an sezerniertem menschlichen GMCSF wird in Picogramm(pg)/ml ausgedrückt, was äquivalent zu pg/10^6 Zellen ist (Tabelle 28).

Tabelle 28

Rekombinantes Virus	Sezerniertes menschliches GMCSF
vCP285	2413 pg/ml
vP1246	4216 pg/ml

Bezugsbeispiel 18 – MENSCHLICHES IL-12 IN ALVAC UND NYVAC

Ableitung von DNA, die die zwei Untereinheiten des menschlichen IL-12-Gens codiert.

[0451] Die Synthese des ersten Strangs der cDNA wurde an Gesamt-RNA durchgeführt, die von der menschlichen EBV-transformierten Zelllinie GJBCL isoliert wurde, die 24 Std. mit 100 nM Phorbol-12,13-dibutyrat stimuliert worden war. Oligonucleotidprimer, die für PCR-Amplifizierung der Gene, die die p35- und p40-Untereinheiten (unten) codieren, verwendet wurden, basierten auf der veröffentlichten menschlichen IL-12-Sequenz (Gubler et al., 1991).

[0452] Die p40-Untereinheit des menschlichen IL-12-Gens (hIL12p40) wurde als PCR-Fragment PCR-J60 unter Verwendung des ersten Strangs der cDNA der Zelllinie GJBCL als Matrize und der Oligonucleotide JP202 (SEQ ID NR:192) 5' CATCATATCGATGGTACCTCAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGTGTCACCAGCAGTTGG 3' und JP189 (SEQ ID NO:193) 5' TACTACGAGCTCTCAGATAGAAATTATATCTTTTTGGG 3' als Primer erhalten. PCR-J60 wurde mit SacI/ClaI geschnitten, und ein 1,0 kb-Fragment wurde isoliert und mit pBSSK$^+$ (Stratagene) ligiert, das mit SacI/ClaI geschnitten wurde, was Plasmid PBSHIL12p40II herstellte. Im Plasmid PBSHIL12p40II ist hIL12p40 unter der Kontrolle des Entomopocken-42kDa-Promotors (Beispiel 22).

[0453] Die Sequenz der EPV-42kDa/menschliches IL-12-P40-Expressionskassette ist in **Fig. 33** (SEQ ID NR:194) dargestellt. In **Fig. 33** ist das Startcodon für die menschliche IL-12-P40-Untereinheit bei Nucleotidposition 32, das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 1017.

[0454] Die p35-Untereinheit des menschlichen IL-12-Gens (hIL12p35) wurde als PCR-Fragment PCR-J59 unter Verwendung des ersten Strangs der cDNA von Zelllinie GJBCL als Matrize und der Oligonucleotide JP186 (SEQ ID NR:195) 5' CATCATGGTACCTCAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGTGTCCAGCGCGCAGCC 3' und JP201 (SEQ ID NO:196) 5' TACTACATCGATTTAGGAAGCATTCAGATAG 3' als Primer

erhalten. PCR-J59 wurde mit Asp718/ClaI geschnitten, und ein 0,7 kb-Fragment wurde isoliert und mit pBSSK+ (Stratagene) ligiert, was Plasmid PG2 herstellte. Das hIL12p35-Gen wurde durch eine PCR-Reaktion unter Verwendung von Plasmid PG2 als Matrize und der Oligonucleotide JP218 (SEQ ID NR:197) 5' CATCATGGTACCGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGT-TAGTTCTCTCTAAAAATGTGTCCAGCGCGCAGCC 3' und JP220 (SEQ ID NO:198) 5' CATCATATCGATT-TAGGAAGCATTCAGATAGCTCGTCAC 3' als Primer unter die Kontrolle des Vaccinia-E3L-Promotors (Beispiel 24) gesetzt. PCR-J62 wurde mit Asp718/ClaI geschnitten, und ein 0,7 bp-Fragment wurde isoliert und mit pBSSK+ (Stratagene) ligiert, was Plasmid PBSHIL12p35II herstellte.

[0455] Die Sequenz der Vaccinia-E3L/menschliches IL-12-P35-Expressionskassette ist in Fig. 34 (SEQ ID NR:199) dargestellt. In Fig. 34 ist das Startcodon für die menschliche IL-12-P35-Untereinheit bei Nucleotidposition 62, das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 719.

[0456] Eine Kassette, die die Pockenvirus-geförderten Gene für beide Untereinheiten von menschlichem IL-12 enthält, wurde in pBSSK+ durch Ligieren eines 0,7 kb-Asp718/ClaI-Fragments von PBSHIL12p35II und eines 1,0 kb-Asp718/SacI-Fragments von PBSHIL12p40II in pBSSK+ zusammengesetzt, das mit SacI/ClaI geschnitten wurde. Das resultierende Plasmid wurde als PBSHIL12 bezeichnet. In PBSHIL12 sind die EPV-42kDa/hIL12p40-Kassette und die Vaccinia-E3L/hIL12p35-Kassette in einer Kopf-zu-Kopf-Orientierung in Bezug auf einander orientiert.

Menschliches IL-12 in ALVAC.

[0457] Die Kombinationskassette, die die Pockenvirus-geförderten Gene für beide Untereinheiten des menschlichen IL-12 enthält, wurde als ein 1,7 kb-SacI/ClaI-Fragment von Plasmid PBSHIL12 ausgeschnitten. Das Fragment wurde durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet und in das ALVAC-C6-Vektorplasmid pC6L (Beispiel 22) cloniert, das mit SmaI geschnitten wurde. Das resultierende Plasmid wurde als pC6HIL12 bezeichnet.

[0458] Die Rekombination wurde zwischen dem Donorplasmid pC6HIL12 und dem ALVAC-Rettungsvirus durchgeführt. Rekombinantes Virus wurde plaqueaufgereinigt. Das resultierende rekombinante Virus (ALVAC + IL-12) enthält beide menschlichen IL-12-Gene im C6-Lokus von ALVAC.

Menschliches IL-12 in NYVAC.

[0459] Die Kombinationskassette, die die Pockenvirus-geförderten Gene für beide Untereinheiten des menschlichen IL-12 enthält, wurde als ein 1,7 kb-SacI/ClaI-Fragment von Plasmid PBSHIL12 ausgeschnitten. Das Fragment wurde durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase stumpf beendet und in das NYVAC-TK-Vektorplasmid pSD542 (Beispiel 18) cloniert, das mit SmaI geschnitten wurde. Das resultierende Plasmid wurde als pTKHIL12 bezeichnet.

[0460] Die Rekombination wurde zwischen dem Donorplasmid pTKHIL12 und dem NYVAC-Rettungsvirus durchgeführt. Rekombinantes Virus wurde plaqueaufgereinigt. Das resultierende rekombinante Virus (NYVAC + IL-12) enthält beide menschlichen IL-12-Gene im TK-Lokus von NYVAC.

Bezugsbeispiel 19 – MURINES B7 IN ALVAC UND NYVAC

Murines B7 in ALVAC. Herstellung von cDNA für murines B7.

[0461] Makrophagen von einer unbehandelten BaIb/c-Mausmilz wurden in vitro mit Concanavalin A und LPS stimuliert. Gesamt-RNA von diesen Zellen wurde als eine Matrize für die Synthese des ersten Strangs der cDNA durch reverse Transkription unter Verwendung von Oligo-dT als ein Primer verwendet. Ein Aliquot des ersten Strangs des cDNA-Präparats wurde für die spezifische murine B7-cDNA-Amplifizierung durch PCR unter Verwendung der Primer LF32 (SEQ ID NR:200) 5' TATCTGGAATTCTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG-TATCGTAATGGCTTGCAATTGTCAG 3' und LF33 (SEq ID NO:201) 5' ATCGTAAGCTTACTAAAGGAA-GACGGTGTG 3' verwendet. Die spezifischen Primer LF32 und LF 33 wurden von der veröffentlichten Sequenz von murinem B7 (Freeman et al., 1991) abgeleitet. Die Nucleotide 5' des ATG in LF32 korrespondieren mit einem Teil des Vaccinia-H6-Promotors (Perkus et al., 1989). Das amplifizierte 951 Nucleotid-cDNA-Fragment, das das murine B7-Gen enthält, wurde durch EcoRI und HindIII verdaut und in der Folge in die entsprechenden Stellen des Plasmids pBSSK+ (Stratagene) cloniert. Das resultierende Plasmid pLF1 wurde mit NruI und XhoI verdaut, und ein 949 bp-Fragment, das einen Teil des Vaccinia-H6-Promotors und das gesamte mu-

rine B7-Gen enthält, wurde isoliert.

[0462] Plasmid pMPC616E6 enthält ein nicht relevantes Gen im ALVAC-C6-Insertionslokus unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors. Plasmid pMPC616E6 wurde mit NruI und XhoI verdaut, und das 4 403 bp-NruI-XhoI-Fragment, das den Großteil des H6-Promotors im ALVAC-C6-Insertionslokus enthält, wurde isoliert. Dieses Vektorfragment wurde mit dem NruI/XhoI-Fragment von pLF1 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pLF4 genannt.

[0463] Die Nucleotidsequenz des murinen B7-Gens ist in Fig. 35 (SEQ ID NR:202) angegeben. In Fig. 35 ist das Startcodon für das murine B7-Gen bei Nucleotid 1, und das Stoppcodon ist bei Nucleotid 919.

[0464] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pLF4 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP268 her, das das Vaccinia-H6-gesteuerte murine B7-Gen im C6-Lokus enthält.

Murines B7 in NYVAC.

[0465] Plasmid pSIV12 enthält ein nicht relevantes Gen unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im NYVAC-I4L-Insertionslokus. Plasmid pSIV12 wurde mit NruI und XhoI verdaut, und das 3 557 bp-NruI-XhoI-Fragment, das den Großteil des H6-Promotors im NYVAC-I4L-Insertionslokus enthält, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde an die angelagerten synthetischen Oligonucleotide LF57 (SEQ ID NR:203) 5' CGACATTTGGATTTCAAGCTTCTACG 3' und LF58 (SEQ ID NO:204) 5' GATCCGTAGAAGCTTGAATCCAATGTCG 3' das eine interne HindIII-Stelle enthält, ligiert. Das resultierende Plasmid pLF2 wurde mit NruI und HindIII verdaut, und ein 3 659 bp-Vektorfragment wurde isoliert. Plasmid pLF1 (oben) wurde mit NruI und HindIII verdaut, und ein 951 bp-NruI-HindIII-Fragment, das einen Teil des Vaccinia-H6 Promotors und das gesamte murine B7-Gen enthält, wurde isoliert. Diese zwei Fragmente wurden ligiert, was Plasmid pLF3 herstellte.

[0466] Plasmid pLF3 korrespondiert mit einem I4L-NYVAC-Donorplasmid, das die gesamte murine B7-codierende Sequenz unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors enthält.

[0467] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pLF3 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1230 her, das das Vaccinia-H6-gesteuerte murine B7-Gen im I4L-Lokus enthält.

Oberflächenexpression von B7 auf murinen Tumorzellen, die mit ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten infiziert wurden, die murines B7 exprimieren.

[0468] K1735-Maus-Melanomzellen und CC-36-Maus-Colonkarzinomzellen wurden mit 10 pfu pro Zelle von NYVAC-B7 (vP1230), ALVAC-B7 (vCP268) oder NYVAC- oder ALVAC-parentalem Virus für eine Stunde infiziert, von nicht adsorbiertem Virus durch Zentrifugation frei gewaschen und bei 37°C inkubiert. B16-Maus-Melanomzellen wurden in ähnlicher Weise behandelt, außer, dass die Zellen mit 5 pfu Virus pro Zelle infiziert wurden. Nach einer 1 h- (K1735) oder über Nacht- (CC-36;B16) Inkubation wurden die Zellen in PBS durch Zentrifugation gewaschen und in 1,0 ml PBS resuspendiert. Zu jeder Zellpräparation wurden 0,005 ml 1:5-verdünnter Fc-Blocker (Pharmingen, San Diego, CA, Kat. 01241A; aufgereinigter anti-Maus-Fcγ-II-Rezeptor) und 0,1 ml 1:100-verdünnter monoclonaler FITC-Ratten-anti-Maus-B7-Antikörper (Pharmingen, Kat. 01944D) zugefügt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, zweimal in kaltem PBS durch Zentrifugation gewaschen und auf Zell-assoziierte FITC-Fluoreszenz durch Durchfluss-Cytometrie (Becton-Dickinson FACScan) analysiert.

[0469] Obwohl K1735-Zellen, die mit NYVAC-B7 (vP1230) oder ALVAC-B7 (vCP268) für 1 Stunde infiziert wurden, nur geringfügig stärkere Fluoreszenz als die nicht infizierten Kontroll- oder NYVAC- oder ALVAC-infizierte Zellen zeigten, war B7-Expression in rekombinanten infizierten CC-36- und B16-Zellen bemerkenswert (Fig. 36). Wie durch die nicht infizierten Kontrollzellen gezeigt, exprimiert keine der drei Zelllinien endogen murines B7. Infektion von etablierten murinen Tumorzelllinien mit NYVAC-B7 (vP1230) oder ALVAC-B7 (vCP268) aber nicht mit den Vektoren NYVAC oder ALVAC resultierte deutlich in hohen Spiegeln der Expression des murinen T-Lymphocyten-Co-Aktivator-Moleküls BB-1/B7.

Bezugsbeispiel 20 – MENSCHLICHES B7 IN NYVAC

Herstellung von cDNA für menschliches B7.

[0470] Makrophagen von menschlichem periphären Blut wurden in vitro mit Concanavalin A und LPS stimuliert. Gesamt-RNA von diesen Zellen wurde als eine Matrize für die Synthese des ersten Strangs der cDNA durch reverse Transkription unter Verwendung von Oligo-dT als ein Primer verwendet. Ein Aliquot des ersten Strangs des DNA-Präparats wurde für die spezifische menschliche B7-cDNA-Amplifizierung durch PCR unter Verwendung der Primer LF62 (SEQ ID NO: 205) 5' ATCGTAAGCTTATTATACAGGGCGTACACTTTC 3' und LF61 bis (SEQ ID NO:206) 5' TATCTGGAATTCTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGCCACACACGGAGG 3' verwendet.

[0471] Die spezifischen Primer LF62 und LF61 bis wurden von der veröffentlichten Sequenz von menschlichem B7 (Freeman et al., 1989) abgeleitet. Die Nucleotide 5' des ATG in LF61 bis korrespondieren mit einem Teil des Vaccinia-H6-Promotors (Perkus et al., 1989). Das amplifizierte 997 Nucleotid-cDNA-Fragment, das das murine B7-Gen enthält, wurde durch EcoRI und HindIII verdaut und in der Folge in die entsprechenden Stellen des Plasmids pBSSK$^+$ (Stratagene) cloniert. Dieses Plasmid wurde als pLF6 bezeichnet.

[0472] Die Sequenz für das menschliche B7-Gen ist in Fig. 37 (SEQ ID NR:207) dargestellt. In Fig. 37 ist das Startcodon für das menschliche B7-Gen bei Nucleotidposition 1, und das Stoppcodon ist bei Nucleotidposition 865.

Insertion von menschlichem B7 in NYVAC.

[0473] Plasmid pLF3 (Beispiel 28) wurde mit NruIO und HindIII verdaut, und ein 3652 bp-Vektorfragment, das den Großteil des H6-Promotors im NYVAC-I4L-Insertionslokus enthält, wurde isoliert. Plasmid pLF6 (oben) wurde mit NruI und HindIII verdaut, und ein 897 bp-Fragment, das einen Teil des Vaccinia-H6-Promotors und das gesamte menschliche B7-Gen enthält, wurde isoliert. Diese zwei Fragmente wurden ligiert, was Plasmid pLF7 herstellte.

[0474] Plasmid pLF7 korrespondiert mit einem I4L-Donorplasmid, das die gesamte menschliche B7-codierende Sequenz unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors enthält.

[0475] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pLF7 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1245 her, das das Vaccinia-H6-gesteuerte menschliche B7-Gen im I4L-Lokus enthält.

Expression von menschlichem B7. FACScan.

[0476] Menschliche HeLa-Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus vP1245, das das menschliche B7 exprimiert, oder mit dem NYVAC parentalen Virus infiziert. Ein monoclonaler Antikörper, der spezifisch für menschliches B7 ist (Anti-BB1 (B7), Kat. Nr. 550024, Becton Dickinson Advanced Cellular Biology, San Jose, CA), wurde verwendet, um Expression von menschlichem B7 auf der Oberfläche von infizierten Zellen durch Durchflusscytometrie (Becton-Dickinson FACScan), wie in Beispiel 28 beschrieben, nachzuweisen. B7 wurde auf der Oberfläche von Zellen, die mit dem rekombinanten Virus vP1245 infiziert wurden, nachgewiesen. B7 wurde nicht auf der Oberfläche von nicht-infizierten Zellen oder Zellen, die mit parentalem NYVAC Virus infiziert wurden, nachgewiesen.

Immunpräzipitation.

[0477] Das NYVAC-basierende rekombinante Virus vP1245 wurde auf Expression des menschlichen B7-Gens unter Verwendung von Immunpräzipitation getestet. Rekombinantes oder parentales Virus wurde auf vorgeformte Monolayer von Gewebekulturzellen in der Anwesenheit von radioaktiv-markiertem ^{35}S-Methionin beimpft und wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) behandelt. Immunpräzipitationsreaktionen wurden unter Verwendung eines monoclonalen Antikörpers, der spezifisch für menschliches B7 ist (Anti-BB1 (B7), Kat. Nr. 550024, Becton Dickinson Advanced Cellular Biology, San Jose, CA) durchgeführt. Ein Protein zwischen ungefähr 44 und 54 kDA wurde von den Zellen, die mit rekombinantem Virus vP1245 infiziert wurden, in Übereinstimmung mit Freeman et al. (1989) präzipitiert. Das Protein wurde nicht von nicht-infizierten Zellen oder Zellen, die mit parentalem NYVAC Virus infiziert wurden, immunpräzipitiert.

Beispiel 9 – CO-INSERTION VON MURINEM IFNγ UND MURINEM B7 IN ALVAC

Co-Insertion von murinem IFNγ und murinem B7 in ALVAC.

[0478] Rekombination wurde zwischen Donorplasmid pLF4 (Beispiel 28) und Rettungsvirus vCP271 (Beispiel 20) erreicht. Rekombinantes Virus wurde plaqueaufgereinigt. Das resultierende ALVAC-basierende rekombinante Virus (ALVAC + IFNγ + B7) enthält das Vaccinia-I3L-gesteuerte murine IFNγ-Gen im C3-Lokus und das Vaccinia-H6-geförderte murine B7-Gen im C6-Lokus.

Bezugsbeispiel 21 – INSERTION VON WILDTYP- UND MUTANTEN FORMEN VON MURINEM P53 IN ALVAC

[0479] Es wurde gefunden, dass das Gen für das nucleäre Phosphoprotein p53 das Gen ist, das am häufigsten in einer breiten Vielfalt von menschlichen Tumoren mutiert ist (Literaturübersicht in Hollstein et al., 1991). NYVAC- und ALVAC-basierendes rekombinantes p53-Virus ist in Beispiel 15 beschrieben.

Insertion von murinem Wildtyp-p53 in ALVAC.

[0480] Plasmid p11-4, das das murine Wildtyp-p53 enthält, wurde von Arnold Levine (Princeton University, Princeton, New Jersey) erhalten. Die p53-Sequenz ist in Pennica et al., (1984) beschrieben. Das murine Wildtyp-p53-Gen wurde unter die Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors platziert, und das nicht-codierende 3'-Ende von p53 wurde mit PCR-abgeleiteten Fragmenten entfernt.

[0481] Ein Fragment, das das H6-gesteuerte 5'-Ende des p53-Gens, fusioniert an das 3'-Ende des p53-Gens enthält, wurde durch einige PCRs wie unten beschrieben hergestellt.

[0482] PCR I: Plasmid pRW825, das den H6-Promotor und ein nicht-passendes Gen enthält, wurde als Matrize mit den Oligonucleotiden MM080 (SEQ ID NR:208) 5' ATTATTATTGGATCCTTAATTAATTAGTGATACGC 3' und MM081 (SEQ ID NO:209) 5' CTCCTCCATGGCAGTCATTACGATACAAACTTAAC 3' verwendet, was ein 228 bp-Fragment produzierte, das den H6-Promotor und die äußerst 5'-gelegenen Basenpaare des murinen p53-Gens enthält. MM080 lagert sich an das 5'-Ende des H6-Promotors an und primt in Richtung zum 3'-Ende. MM081 lagert sich an das 3'-Ende des H6-Promotors und primt in Richtung zum 5'-Ende.

[0483] PCR II: Plasmid p11-4 wurde als Matrize mit den Oligonucleotiden MM082 (SEQ ID NR:210) 5' CGTTAAGTTTGTATCGTAATGACTGCCATGGAGGAGTC 3' und MM083 (SEQ ID NO:231) 5' TAGTAGTAGTAGTAGCTTCTGGAGGAAGTAGTTTCC 3' verwendet, um ein 129 bp-Fragment mit dem 3'-Ende des H6-Promotors, dem 5'-Ende des p53-Gens, gefolgt von 15 bp herzustellen, das das PCR-Fragment PCRIII (unten beschrieben) überlappt. MM082 enthält das 3'-Ende des H6-Promotors und primt vom 5'-Ende des murinen p53-Gens. MM083 lagert sich an Position 97 (**Fig. 38**) des murinen p53-Gens an und primt in Richtung zum 5'-Ende.

[0484] PCR III: Plasmid p11-4 wurde als Matrize mit den Oligonucleotiden MM084 (SEQ ID NR:212) 5' CAGAAGCTACTACTACTACCCACCTGCACAAGCGCC 3' und MM085 (SEQ ID) NO:213) 5' AACTACTGTCCCGGGATAAAAATCAGTCTGAGTCAGGCCCCAC 3' verwendet, um ein 301 bp-Fragment herzustellen. Das 301 bp PCR-abgeleitete Fragment enthält das 3'-Ende des p53 Gens, und das 5'-Ende überlappt das 3'-Ende des PCRII-Produkts. MM084 (SEQ ID NR:212) primt von Position 916 des murinen p53-Gens in Richtung zum 3'-Ende. MM085 (SEQ ID NR:213) primt von Position 1173 in Richtung zum 5'-Ende des p53-Gens. Die drei PCR-Produkte wurden gepoolt und mit MM080 und MM085 geprimt. Das resultierende 588 bp-Fragment enthält eine BamHI-Stelle, gefolgt von dem H6-geförderten 5'-Ende des p53-Gens, fusioniert an das 3'-Ende das p53-Gens, gefolgt von einer SmaI-Stelle; das 5'-Ende des p53-Gens endet an der XhoI-Stelle bei Position 37, und das 3'-Ende startet bei der SacII-Stelle bei Position 990 (**Fig. 38**). Das 588 bp PCR-abgeleitete Fragment wurde mit BamHI und SmaI verdaut, was ein 565 bp-Fragment herstellt, das in BamHI/SmaI-verdautes pNC5LSP5 (unten beschrieben) inseriert wurde. Das resultierende als pMM136 bezeichnete Plasmid wurde mit KspI und XhoI verdaut, um ein 149 bp-Fragment zu entfernen, und das 953 bp-KspI/XhoI-Fragment von p11-4 wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM148 enthält das H6-geförderte murine Wildtyp-p53 im ALVAC-C5-Insertionslokus.

[0485] Die Konstruktion von pNC5LSP5 ist wie folgt. Ein C5-Insertionsvektorplasmid pC5LSP (Beispiel 14) wurde mit EcoRI verdaut, mit alkalischer Phosphatase behandelt und an das selbst-annelierte Oligonucleotid CP29 (SEQ ID NR:102) 5' AATTGCGGCCGC 3' ligiert, dann mit NotI verdaut und linear aufgereinigt, gefolgt

von Selbstligierung. Diese Vorgehensweise bringt eine NotI-Stelle in pC5LSP ein, was pNC5LSP5 herstellt.

[0486] Die Nucleotidsequenz des murinen Wildtyp-p53-Gens ist in Fig. 38 (SEQ ID NR:214) dargestellt. Das Startcodon ist bei Position 1, und das Stoppcodon ist bei Position 1171.

[0487] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM148 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP263 her. vCP263 enthält das murine Wildtyp-p53-Gen unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im C5-Lokus.

Insertion einer mutanten Form des murinen p53 in ALVAC.

[0488] Plasmid pSVK215, das eine mutante Form des murinen p53-Gens enthält, wurde von Arnold Levine (Princeton University, Princeton, New Jersey) erhalten. Die Mutation in pSVKH215 ändert die Sequenz GTAC der murinen p53-codierenden Sequenz- (Fig. 38) nt-Positionen 643 bis 646 auf CCAAGCTTGG. Die Insertion zwischen nt-Positionen 643 und 646 ändert die vorhergesagte Aminosäuren-codierende Sequenz von val-pro auf pro-ser-leu-ala; und die Insertion ersetzt eine KpnI-Stelle durch eine HindIII-Stelle. Die Konstruktion von pSVKH215 ist in Tan et al. (1986) beschrieben.

[0489] Plasmid pMM136 (oben beschrieben) enthält das Vaccinia-H6-gesteuerte 5'-Ende des p53-Gens, fusioniert an das 3'-Ende des p53-Gens in einem ALVAC-C5-Lokus-Insertionsplasmid. pMM136 wurde mit KspI und XhoI verdaut, um 149 bp zu entfernen, und das 960 bp-KspI/XhoI-Fragment, das die oben beschriebene Mutation von pSVKH215 enthält, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM149 enthält das H6-gesteuerte murine mutante p53-Gen im C5-Lokus.

[0490] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM149 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP267 her. vCP267 enthält die mutante Form des murinen p53-Gens unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im C5-Lokus.

Bezugsbeispiel 22 – INSERTION VON MUTANTEN FORMEN VON MENSCHLICHEM P53 IN ALVAC UND NYVAC

Mutante Formen von menschlichem p53 in ALVAC.

[0491] Fig. 18 (Beispiel 15) stellte die Sequenz der Vaccinia-H6-gesteuerten menschlichen Wildtyp-p53-Genkassette in einer ALVAC-basierenden Rekombinante vCP207 dar. In diesem Beispiel, um die Beschreibung der mutanten Formen des menschlichen p53-Gens, das beschrieben wird, zu erleichtern, stellt Fig. 39 (SEQ ID NR:215) nur die codierende Sequenz für das menschliche Wildtyp-p53-Gen dar. Das Startcodon ist bei Position 1, und das Stoppcodon ist bei Position 1180.

[0492] Plasmid Cx22A, das eine mutante Form des menschlichen p53-Gens enthält, wurde von Arnold Levine (Princeton University, Princeton, New Jersey) erhalten. Im Vergleich zu der Wildtyp-p53-Sequenz, die in Fig. 39 dargestellt ist, ist das G bei Nucleotidposition 524 mit einem A ersetzt, was die arg-Aminosäure bei Codon 175 des Wildtyp-Proteins zu einer his-Aminosäure in Cx22A ändert.

[0493] Plasmid pMM110 (Beispiel 15, Fig. 18) enthält das Vaccinia-H6-gesteuert menschliche Wildtyp-p53-Gen in der ALVAC-C5-Insertionsstelle. Das menschliche p53-Gen enthält zwei PflmI-Stellen. Die p53-codierenden Sequenzen stromaufwärts der ersten PflmI-Stelle und stromabwärts der zweiten PflmI-Stelle sind in pMM110 die selben wie in Cx22A. pMM110 wurde mit PflmI verdaut, um die 853 zentralen Basenpaare des p53-Gens zu entfernen. Das 853 bp-PflmI-Fragment von Cx22A, das die Basenänderung an Position 524 enthält, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM143 enthält das H6-geförderte mutante p53-Gen.

[0494] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM143 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP270 her. vCP270 enthält die mutante Form des menschlichen p53-Gens unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im C5-Lokus.

[0495] Plasmid pR4-2, das eine mutante Form des menschlichen p53-Gens enthält, wurde von Arnold Levine (Princeton University, Princeton, New Jersey) erhalten. Verglichen mit der in Fig. 39 dargestellten Wildtyp-p53-Sequenz ist das G bei Nucleotidposition 818 durch ein A ersetzt, was in pR4-2 das arg-Codon bei Aminosäure-Position 273 zu einem his-Codon ändert.

[0496] Plasmid pMM110 (Beispiel 15, Fig. 18) enthält das Vaccinia-H6-gesteuerte menschliche Wildtyp-p53-Gen in der ALVAC-C5-Insertionsstelle. Die p53-codierenden Sequenzen stromaufwärts der ersten PflmI-Stelle und die p53-codierenden Sequenzen stromabwärts der zweiten PflmI-Stelle sind in pMM110 die selben wie in pR4-2. pMM110 wurde mit PflmI verdaut, um die 853 zentralen Basenpaare des p53-Gens zu entfernen. Das 853 bp-PflmI-Fragment von pR4-2, das die Basenänderung bei Nucleotid-Position 818 enthält, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM144 enthält die H6-gesteuerte mutante Form des menschlichen p53-Gens im C5-Insertionslokus.

[0497] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM144 und dem ALVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vCP269 her. vCP269 enthält die mutante Form des menschlichen p53-Gens unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im C5-Lokus.

Mutante Formen des menschlichen p53 in NYVAC.

[0498] Das oben beschriebene Plasmid Cx22A enthält eine mutante Form des menschlichen p53-Gens, in der das G bei Nucleotid-Position 524 (Fig. 39) durch ein A ersetzt ist, was das arg-Codon bei Aminosäure-Position 175 zu einem his-Codon in Cx22A ändert.

[0499] Plasmid pMM106 (Beispiel 15) enthält das Vaccinia-H6-gesteuerte menschliche Wildtyp-p53-Gen im NYVAC-I4L-Insertionslokus. Die p53-codierenden Sequenzen stromaufwärts der ersten PflmI-Stelle und die p53-codierenden Sequenzen stromabwärts der zweiten PflmI-Stelle sind in pMM106 die selben wie in Cx22A. pMM106 wurde mit PflmI verdaut, um die zentralen 853 Basenpaare des p53-Gens zu entfernen. Das 853 bp-PflmI-Fragment von Cx22A, das die Basenänderung an Position 524 enthält, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM140 enthält das H6-gesteuerte mutante p53-Gen.

[0500] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM140 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1234 her. vP1234 enthält die mutante Form des menschlichen p53-Gens unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im I4L-Lokus.

[0501] Das oben beschriebene Plasmid pR4-2, enthält eine mutante Form des menschlichen p53-Gens, in dem das G bei Nucleotidposition 818 (Fig. 39) durch ein A ersetzt ist, was in pR4-2 das arg-Codon bei Aminosäure-Position 273 zu einem his-Codon ändert.

[0502] pMM106 (Beispiel 15) enthält das H6-gesteuerte menschliche Wildtyp-p53-Gen im I4L-Lokus. Die p53-codierenden Sequenzen stromaufwärts der ersten PflmI-Stelle und die p53-codierenden Sequenzen stromabwärts der zweiten PflmI-Stelle sind in pMM106 die selben wie in pR4-2. pMM106 wurde mit PflmI verdaut, um die zentralen 853 Basenpaare des p53-Gens zu entfernen. Das 853 bp-PflmI-Fragment von pR4-2, das die Basenänderung bei Position 818 enthält, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pMM141 enthält das H6-gesteuerte mutante p53-Gen.

[0503] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM141 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1233 her. vP1233 enthält die mutante Form des menschlichen p53-Gens unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im I4L-Lokus.

[0504] Eine Auflistung der Wildtyp- und mutanten Formen des murinen p53 und der mutanten Formen des menschlichen p53, die in den in Beispielen 31 und 32 beschriebenen ALVAC- und NYVAC-Rekombinanten vorhanden sind, wird in Tabelle 29 geliefert.

Tabelle 29

Rekombinantes Virus	Parentaler Virus	Spezies	Gen-Insertion
vCP263	ALVAC	murin	W.t. p53
vCP267	ALVAC	murin	p53 (+3 AS)
vCP270	ALVAC	menschlich	p53 (AS175; R zu H)
vCP269	ALVAC	menschlich	p53 (AS 273; R zu H)
vP1234	NYVAC	menschlich	p53 (AS 175; R zu H)
vP1233	NYVAC	menschlich	p53 (AS 273; R zu H)

Immunpräzipitation.

[0505] Die ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vP1101, vP1096, vP1098, vCP207, vCP193, vCP191 (alle in Beispiel 15; Tabelle 22 beschrieben, sowie die in diesem Beispiel, Tabelle 29 beschriebenen ALVAC- und NYVAC-basierenden Rekombinanten vCP270, vCP269, vP1233, vP1234) enthalten Wildtyp- oder mutante Formen des menschlichen p53-Gens. All diese rekombinanten Viren wurden auf die Expression von menschlichem p53-Gen unter Verwendung von Immunpräzipitation getestet.

[0506] Vorgeformte Monolayer von Gewebekulturzellen wurden mit rekombinantem oder parentalem Virus in der Anwesenheit von radioaktiv-markiertem ^{35}S-Methionin beimpft und wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) behandelt. Immunpräzipitationsreaktionen wurden unter Verwendung des monoclonalen menschlichen p53-spezifischen Antikörpers 1801 durchgeführt. Ein Protein von zwischen 47 und 53 kDa Größe wurde von Zellen präzipitiert, die mit einem der rekombinanten Viren vP1101, vP1096, vP1098, vCP207, vCP193, vCP191, vCP270, vCP269, vP1233 oder vP1234 infiziert wurden, aber nicht von nicht infizierten Zellen oder Zellen, die mit dem parentalen ALVAC- oder -NYVAC-Virus infiziert wurden.

[0507] Basierend auf den Eigenschaften der Pockenvirus-Vektorsysteme NYVAC, ALVAC und TROVAC, die oben zitiert wurden, liefern solche Vektoren, die entweder Wildtyp- oder mutante Formen von p53 exprimieren, wertvolle Reagenzien, um festzustellen, ob endogene CTL-Aktivitäten in Effektor-Populationen (TILs, PBMC oder Lymphknotenzellen) von Patienten nachgewiesen werden können; und wertvolle Vehikel für die Stimulation oder die Steigerung solcher Aktivitäten; zum Beispiel Steigerung solcher Aktivitäten durch in vitro- oder ex vivo-Stimulation mit diesen rekombinanten Viren. Darüber hinaus ermöglichen die stark abgeschwächten Eigenschaften sowohl von NYVAC als auch ALVAC, dass die Rekombinanten der Erfindung für oben diskutierte eingreifende immuntherapeutische Modalitäten verwendet werden, z.B. in vivo-eingreifende Immuntherapie.

Bezugsbeispiel 23 – ERB-B-2 IN COPAX

[0508] Das Plasmid ErbB2SphIstop wurde von Jeffrey Marks (Duke University Center) erhalten. ErbB2SphIstop enthält eine menschliche 3,8 kb-erb-B-2-cDNA-Insertion, die in pUC19 cloniert wurde. Die Insertion erstreckt sich von nt 150 bis zu nt 3956 (Yamamoto et al., 1986) und enthält die gesamte erb-B-2-codierende Sequenz. In ErbB2SphIstop wurde die SphI-Stelle bei nt 2038 durch die Zugabe eines XbaI-Linkers mutagenisiert, was ein „in Rahmen-Stoppcodon" bildete. Der verbleibende, verkürzte ORF spezifiziert daher eine extrazelluläre sezernierbare Form des erb-B-2-Genprodukts, die das Translationsprodukt der 2,3 kb-mRNA immitiert. Das Plasmid ErbB2SphIstop wurde mit XhoI verdaut, und das 3,8 kb-erb-B-2-Fragment wurde isoliert. Dieses isolierte Fragment wurde mit dem COPAK-Vektorplasmid pSD555 ligiert, das mit XhoI geschnitten wurde, was in Plasmid pMM113 resultierte.

[0509] Plasmid pSD555 wurde wie folgt abgeleitet. Plasmid pSD553 (Beispiel 17) ist ein Vaccinia-Deletions/Insertions-Plasmid der COPAK-Reihe. Es enthält das Vaccinia-K1L-Wirtsbereich-Gen (Gillard et al., 1986) in den flankierenden Copenhagen-Vaccinia-Armen, was die ATI-Region ersetzt (orfs A25L, A26L; Goebel et al., 1990).

[0510] Plasmid pSD553 wurde mit NruI geschnitten und mit einem SmaI/NruI-Fragment ligiert, das das synthetische Vaccinia-H6-Promotorelement (Perkus et al., 1989) stromaufwärts der NruI-Stelle enthält, das bei -26 in Bezug auf das Translations-Startcodon gelegen ist. Das resultierende Plasmid pMP553H6 enthält das Vaccinia-H6-Promotorelement, das stromabwärts des K1L-Gens im A26L-Insertionslokus gelegen ist.

[0511] Um den Vaccinia-H6-Promotor zu vervollständigen und eine Multiclonierungsregion für die Insertion von fremder DNA hinzuzufügen, wurde Plasmid pMP553H6 mit NruI/BamHI geschnitten und mit den durch Annealing angelagerten synthetischen Oligonucleotiden MPSYN349 (SEQ ID NR:216) 5' CGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGCTCCTGCAGCCCGGGG 3' und MPSYN350 (SEQ ID NO:217) 5' GATCCCCCGGGCTGCAGGAGCTCCATTACGATACAAACTTAACGGATATCG 3' ligiert. Das resultierende Plasmid pSD555 enthält die gesamte H6-Promotorregion, gefolgt von einer Multiclonierungsregion.

[0512] Die Rekombination zwischen dem Donorplasmid pMM113 und dem NYVAC-Rettungsvirus stellte das rekombinante Virus vP1100 her. vP1100 enthält das erb-B-2-Gen unter der Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors im I4L-Lokus zusammen mit dem Vaccinia-K1L-Wirtsbereichs-Gen.

Immunpräzipitation.

[0513] Vorgeformte Monolayer von Vero-Zellen wurden mit 10 pfu pro Zelle mit parentalem NYVAC-Virus und dem rekombinanten Virus vP1100 in der Anwesenheit von radioaktiv-markiertem ^{35}S-Methionin beimpft und wie früher beschrieben (Taylor et al., 1990) behandelt. Immunpräzipitationsreaktionen wurden unter Verwendung eines monoclonalen menschlichen erb-B-2-spezifischen Antikörpers TA1-1C durchgeführt. Ein Protein von ungefähr 97 kDa wurde von Zellen präzipitiert, die mit vP1100, aber nicht von nicht-infizierten Zellen oder Zellen, die mit parentalem NYVAC-Virus infiziert wurden.

BEZUGNAHMEN

1. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Peracho, M., Cell 53, 549–554 (1988).
2. Altenburger, W., C-P. Suter und J. Altenburger, Archives Virol. 105, 15–27 (1989).
3. Asher, A.L., Mulé, J. J., Reichert, C.M., et al., J. Immunol. 138, 963–974 (1987).
4. Avery, R.J., und Niven. J., Infect. and Immun. 26, 795–801 (1979).
5. Aviv, H., und Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408–1412 (1972).
6. Behbehani, A.M., Microbiological Reviews 47, 455–509 (1983).
7. Bergoin, M., und Dales, S., In Comparative Virology, Hrsg. K. Maramorosch und E. Kurstak, (Academic Press, NY) S. 169–205 (1971).
8. Bernards, R., Destree, A., McKenzie, S., Gordon, E., Weinberg, R.A., und Panicali, D., PNAS USA 84, 6854–6858 (1387).
9. Bertholet., C., Drillien, R., und Wittek, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096–2100 (1985).
10. Boursnell, M.E.G., P.F. Green, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, F.M. Tomley, A.C.R. Samson, P.T. Emmerson, und Binns, M.M., Veterinary Microbiology 23, 305–316 (1990b).
11. Boursnell, M.E.G., P.F. Green, A.C.R. Samson, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, N.S. Millar, P.T. Emmerson, und Binns, M.M., Virology 178, 297–300. (1990c).
12. Boursnell, M.E.G., Green, P.F., Campbell, J.I.A., Deuter, A., Peters., R.W., Tomley, F.M., Samson, A.C.R., Chambers, P., Emmerson, P.T., und Binns, M.M., J. Gen. Virol. 71, 621–628 (1990a).
13. Boyle, D.B.; Coupar, B.E.H., Gene 65, 123–128 (1988).
14. Brunda, M.J., L. Luistro, R.R. Warrier, R.B. Wright, B.R. Hubbard, M. Murphy, S.F. Wolf und M.K. Gately, J. Exp. Med. 178, 1223–1230 (1993).
15. Buller, R.M.L., G.L. Smith, Cremer, K., Notkins, A.L., und Moss, B., Nature 317, 813–815 (1985).
16. Buller, R.M.L., Chakrabarti, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.R., und Moss, B., J. Virol. 62, 866–874 (1988).
17. Bzik, D., Li, W., Horii, T., und Inselburg, J., Molec. Biochem. Parasitol. 30, 279–288 (1988).
18. Cadoz, M., A. Strady, B. Meignier, J. Taylor, J.
Tartaglia, E. Paoletti und S. Plotkin, The Lancet, 339, 1429 (1932).
19. Cassel, W.A., D.R. Murray und H.S. Phillips Cancer 52, 856–860 (1983).
20. Chambers, P., N.S. Millar, und P.T. Emmerson, J. Gen. Virol. 67, 2685–2694 (1986).
21. Chen, L., S. Ashe, W.A. Brady, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, J.A. Ledbetter, P. McGowan und P.S. Linsley, Cell 71, 1093–1102 (l992).
22. Child, S.J., Palumbo, G.J., Buller, R.M.L., und Hruby, D.E. Virology 174, 625–629 (1990).
23. Clark, S. Arya, S., Wong-Staal, F., Matsumoto-Mobayashi, M., Kay, R., Kaufman, R., Brown, E., Shoemaker, C., Copeland, T., Oroszland, S., Smith, K., Sarngadharan, M, Lindner, S., und Gallo, R. PNAS 81, 2543–2547 (1984).
24. Clewell, D.B., J. Bacteriol 110, 667–676 (1972).
25. Clewell, D.B. und D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159–1166 (1969).
26. Colinas, R.J., R.C. Condit und E. Paoletti, Virus Research 18, 49–70 (1990).
27. Cooney E.L., Corrier A.C., Greenberg P.D., et al., Lancet 337, 567–572 (1991).
28. Coulie, P., Weynants, P., Muller, C., Lehmann, F., Herman, J., Baurain, J.-F., und Boon, T. In Specific Im-

munotherapy of Cancer with Vaccines, Hrsg. Bystryn, J.-L., Ferrone, S., und Livingston, P. New York Academy of Science, New York. S. 113–119 (1993).
29. Davidoff, A.M., Kerns, B.J.M., Iglehart, J.D., Marks, J.R., Cancer Res. 51, 2605–2610 (1991).
30. Davidoff, A.M., J.D. Iglehart, und J.R. Marks, PNAS USA 89, 3439–3442 (1992).
31. Dreyfuss, G., Adam, S.A., und Choi, Y.D., Mol. Cell. Biol. 4, 415–423 (1984).
32. Drillien, R., F. Koehren und A. Kirn, Viralogy 111, 488–499 (1981).
33. Edbauer, C., R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, P. Desmettre, und E. Paoletti, Virology 179, 901–904 (1990).
34. Engelke, D.R., Hoener, P.A., und Collins, F.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 544–548 (1988).
35. Espion, D., S. de Henau, C. Letellier, C.-D. Wemers, R. Brasseur, J.F. Young, M. Gross, M. Rosenberg, G. Meulemans und A. Burny, Arch. Virol. 95, 79–95 (1987).
36. Estin, C. D., Stevenson, U.S., Plowman, G. D., Hu, S.-L., Sridhar, P., Hellström, I., Brown, J.P., Hellström, K.E., PNAS USA 85, 1052–1056 (1988).
37. Etinger H.M., Altenburger W., Vaccine 9, 470–472 (1991).
38. Falkner, F.G.; Moss, B.,J. Virol. 62, 1849–1854 (1988).
39. Fendly, B.M., Kotts, C., Vetterlein, D., Lewis, G.D., Winget, M., Carver, M.E., Watson, S.R., Sarup, J., Saks, S., Ullrich, A., Shepard, H.M., J. Biol. Resp. Mod. 9, 449–455 (1990).
40. Fenner, F., Virology 5, 502–529 (1958).
41. Fishbein, G. E., McClay, E., Berd, D., und M.J. Mastrangelo, Vaccine Res. 1, 123–128.
42. Flexner, C., Hugen, A., und Moss, B., Nature 330, 259–262 (1987).
43. Freeman, G.J., G.S. Gray, C.D. Gimmi, D.B. Lombard, L.-J. Zhou, M. White, J.D. Fingeroth, J.G. Gribben und L.M. Nadler, J. Exp. Med., 174, 625–631 (1991).
44. Freeman, G.J., A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman und L.M. Nadler, J. Immunol. 143, 2714–22 (1989).
45. Fries et al., 32 Interscience Conference an Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA (Oktober 1992).
46. Frohman, M., Dush, M., und Martin, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998–9002 (1988).
47. Fujiwara et al., Eur. J. Immunol. 14, 171–175 (1984).
48. Funahashi, S., T. Sato und H. Shida, J. Gen. Virol. 69, 35–47 (1988).
49. Garten, W., Kohama, T., und H-D. Klenk. J. Gen. Virol. 51, 207–211 (1980).
50. Gerrard, T.L., R. Thorpe, S. Jeffcoate und C. Reynolds, Biologicals 21, 77–79 (1993).
51. Ghendon, Y.Z., und Chernos, V.I., Acta Virol. 8, 359–368 (1964).
52. Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., und Kirn, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5573–5577 (1986).
53. Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P., Paoletti, E., Virology 179, 247–266 (1990).
54. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow und E. Paoletti, Virology 179, 517–563 (1990b).
55. Goldstein, D.J. und S.K. Weller, Virology 166, 41–51 (1988).
56. Greenberg, P.D., Adv. Immunol. 49, 281–355 (1991).
57. Gubler, U., A.O. Chua, D. S. Schoenhaut, C. D. Dwyer, W. McComas, R. Motyka, M. Nabavi, A.G. Wolitzky, P.M. Quinn, P.C. Familletti und M.K. Gately, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4143–4147 (1991).
58. Guo, P., Goebel, S., Davis, S., Perkus, M.E., Languet, B., Desmettre, P., Allen, G., und Paoletti, E., J. Virol. 63, 4189–4198 (1989).
59. Hareuveni et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9498–9502 (1990).
60. Hareuveni et al., Vaccine 9(5), 618–626 (1991).
61. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., Science 253, 49–53 (1991).
62. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, C.C. Harris, Science 253, 49–53 (1991).
63. Homma, M., und M. Ohuchi, J. Virol. 12, 1457–1465 (1973).
64. Hruby, D.E. und L.A. Ball, J. Virol. 43, 403–409 (1982).
65. Hruby, D.E., R.A. Maki, D.B. Miller und L.A. Ball, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3411–3415 (1983).
66. Hu, S.-L., Plowman, G.D., Sridhar, P., Stevenson, U.S., Brown, J.P., Estin, C.D., J. Virol. 62, 176–180 (1988).
67. Ichihashi, Y. und Dales, S., Virology 46, 533–543 (1971).
68. Itamura, S., H. Iinuma, H. Shida, Y. Morikawa, K. Nerome und A. Oya, J. Gen. Virol. 71., 2859–2865 (1990).
69. Jacobson, J.G., D.A. Leib, D.J. Goldstein, C.L. Bogard, P.A. Schaffer, S.K. Weller und D.M. Coen, Virology 173, 276–283 (1989).
70. Jamieson, A.T., G.A. Gentry und J.H. Subak-Sharpe, J. Gen. Virol. 24, 465–480 (1974).
71. Kantor, J., K. Irvine, S. Abrams, P. Snoy, R. Olsen, J. Greiner, H. Kaufman, D. Eggensperger, und J. Schlom. Cancer Res 52, 24 (1992).
72. Karupiah, G., R. V. Blanden, und I. A. Ramshaw, J. Exp. Med. 172, 1495–1503 (1990).

73. Karupiah, G., A.J. Ramshaw, I.A. Rarmshaw, und R.V. Blanden, Scand. J. Immunol. 36, 99–105 (1992).
74. Kato, S., M. Takahashi, S. Kameyama und J. Kamahora, Biken's 2, 353–363 (1959).
75. Kaufman, H., Schlom, J., Kantor, J., Int. J. Cancer 48, 900–907 (1991).
76. Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., und Lecocq, J.P., Nature (London) 312, 163–166 (1984).
77. Kingston, R., Preparation of poly $(A)^+$ RNA. Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., und Struhl, K., Hrsg. S. 4.5.1. John Wiley and Sons, N.Y. (1987).
78. Kleitmann W., Schottle A., Kleitmann B., et al., In Cell Culture Rabies Vaccines and Their Protective Effect in Man., Hrsg. Kuwert/Wiktor/Koprowski, (International Green Cross-Genf) S. 330–337 (1981).
79. Klickstein, L., und Neve, R.. Preparation of insert DIVA from messenger RNA, Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., und Struhl, K., Hrsg. S. 5.5.1.–5.5.10. John Wiley and Sons, N.Y, (1987).
80. Knapp B., Hundt, E., Nau, U., und Kupper, H., Molecular cloning, genomic structure, and localization in a blood stage antigen of Plasmodium falciparum characterized by a serine stretch. Molec. Biochem. Parasitol. 32, 73–84 (1989).
81. Knauf, V.C. und Nester, E.W., Plasmid 8, 45–54 (1982).
82. Kohonen-Corish, M. R. J., N. J. C. King, C. E. Woodhams und I.A. Ramshaw, Eur. J. Immunol. 20, 157–263 (1990).
83. Kotwal, G.J., A.W. Hugin und B. Moss, Virology 171, 579–587 (1989a).
84. Kotwal, G.J. und B. Moss, J. Virol. 63, 600–606 (1989b).
85. Kotwal, G.J., S.N. Isaacs, R. McKenzie, M.M. Frank und B. Moss, Science 250, 827–830 (1990).
86. Kotwal, G.J. und Moss, B., Nature (Lond.) 335, 176–178 (1988).
87. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., et al., Cell 53, 45–53 (1988).
88. Kuwert E.K., Barsenbach C., Werner J., et al., In Cell Culture Rabies Vaccines and Their Protection Effect in Man, Hrsg. Kuwert/Wiktor/Koprowski (International Green Cross-Genf) S. 160–167 (l981).
89. Lai, A.C.-K. und B.G.-T. Pogo, Virus Res. 12, 239–250 (1989).
90. Lamb, P. und Crawford, L., Mol. Cell. Biol. 6, 1379–1385 (1986).
91. Lathe, R.S., Kieny, M.P., Gerlinger, P., Clertant, P., Guizani, I., Cuzin, F.P. und Chambon. Nature 326, 878–880 (1987).
92. Le, L., R. Brasseur, C. Wemers, G. Meulemans, und A. Burny, Virus Genes 1, 333–350 (1988).
93. Li, W., Bzik, D., Horii, T., und Inselburg, J., Molec. Biochem. Parasitol. 33, 13–26 (1989).
94. Landenmann, J. und P.A. Klein, J. Exp. Med. 126, 93–108 (1967).
95. Lindenmann J., Biochim. Biophys. Acta. 355, 49–75 (1974).
96. Lopez, A.F., M.J. Elliott, J. Woodcock und M.A. Vadas, Immunology Today 13, 495–500 (1992).
97. Mandecki, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7177–7182 (1986).
98. Maniatis, T., Fritsch, E.F., und Sambrook, J. In Molecular cloning: a laboratory manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1982).
99. Matthews, R.E.F., Intervirology 17, 42–44 (1982b).
100. McGinnes, L.W., und T.G. Morrison, Virus Research 5, 343–356 (1986).
101. Merz, D.C., A. Scheid, und P. Choppin, J. Exper. Med. 151, 275–288 (1980).
102. Morgan, A.J., M. Mackett, S. Finerty, J.R. Arrand, F.T. Scullion und M.A. Epstein, J. Med. Virol. 25, 189–195 (1988).
103. Moss, B., E. Winters und J.A. Cooper, J. Virol. 40, 387–395 (1981).
104. Nagai, Y., H.D. Klenk, und R. Rott, Virology 72, 494–508 (1976).
105. Nagai, Y., T. Yoshida, M. Hamaguchi, H. Naruse, M. Iinuma, K. Maeno, und T. Matsumoto, Microbiol. Immunol. 24, 173–177 (1980).
106. Norrby, E., und Y. Gollmar, Infect. and Immun. 11, 231–239 (2975).
107. Ogawa, R., N. Yanagida, S. Saeki, S. Saito, S. Ohkawa, H. Gotoh, K. Kodama, K. Kamogawa, K. Sawaguchi und Y. Iritani, Vaccine 8, 486–490 (1990).
108. Paez, E., S. Dallo und M. Esteban, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3365–3369 (1985).
109. Palumbo, G.J., Pickup, D.J., Fredrickson, T.N., Mcintyre, L.J., und Biller, R.M.L., Virology 172, 262–273 (1989).
110. Panicali, D. und E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927–4931 (1982).
111. Panicali, D., Davis, S.W., Mercer, S.R., und Paoletti, E.,J. Virol. 37, 1000–1010 (1981).
112. Pardoll, D., Current Opinion in Immunology 4, 619–623 (1992).
113. Patel, D.D. und Pickup, D.J., EMBO 6, 3787–3794 (1987).
114. Patel, D.D., Ray, C.A., Drucker, R.P., und Pickbup, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9431–9435 (1988).
115. Pennica, D., D.V, Goeddel, J.S. Hayflick, N.C. Reich, C.W. Anderson und A.J. Levine, Virology 134, 477–482 (1984).

116. Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P. Johnson, E.K. Norton und E. Paoletti, Virology 180, 406–410 (1991).
117. Perkus, M.E., Goebel, S.J., Davis, S.W., Johnson, G.P., Limbach, K., Norton, E.K., und Paoletti, E., Virology 179, 276–286 (1990).
118. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas und E. Paoletti, Science 229, 981–984 (1985).
119. Perkus, M.E., Limbach, K., und Paoletti, E., J. Virol. 63, 3829–3836 (1989).
120. Perkus, M.E., D. Panicali, S. Mercer und E. Paoletti, Virology 152, 285–297 (1986).
121. Perkus M.E., Piccini A., Lipinskas B.R., et al., Science 229, 981–984 (1985).
122. Piccini, A., M.E. Perkus, und E. Paoletti, Methods in Enzymology 153, 545–563 (1987).
123. Pickup, D.J., B.S. Ink, B.L. Parsons, W. Hu und W.K. Joklik, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6817–6521 (1984).
124. Pickup, D.J., B.S. Ink, W. Hu, C.A. Ray und W.K. Joklik, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7698–7702 (1986).
125. Pratt, D. und S. Subramani, Nucleic Acids Research 11, 8817–8823 (1983).
126. Ramshaw, I.A., J. Ruby und A. Ramsay, Tibtech 10, 424–426 (1992).
127. Reed, L.J. und Muench, H., Am. J. Hyg. 27, 493–497 (1938).
128. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., Greenberg, P.D., Science 257, 238–241 (1992).
129. Ronen, D., Teitz, Y., Goldfinger, N., Rotter, V. Nucleic Acids Research 20, 3435–3441 (1992).
130. Rosenberg, S.A., J. of Clinical Oncology 10, 180–199 (1992).
131. Ruby, J., A. Ramsey, G. Darupiah, & I. Ramshaw, Vaccine Res. 4, 347–356 (1992).
132. Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., und Erlich, H., Science 239, 487–491 (1988).
133. Sanger, F., Nickeln, S. Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463–5467 (1977).
134. Schmidtt, J.F.C. und H.G. Stunnenberg, J. Virol. 62, 1889–1897 (1988).
135. Schwartz, R.H., Cell 71, 1065–1068 (1992).
136. Seligmann, E.B., In Laboratory Techniques in Rabies, Hrsg. M.M. Kaplan und H. Koprowski, (World Health Organization, Genf) S. 279–285 (1973).
137. Shapira, S.K., Chou, J., Richaud, F.V. und Casadaban, M.J., Gene 25, 71–82 (1983).
138. Shida, H., T. Tochikura, T. Sato, T. Konno, K. Hirayoshi, M. Seki, Y. Ito, M. Hatanaka, Y. Hinuma, M. Sugimoto, F. Takahashi-Nishimaki, T. Maruyama, K. Miki, K. Suzuki, M. Morita, H. Sashiyama und M. Hayami, EMBO 6, 3379–3384 (1987).
139. Shida, H., Hinuma, Y., Hatanaka, M., Morita, M., Kidokoro, M., Suzuki, K., Maruyzam, T., Takahashi-Nishimaki, F., Sugimoto, M., Kitamura, R., Miyazawa, T., und Hayami, M., J. Virol. 62, 4474–4480 (1988).
140. Shida, H., Virology 150, 451–462 (1986).
141. Shimizu, Y.H. Fujiwara, S. Ueda, N. Wakamiya, S. Kato, T. Hamaoka, Eur. J. Immunol. 14, 839–843 (1984).
142. Shimizu, Y., K. Hasumi, K. Masubuchi & Y. Okudaira, Cancer Immunol. Immunother. 27, 223–227 (1988).
143. Slabaugh, M., N. Roseman, R. Davis und C. Mathews, J. Virol. 62, 519–527 (1988).
144. Smith, J.S., P.A. Yager und G.M. Baer, In Laboratory Techniques in Rabies, Hrsg. M.M. Kaplan und H. Koprowski (WHO Genf) S. 354–357 (1973).
145. Stanberry, L.R., S. Kit und M. G. Myers, J. Virol. 55, 322–328 (1985).
146. Tabor, S. und C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767–4771 (1987).
147. Tan, T., Wallis, J., Levine, A., Journal of Virology 59, 574–583 (1986).
148. Tartaglia, J., Pincus, S., Paoletti, E., Critical Reviews in Immunology 10, 13–30 (1990a).
149. Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.-C., Cox, W.I., Davis, S.W., Van Der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., Paoletti, E., Virology 188, 217–232 (1992).
150. Tartaglia, J., J. Taylor, W.I. Cox, J.-C. Audonnet, M.E. Perkus, A. Radaelli, C. de Giuli Morghen, B. Meignier, M. Riviere, K. Weinhold & Paoletti, E. In AIDS Research Reviews, W. Koff, F. Wong-Staal & R.C. Kenedy, Hrsg., Bd. 3, Marcel Dekker, NY (In Druck) (1993a).
151. Tartaglia, J. & Paoletti, E. In Immunochemistry of Viruses, II. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines. M.H.V. van Regenmortel & A.R. Neurath, Hrsg. 125–151. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990b).
152. Tartaglia, J., Jarrett, O., Desmettre, P., Paoletti, E. J. Virol. 67, 2370–2375 (1993b).
153. Tartaglia, J., R. Gettig & E. Paoletti. Encylopedia of Virology (Bd. I), Hrsg. Webster, R.G., und A. Granoff, Academic Press Limited, London, im Druck.
154. Taylor, J., C. Trimarchi, R. Weinberg, B. Languet, F. Guillemin, P. Desmettre und E. Paoletti, Vaccine 9, 190–193 (1991b).
155. Taylor, G., E.J. Stott, G. Wertz und A. Ball, J. Gen. Virol. 72, 125–130 (1991a).
156. Taylor, J., Edbauer, C., Rey-Senelonge, A., Bouquet, J.-F., Norton, E., Goebel, S., Desmettre, P., Paoletti, E., J. Virol. 64, 1441–1450 (1990).
157. Taylor, J., R. Weinberg, J. Tartaglia, C. Richardson, G. Alkhatib, D. Briedis, M. Appel, E. Norton & E. Pa-

oletti, Virology 187, 321–328 (1992).
158. Taylor, J., Weinberg, R., Kawaoka, Y., Webster, R.G., und Paoletti, E., Vaccine 6, 504–508 (1988a).
159. Taylor, J., R. Weinberg, B. Lanquet, P. Desmettre, und E. Paoletti, Vaccine 6, 497–503 (1988b).
160. Taylor, J., C. Trimarchi, R. Weinberg, B. Languet, F. Guillemin, P. Desmettre & E. Paoletti, Vaccine 9, 190 (1991).
161. Toyoda, T., T. Sakaguchi, K. Imai, N.M. Inocencio, B. Gotoh, M. Hamaguchi, und Y. Nagai, Virology 158, 242–247 (1987).
162. Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., Boon, T., J. Exp. Med. 176, 1453–1457 (1992).
163. Trinchieri, G., Imm. Today 14, 335–338 (1993)
164. Ulrich, S.J., Anderson, C.W., Mercer, W.E., Appella, E., J. Biol. Chem. 267, 15259–15262 (1992).
165. van der Bruggen, P. und Van der Eynde, B., Curr. Topics in Immunology 4, 608–612 (1992).
166. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van de Eynde, B., Knuth, A., Boon, T., Science 254, 1643–1647 (1991).
167. Vogel, S.N., R.M. Friedman, und M.M. Hogan, Current Protocols in Immunology, 6.9.1–6.9.8 (1991).
168. Wallack, M.K., K.R. McNally, E. Leftheriotis, H. Seigler, C. Balch, H. Wanebo, A. Bartolucci & J.A. Bash, Cancer 57, 649–655 (1986).
169. Watson, C., und Jackcson, J., In DNA Cloning, Band I: a practical approach, Glover, D.M., Hrsg. S. 79–88 (IRL Press, Oxford) (1985).
170. Weir, J.P. und B. Moss, J. Virol. 46, 530–537 (1983).
171. Yamamoto, T., S. Ikawa, T. Akiyama, K. Semba, N. Nomura, N. Miyajima, T. Saito und K. Toyoshima, Nature 319, 230–234 (1986).
172. Yuen, L. und B. Moss, J. Virol. 60, 320–323 (1986).
173. Yuen, L., und Moss, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6417–6421 (1987).
174. Zhou, J., L. Crawford, L. McLean, X. Sun, M. Stanley, N. Almond und G.L. Smith, J. Gen. Virol. 71, 2185–2190 (1990).

Patentansprüche

1. Modifiziertes rekombinantes Avipoxvirus, wobei das modifizierte rekombinante Virus Virus-codierte genetische Funktionen hat, die darin inaktiviert sind, sodass das Virus eine abgeschwächte Virulenz bei aufrecht erhaltener Wirksamkeit aufweist; und wobei das Virus des weiteren exogene DNA in einer nicht essentiellen Region des Virusgenoms umfasst, wobei die exogene DNA zumindest ein Cytokin und ein Tumor-assoziiertes Antigen codiert.

2. Virus nach Anspruch 1, wobei das Virus ein Kanarienpockenvirus ist.

3. Virus nach Anspruch 1 oder 2, wobei die exogene DNA mindestens eines der folgenden codiert: menschlicher Tumornekrosefaktor; nukleäres Phosphoprotein p53 als Wildtyp oder Mutante; menschliches Melanom-assoziiertes Antigen; IL-2; IFNγ; IL-4; GM-CSF; IL-12; B7; erb-B-2 und carcinoembryonales Antigen (CEA).

4. Rekombinantes Avipoxvirus nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Kanarienpockenvirus durch mehr als 200 serielle Passagen auf Hühnerembryofibroblasten abgeschwächt wurde, vier aufeinander folgenden Plaqueaufreinigungen unterzogen wurde, und durch fünf zusätzliche serielle Passagen amplifiziert wurde.

5. Rekombinantes Avipoxvirus nach Anspruch 1, das ein Geflügelpockenvirus ist, das eine abgeschwächte Virulenz durch ungefähr 50 serielle Passagen in embryonierten Hühnereiern hat, gefolgt von 25 Passagen auf Hühnerembryofibroblastenzellen, Durchführung von vier aufeinanderfolgenden Plaqueaufreinigungen mit dem Geflügelpockenvirus, und dem weiteren Amplifizieren eines Plaqueisolats in primären Hühnerembryofibroblasten.

6. Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das ein ALVAC-rekombinantes Virus ist.

7. Arzneimittel, umfassend ein Virus wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 beansprucht unter Beimengung eines geeigneten Trägers.

8. Zusammensetzung zum Induzieren einer antigenen oder immunologischen Antwort, umfassend ein Virus wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 beansprucht unter Beimengung eines geeigneten Trägers.

9. Verfahren zum Exprimieren eines Genprodukts in einer in vitro gezüchteten Zelle, umfassend das Einbringen eines Virus wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 beansprucht in eine Zelle.

Es folgen 33 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

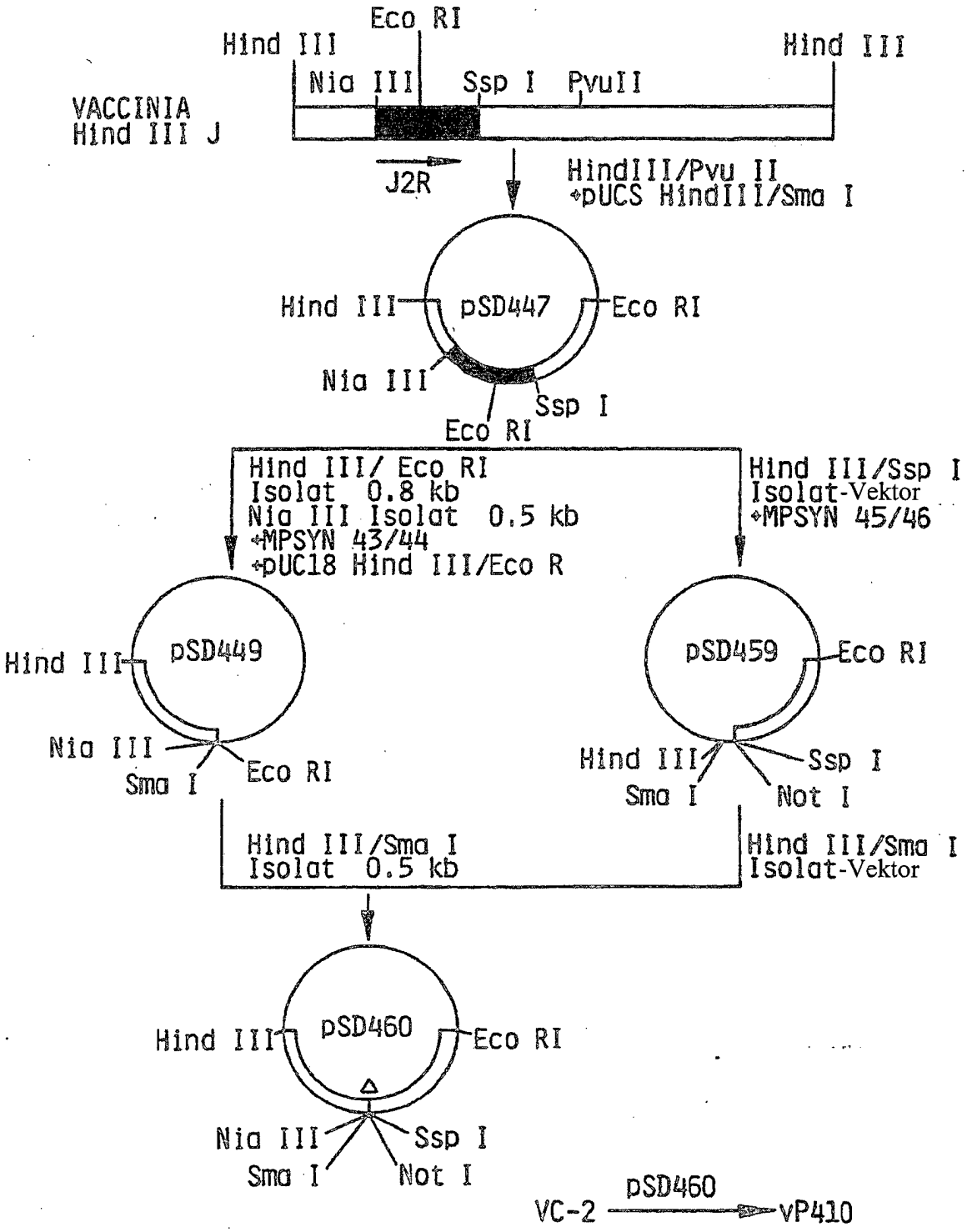


FIG. 1

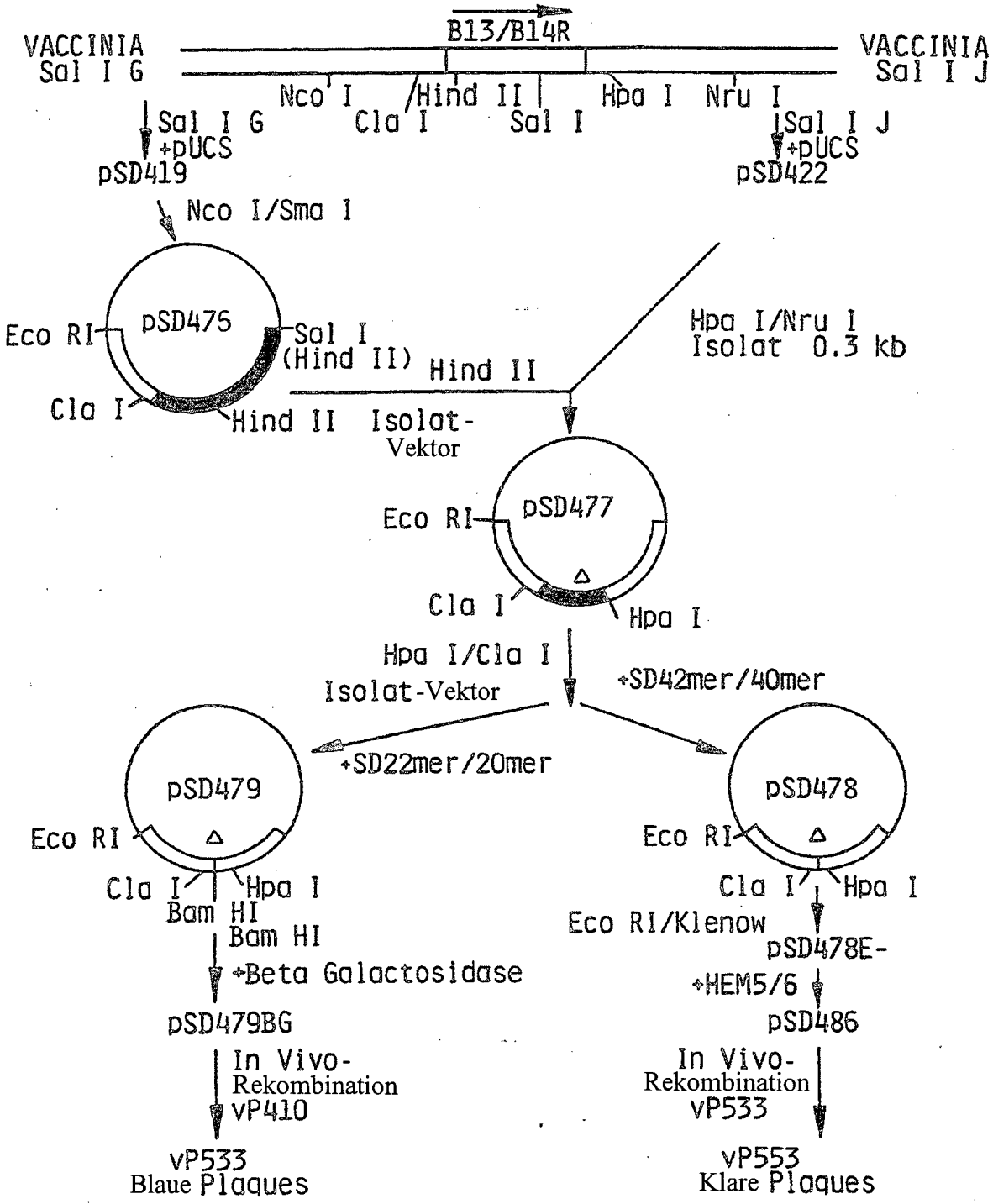

VACCINIA
Sal I G
B13/B14R
VACCINIA
Sal I J
Nco I
Hind II
Hpa I
Nru I
Sal I G
Cla I
Sal I
Sal I J
+pUCS
pSD419
+pUCS
pSD422
Nco I/Sma I
Eco RI
pSD475
Sal I
(Hind II)
Hind II
Cla I
Hind II
Isolat-
Vektor
Hpa I/Nru I
Isolat 0.3 kb
Eco RI
pSD477
Cla I
Hpa I
Hpa I/Cla I
Isolat-Vektor
+SD42mer/40mer
+SD22mer/20mer
pSD479
pSD478
Eco RI
Eco RI
Cla I
Hpa I
Bam HI
Bam HI
Cla I
Hpa I
Eco RI/Klenow
pSD478E-
+Beta Galactosidase
+HEM5/6
pSD479BG
pSD486
In Vivo-
Rekombination
vP410
In Vivo-
Rekombination
vP533
vP533
Blaue Plaques
vP553
Klare Plaques

FIG.2

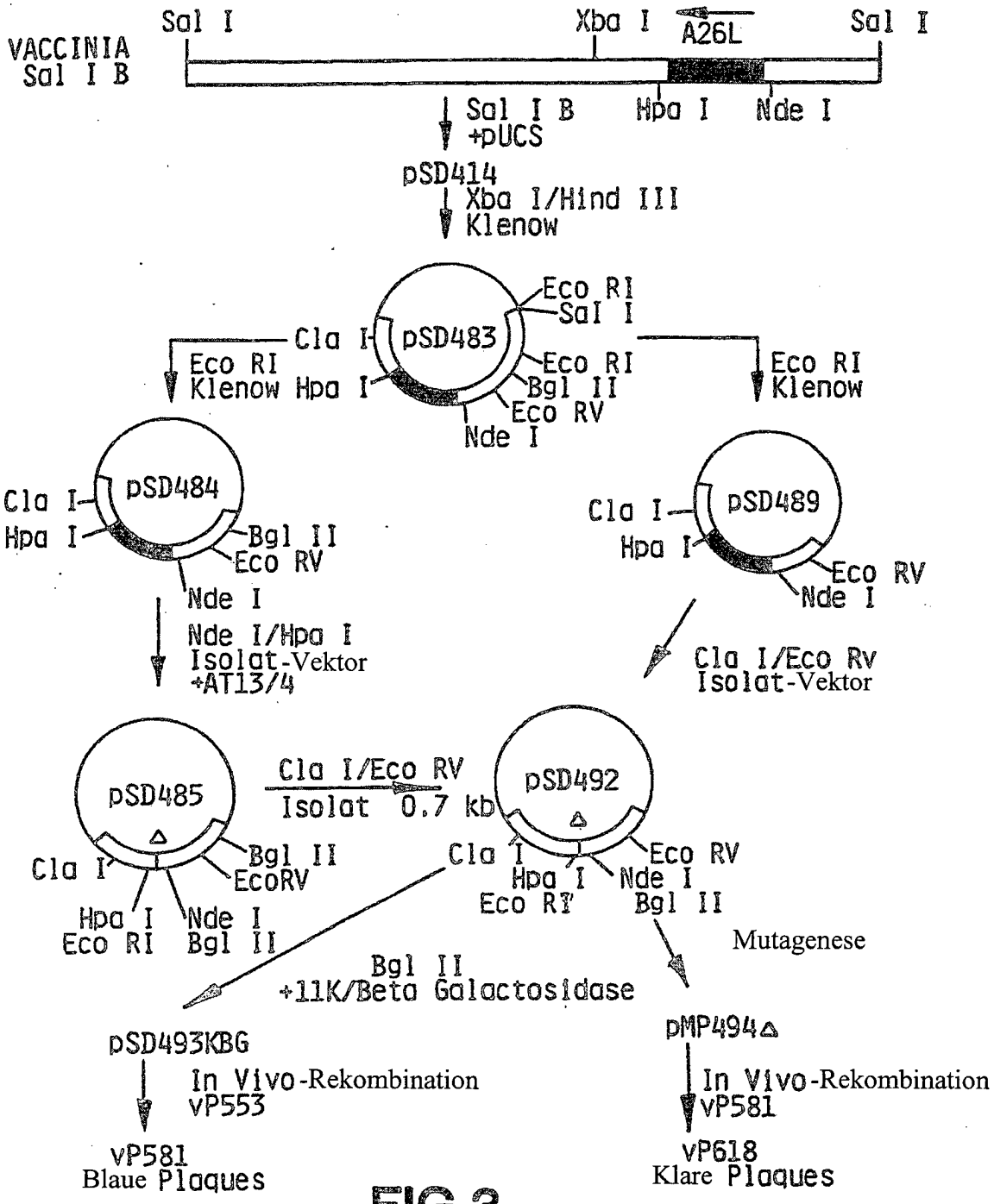

VACCINIA
Sal I B
Sal I
Xba I
A26L
Sal I
Sal I B
Hpa I
Nde I
+pUCS
pSD414
Xba I/Hind III
Klenow
pSD483
Cla I
Eco RI
Klenow Hpa I
Eco RI
SaI I
Eco RI
Bgl II
Eco RV
Nde I
Eco RI
Klenow
pSD484
Cla I
Hpa I
Bgl II
Eco RV
Nde I
Nde I/Hpa I
Isolat-Vektor
+AT13/4
pSD489
Cla I
Hpa I
Eco RV
Nde I
Cla I/Eco Rv
Isolat-Vektor
pSD485
Cla I
Bgl II
EcoRV
Hpa I
Eco RI
Nde I
Bgl II
Cla I/Eco RV
Isolat 0.7 kb
pSD492
Cla I
Hpa I
Eco RI
Eco RV
Nde I
Bgl II
Mutagenese
Bgl II
+11K/Beta Galactosidase
pSD493KBG
In Vivo-Rekombination
vP553
vP581
Blaue Plaques
pMP494Δ
In Vivo-Rekombination
vP581
vP618
Klare Plaques

FIG.3

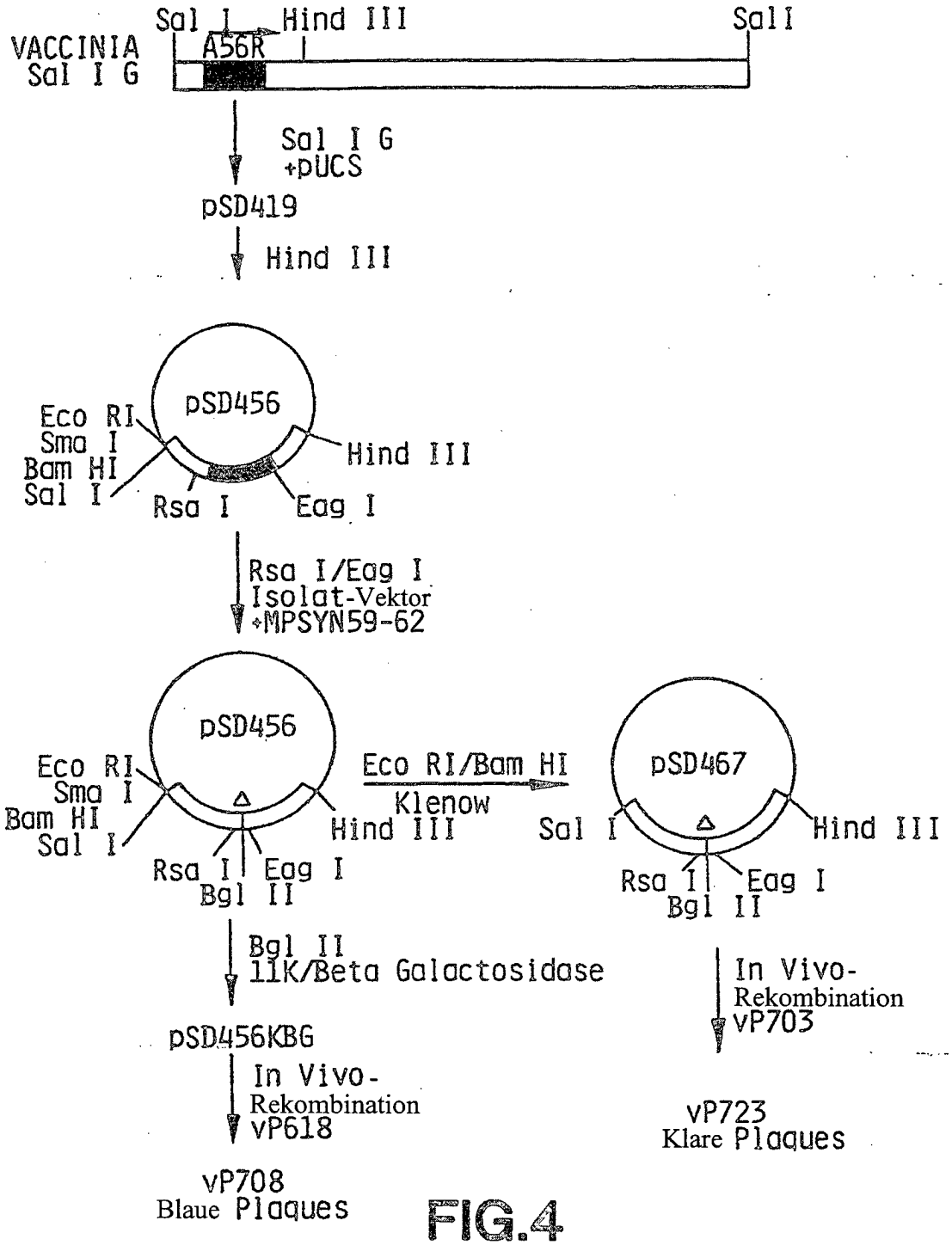

Sal I
Hind III
Sal I
VACCINIA
Sal I G
A56R
Sal I G
+pUCS
pSD419
Hind III
pSD456
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Rsa I
Eag I
Hind III
Rsa I/Eag I
Isolat-Vektor
+MPSYN59-62
pSD456
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Rsa I
Eag I
Bgl II
Hind III
Eco RI/Bam HI
Klenow
pSD467
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
Bgl II
Bgl II
11K/Beta Galactosidase
In Vivo-
Rekombination
vP703
pSD456KBG
In Vivo-
Rekombination
vP618
vP723
Klare Plaques
vP708
Blaue Plaques

FIG.4

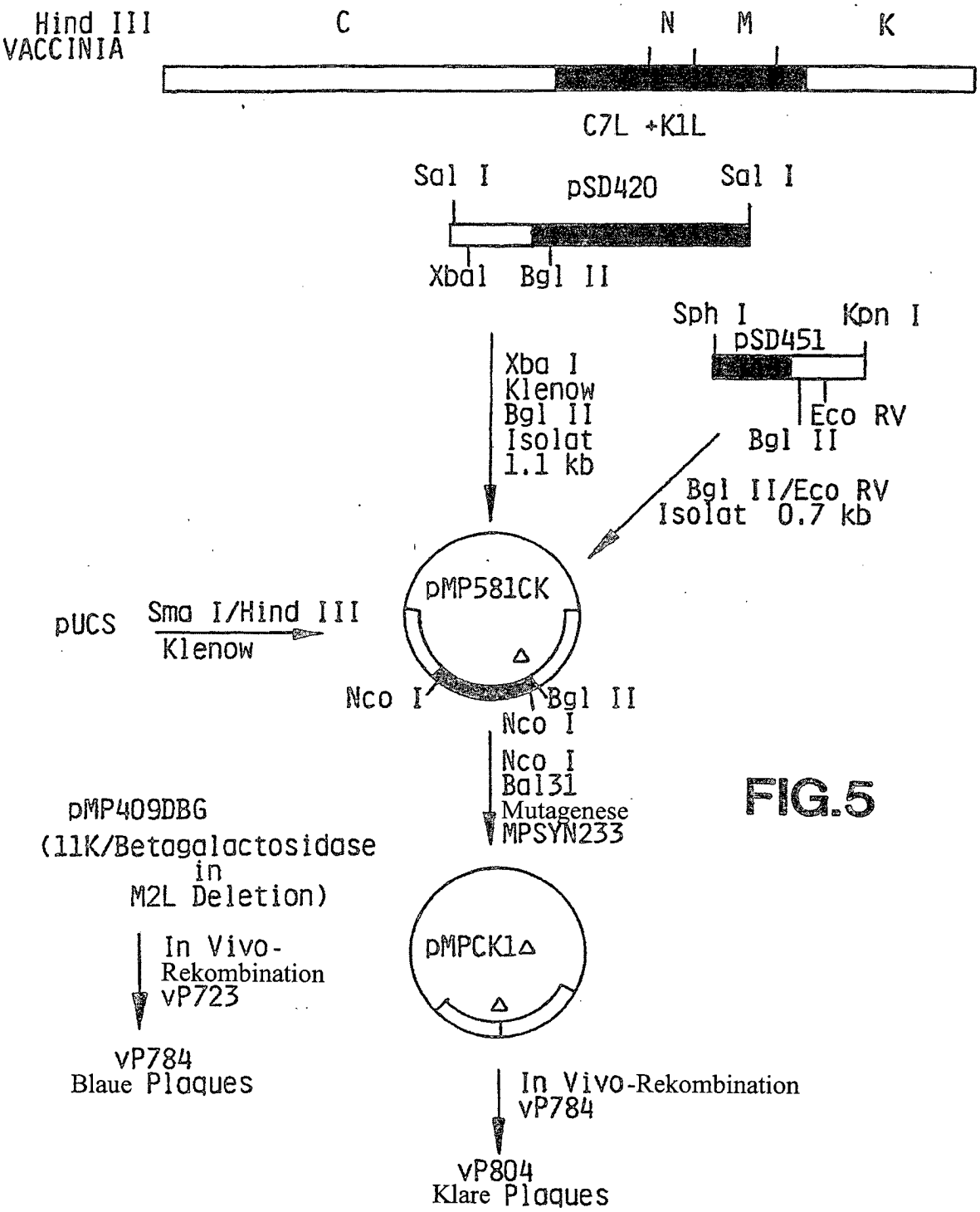

Hind III
VACCINIA
C
N
M
K
C7L +K1L
Sal I
pSD420
Sal I
Xbal
Bgl II
Sph I
Kpn I
pSD451
Eco RV
Bgl II
Xba I
Klenow
Bgl II
Isolat
1.1 kb
Bgl II/Eco RV
Isolat 0.7 kb
pMP581CK
pUCS
Sma I/Hind III
Klenow
Nco I
Bgl II
Nco I
Nco I
Bal31
Mutagenese
MPSYN233
pMP409DBG
(11K/Betagalactosidase
in
M2L Deletion)
pMPCK1Δ
In Vivo-
Rekombination
vP723
vP784
Blaue Plaques
In Vivo-Rekombination
vP784
vP804
Klare Plaques

FIG.5

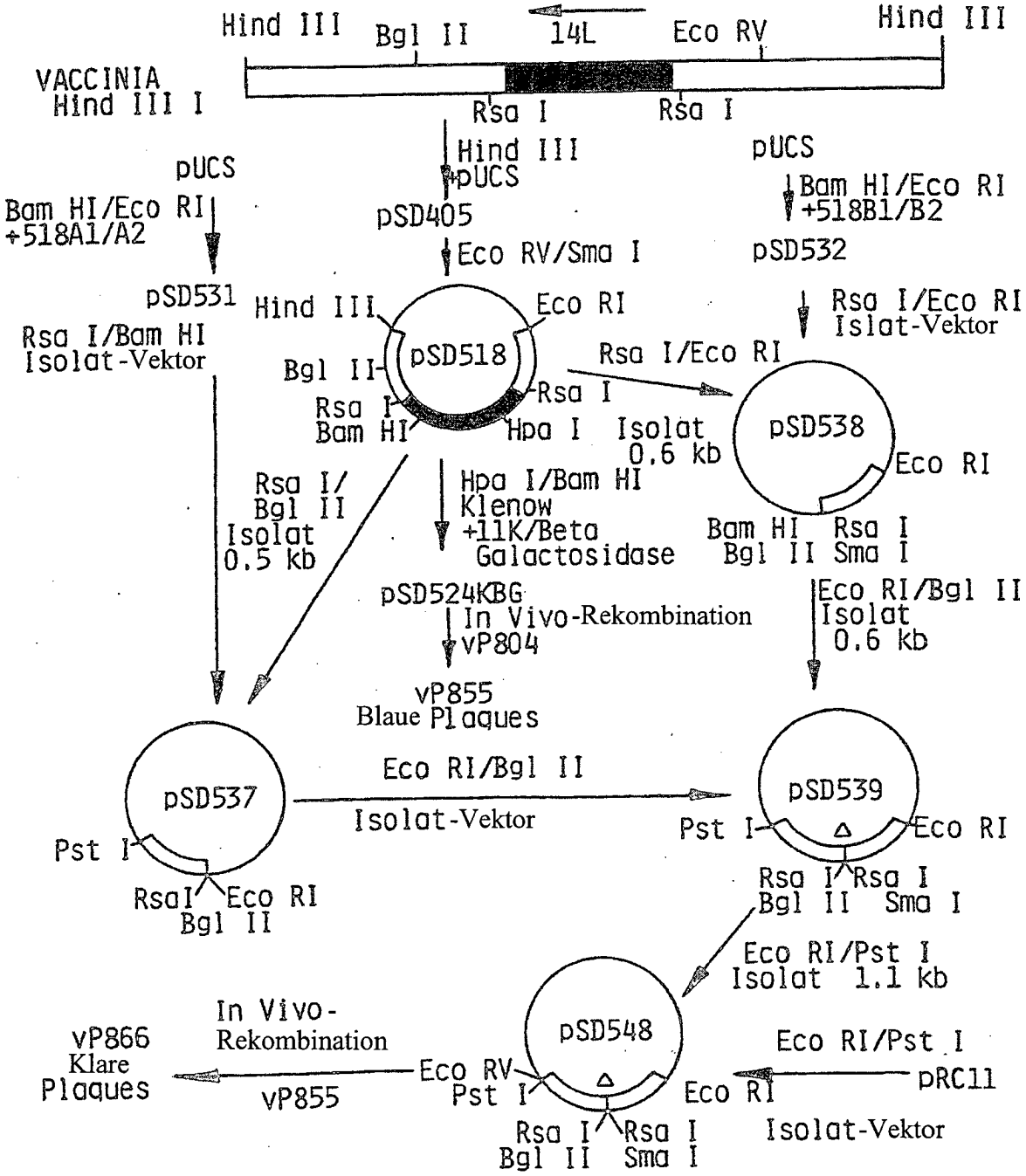

Hind III
Bgl II
14L
Eco RV
Hind III
VACCINIA
Hind III I
Rsa I
Rsa I
Hind III
pUCS
pUCS
pUCS
Bam HI/Eco RI
+518A1/A2
pSD405
Bam HI/Eco RI
+518B1/B2
Eco RV/Sma I
pSD532
pSD531
Hind III
Eco RI
Rsa I/Eco RI
Islat-Vektor
Rsa I/Bam HI
Isolat-Vektor
pSD518
Rsa I/Eco RI
Bgl II
Rsa I
Rsa I
Bam HI
Hpa I
Isolat
0.6 kb
pSD538
Eco RI
Rsa I/
Bgl II
Isolat
0.5 kb
Hpa I/Bam HI
Klenow
+11K/Beta
Galactosidase
Bam HI
Rsa I
Bgl II
Sma I
pSD524KBG
In Vivo-Rekombination
vP804
Eco RI/Bgl II
Isolat
0.6 kb
vP855
Blaue Plaques
pSD537
Eco RI/Bgl II
Isolat-Vektor
pSD539
Pst I
Eco RI
Pst I
RsaI
Eco RI
Bgl II
Rsa I
Rsa I
Bgl II
Sma I
Eco RI/Pst I
Isolat 1.1 kb
In Vivo-
Rekombination
pSD548
vP866
Klare
Plaques
Eco RV
Pst I
Eco RI/Pst I
pRC11
vP855
Eco RI
Isolat-Vektor
Rsa I
Rsa I
Bgl II
Sma I

FIG.6

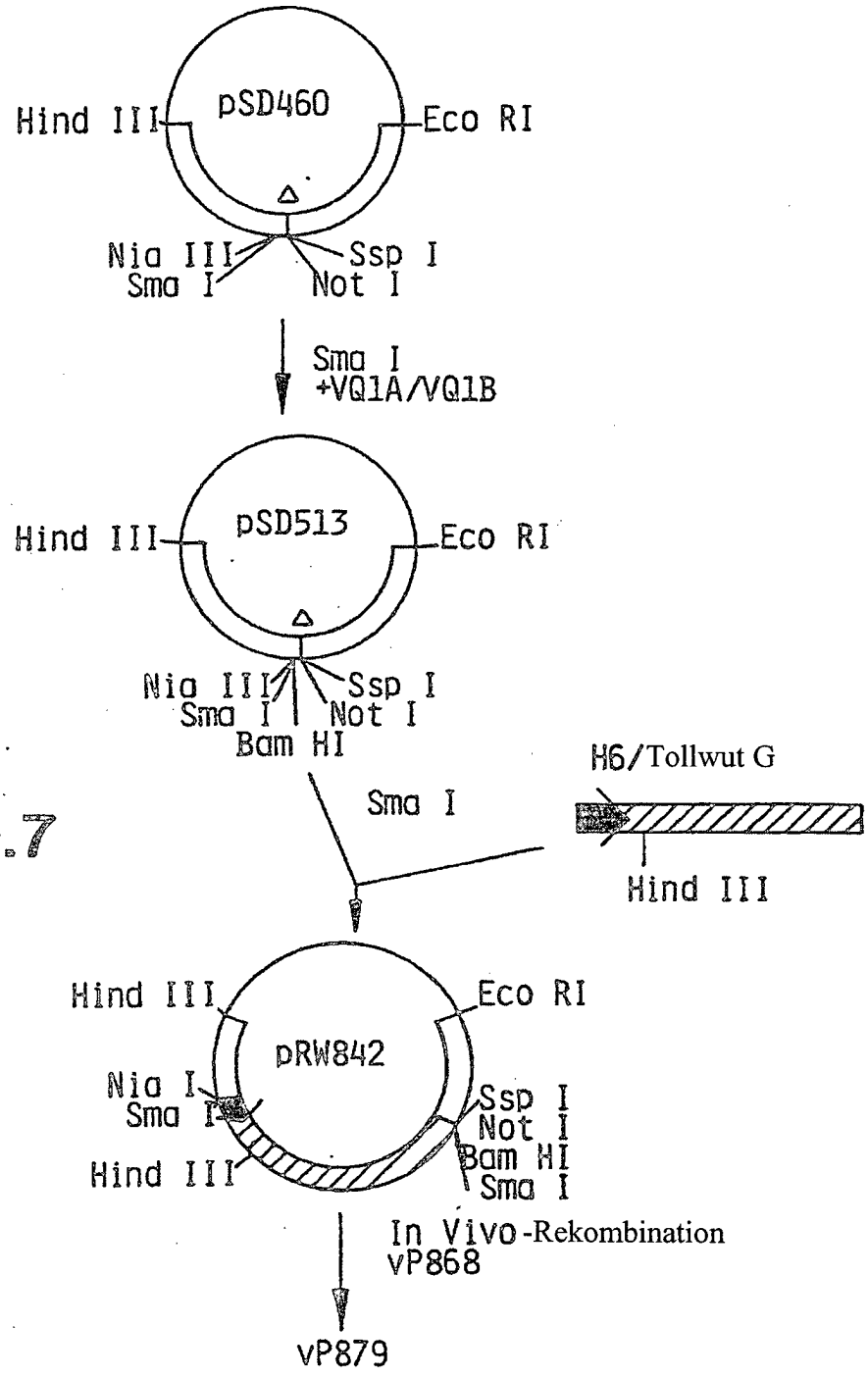

Hind III
pSD460
Eco RI
Nia III
Sma I
Ssp I
Not I
Sma I
+VQ1A/VQ1B
Hind III
pSD513
Eco RI
Nia III
Sma I
Ssp I
Not I
Bam HI
Sma I
H6/Tollwut G
Hind III
Hind III
pRW842
Eco RI
Nia I
Sma I
Ssp I
Not I
Bam HI
Sma I
Hind III
In Vivo-Rekombination
vP868
vP879

FIG.7

```
   1 TGAATGTTAA ATGTTATACT TTGGATGAAG CTATAAATAT GCATTGGAAA AATAATCCAT
  61 TTAAAGAAAG GATTCAAATA CTACAAAACC TAAGCGATAA TATGTTAACT AAGCTTATTC
 121 TTAACGACGC TTTAAATATA CACAAATAAA CATAATTTTT GTATAACCTA ACAAATAACT
 181 AAAACATAAA AATAATAAAA GGAAATGTAA TATCGTAATT ATTTTACTCA GGAATGGGGT
 241 TAAATATTTA TATCACGTGT ATATCTATAC TGTTATCGTA TACTCTTTAC AATTACTATT
 301 ACGAATATGC AAGAGATAAT AAGATTACGT ATTTAAGAGA ATCTTGTCAT GATAATTGGG
 361 TACGACATAG TGATAAATGC TATTTCGCAT CGTTACATAA AGTCAGTTGG AAAGATGGAT
 421 TTGACAGATG TAACTTAATA GGTGCAAAAA TGTTAAATAA CAGCATTCTA TCGGAAGATA
 481 GGATACCAGT TATATTATAC AAAAATCACT GGTTGGATAA AACAGATTCT GCAATATTCG
 541 TAAAAGATGA AGATTACTGC GAATTTGTAA ACTATGACAA TAAAAAGCCA TTTATCTCAA
 601 CGACATCGTG TAATTCTTCC ATGTTTTATG TATGTGTTTC AGATATTATG AGATTACTAT
 661 AAACTTTTTG TATACTTATA TTCCGTAAAC TATATTAATC ATGAAGAAAA TGAAAAAGTA
 721 TAGAAGCTGT TCACGAGCGG TTGTTGAAAA CAACAAAATT ATACATTCAA GATGGCTTAC
 781 ATATACGTCT GTGAGGCTAT CATGGATAAT GACAATGCAT CTCTAAATAG GTTTTTGGAC
 841 AATGGATTCG ACCCTAACAC GGAATATGGT ACTCTACAAT CTCCTCTTGA AATGGCTGTA
 901 ATGTTCAAGA ATACCGAGGC TATAAAAATC TTGATGAGGT ATGGAGCTAA ACCTGTAGTT
 961 ACTGAATGCA CAACTTCTTG TCTGCATGAT GCGGTGTTGA GAGACGACTA CAAAATAGTG
1021 AAAGATCTGT TGAAGAATAA CTATGTAAAC AATGTTCTTT ACAGCGGAGG CTTTACTCCT
1081 TTGTGTTTGG CAGCTTACCT TAACAAAGTT AATTTGGTTA AACTTCTATT GGCTCATTCG
1141 GCGGATGTAG ATATTTCAAA CACGGATCGG TTAACTCCTC TACATATAGC CGTATCAAAT
1201 AAAAATTTAA CAATGGTTAA ACTTCTATTG AACAAAGGTG CTGATACTGA CTTGCTGGAT
1261 AACATGGGAC GTACTCCTTT AATGATCGCT GTACAATCTG GAAATATTGA AATATGTAGC
1321 ACACTACTTA AAAAAAATAA AATGTCCAGA ACTGGGAAAA ATTGATCTTG CCAGCTGTAA
1381 TTCATGGTAG AAAAGAAGTG CTCAGGCTAC TTTTCAACAA AGGAGCAGAT GTAAACTACA
1441 TCTTTGAAAG AAATGGAAAA TCATATACTG TTTTGGAATT GATTAAAGAA AGTTACTCTG
1501 AGACACAAAA GAGGTAGCTG AAGTGGTACT CTCAAAATGC AGAACGATGA CTGCGAAGCA
1561 AGAAGTAGAG AAATAACACT TTATGACTTT CTTAGTTGTA GAAAAGATAG AGATATAATG
1621 ATGGTCATAA ATAACTCTGA TATTGCAAGT AAATGCAATA ATAAGTTAGA TTTATTTAAA
1681 AGGATAGTTA AAAATAGAAA AAAAGAGTTA ATTTGTAGGG TTAAAATAAT ACATAAGATC
1741 TTAAAATTTA TAAATACGCA TAATAATAAA AATAGATTAT ACTTATTACC TTCAGAGATA
1801 AAATTTAAGA TATTTACTTA TTTAACTTAT AAAGATCTAA AATGCATAAT TTCTAAATAA
1861 TGAAAAAAAA GTACATCATG AGCAACGCGT TAGTATATTT TACAATGGAG ATTAACGCTC
1921 TATACCGTTC TATGTTTATT GATTCAGATG ATGTTTTAGA AAAGAAAGTT ATTGAATATG
1981 AAAACTTTAA TGAAGATGAA GATGACGACG ATGATTATTG TTGTAAATCT GTTTTAGATG
2041 AAGAAGATGA CGCGCTAAAG TATACTATGG TTACAAAGTA TAAGTCTATA CTACTAATGG
2101 CGACTTGTGC AAGAAGGTAT AGTATAGTGA AAATGTTGTT AGATTATGAT TATGAAAAAC
2161 CAAATAAATC AGATCCATAT CTAAAGGTAT CTCCTTTGCA CATAATTTCA TCTATTCCTA
2221 GTTTAGAATA CTTTTCATTA TATTTGTTTA CAGCTGAAGA CGAAAAAAAT ATATCGATAA
2281 TAGAAGATTA TGTTAACTCT GCTAATAAGA TGAAATTGAA TGAGTCTGTG ATAATAGCTA
2341 TAATCAGAGA AGTTCTAAAA GGAAATAAAA ATCTAACTGA TCAGGATATA AAAACATTGG
2401 CTGATGAAAT CAACAAGGAG GAACTGAATA TAGCTAAACT ATTGTTAGAT AGAGGGGCCA
2461 AAGTAAATTA CAAGGATGTT TACGGTTCTT CAGCTCTCCA TAGAGCTGCT ATTGGTAGGA
2521 AACAGGATAT GATAAAGCTG TTAATCGATC ATGGAGCTGA TGTAAACTCT TTAACTATTG
2581 CTAAAGATAA TCTTATTAAA AAAAAATAAT ATCACGTTTA GTAATATTAA AATATATTAA
2641 TAACTCTATT ACTAATAACT CCAGTGGATA TGAACATAAT ACGAAGTTTA TACATTCTCA
2701 TCAAAATCTT ATTGACATCA AGTTAGATTG TGAAAATGAG ATTATGAAAT TAAGGAATAC
2761 AAAAATAGGA TGTAAGAACT TACTAGAATG TTTTATCAAT AATGATATGA ATACAGTATC
2821 TAGGGCTATA AACAATGAAA CGATTAAAAA TTATAAAAAT CATTTCCCTA TATATAATAC
2881 GCTCATAGAA AAATTCATTT CTGAAAGTAT ACTAAGACAC GAATTATTGG ATGGAGTTAT
2941 AAATTCTTTT CAAGGATTCA ATAATAAATT GCCTTACGAG ATTCAGTACA TTATACTGGA
3001 GAATCTTAAT AACCATGAAC TAAAAAAAAT TTTAGATAAT ATACATTAAA AAGGTAAATA
3061 GATCATCTGT TATTATAAGC AAAGATGCTT GTTGCCAATA ATATACAACA GGTATTTGTT
3121 TTTATTTTTA ACTACATATT TGATGTTCAT TCTCTTTATA TAGTATACAC AGAAAATTCA
3181 TAATCCACTT AGAATTTCTA GTTATCTAG
```

FIG.8

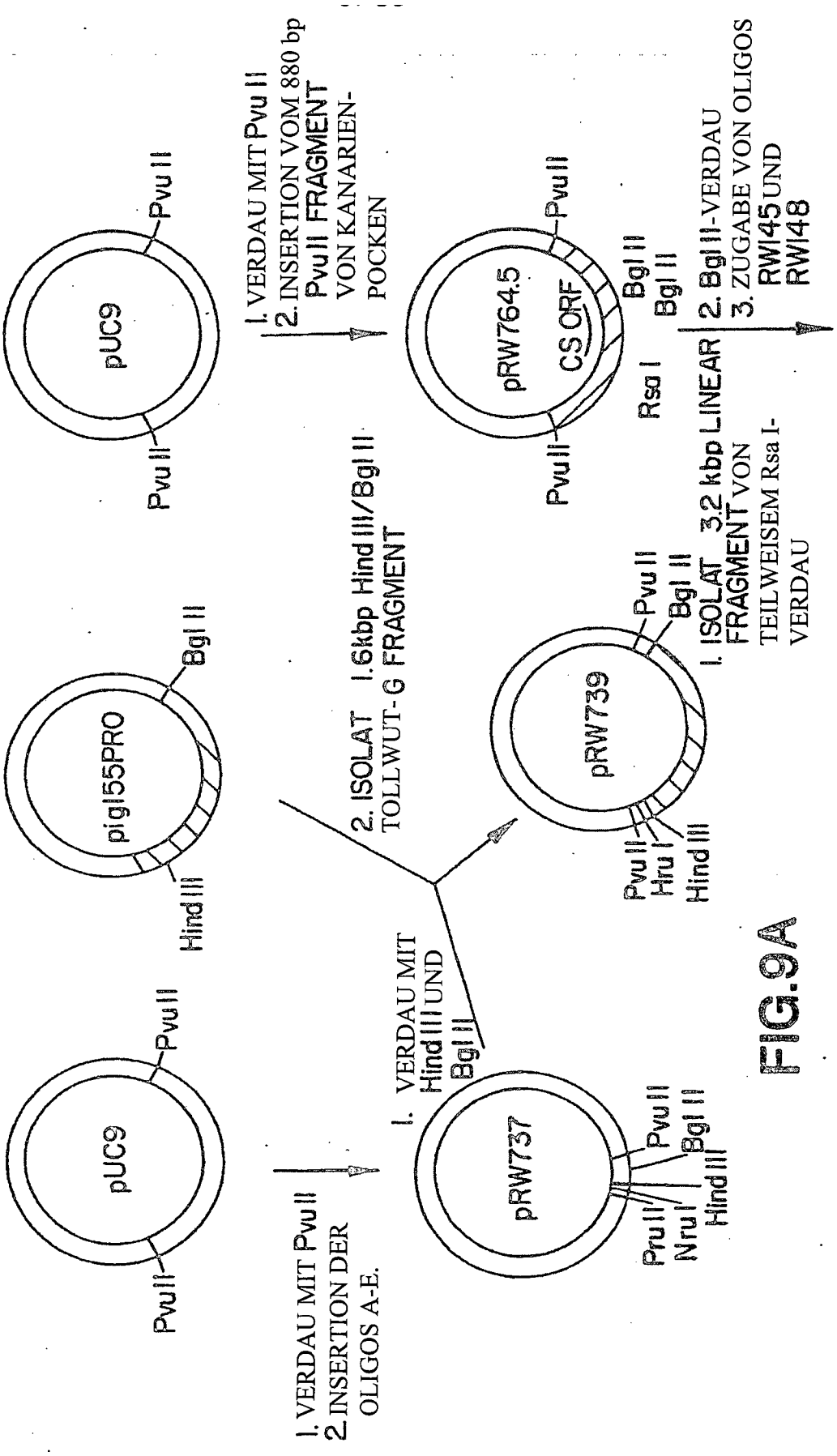

pUC9
Pvu II
Pvu II
1. VERDAU MIT Pvu II
2. INSERTION VOM 880 bp
PvuII FRAGMENT
VON KANARIEN-
POCKEN
pig155PRO
Bgl II
Hind III
2. ISOLAT 1.6kbp Hind III/Bgl II
TOLLWUT-G FRAGMENT
pRW764.5
Pvu II
CS ORF
Bgl II
Bgl II
Rsa I
Pvu II
2. Bgl II-VERDAU
3. ZUGABE VON OLIGOS
RW145 UND
RW148
1. ISOLAT 3.2 kbp LINEAR
FRAGMENT VON
TEILWEISEM Rsa I-
VERDAU
pRW739
Pvu II
Bgl II
Pvu II
Hru I
Hind III
1. VERDAU MIT
Hind III UND
Bgl II
pRW737
Pvu II
Bgl II
Pvu II
Nru I
Hind III
pUC9
Pvu II
Pvu II
1. VERDAU MIT Pvu II
2 INSERTION DER
OLIGOS A-E.

FIG.9A

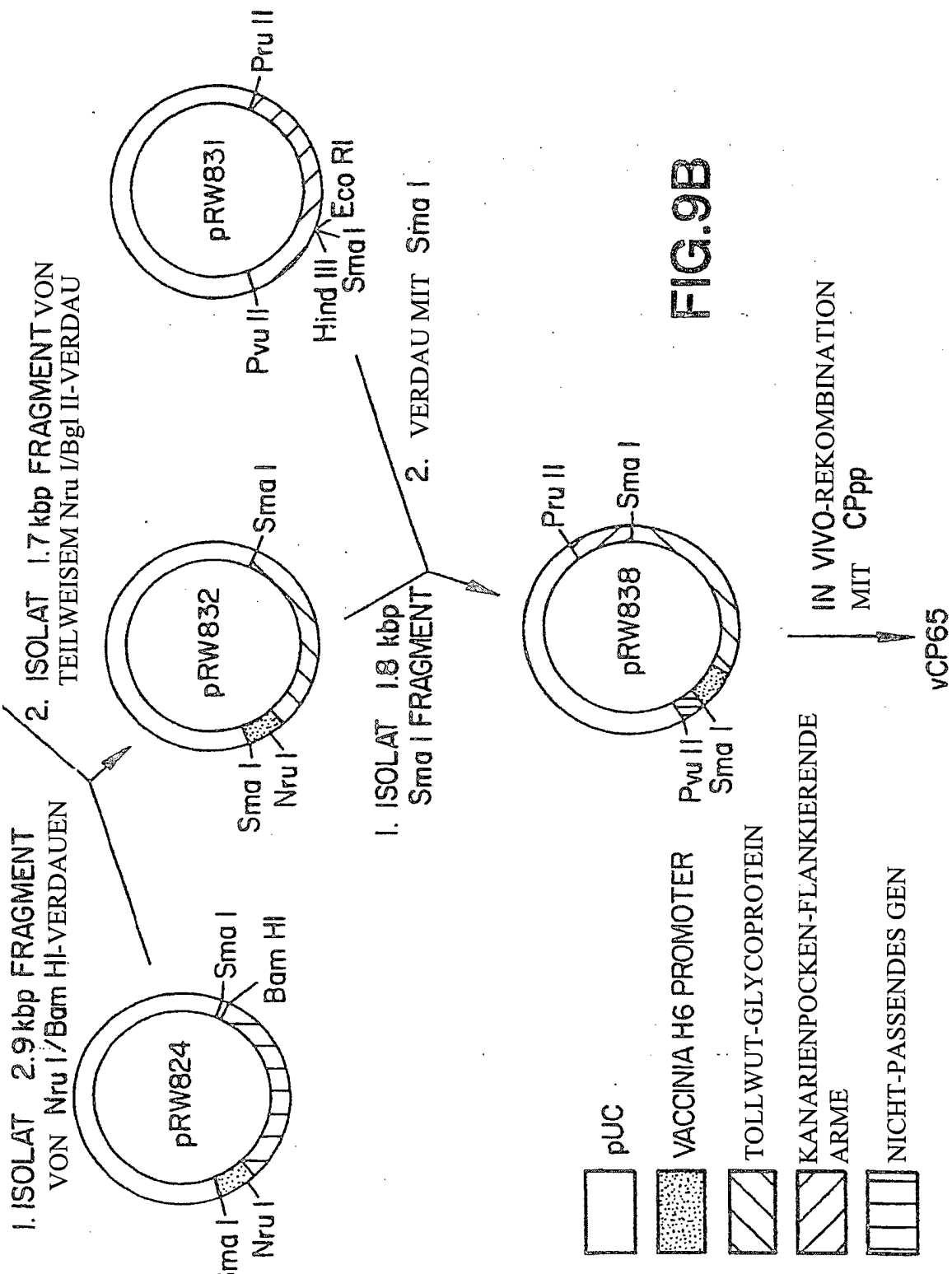

1. ISOLAT 2.9 kbp FRAGMENT VON Nru I/Bam HI-VERDAUEN
pRW824
Sma I
Bam HI
Sma I
Nru I
2. ISOLAT 1.7 kbp FRAGMENT VON TEILWEISEM Nru I/Bgl II-VERDAU
pRW832
Sma I
Sma I
Nru I
1. ISOLAT 1.8 kbp Sma I FRAGMENT
2. VERDAU MIT Sma I
pRW831
Pru II
Pvu II
Hind III
Sma I
Eco RI
Pru II
Sma I
pRW838
Pvu II
Sma I
IN VIVO-REKOMBINATION MIT CPpp
vCP65
pUC
VACCINIA H6 PROMOTER
TOLLWUT-GLYCOPROTEIN
KANARIENPOCKEN-FLANKIERENDE ARME
NICHT-PASSENDES GEN

FIG.9B

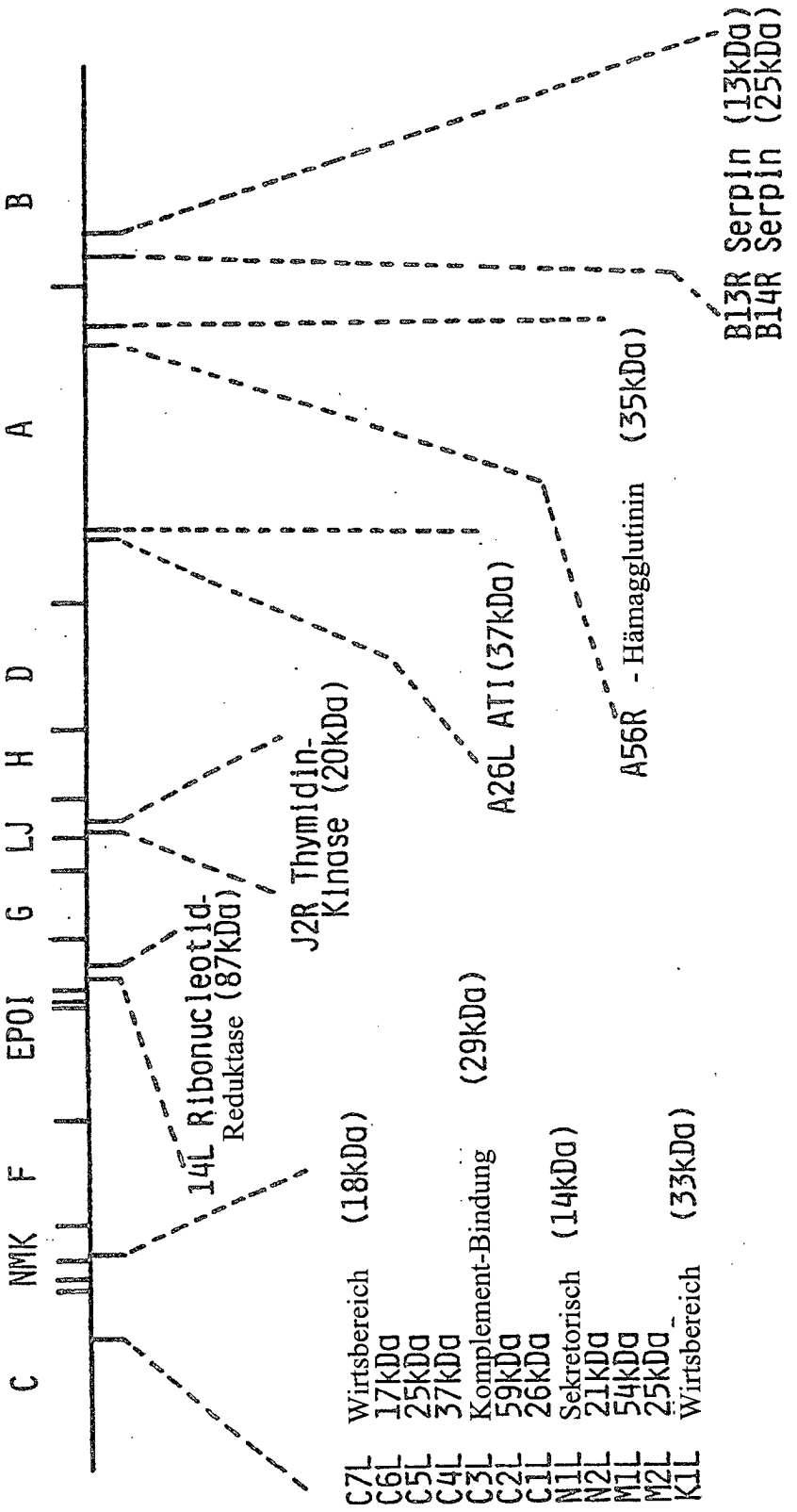

C NMK F EPOI G LJ H D A B
14L Ribonucleotid-Reduktase (87kDa)
J2R Thymidin-Kinase (20kDa)
A26L ATI (37kDa)
A56R - Hämagglutinin (35kDa)
B13R Serpin (13kDa)
B14R Serpin (25kDa)
C7L Wirtsbereich (18kDa)
C6L 17kDa
C5L 25kDa
C4L 37kDa
C3L Komplement-Bindung (29kDa)
C2L 59kDa
C1L 26kDa
N1L Sekretorisch (14kDa)
N2L 21kDa
M1L 54kDa
M2L 25kDa
K1L Wirtsbereich (33kDa)

FIG. 10

```
   1 GATATCTGTG GTCTATATAT ACTACACCCT ACCGATATTA ACCAACGAGT TTCTCACAAG
  61 AAAACTTGTT TAGTAGATAG AGATTCTTTG ATTGTGTTTA AAAGAAGTAC CAGTAAAAAG
 121 TGTGGCATAT GCATAGAAGA AATAAACAAA AAACATATTT CCGAACAGTA TTTTGGAATT
 181 CTCCCAAGTT GTAAACATAT TTTTTGCCTA TCATGTATAA GACGTTGGGC AGATACTACC
 241 AGAAATACAG ATACTGAAAA TACGTGTCCT GAATGTAGAA TAGTTTTTCC TTTCATAATA
 301 CCCAGTAGGT ATTGGATAGA TAATAAATAT GATAAAAAAA TATTATATAA TAGATATAAG
 361 AAAATGATTT TTACAAAAAT ACCTATAAGA ACAATAAAAA TATAATTACA TTTACGGAAA
 421 ATAGCTGGTT TTAGTTTACC AACTTAGAGT AATTATCATA TTGAATCTAT ATTGTTTTTT
 481 AGTTATATAA AAACATGATT AGCCCCCAAT CGGATGAAAA TATAAAAGAT GTTGAGAATT
 541 TCGAATACAA CAAAAAGAGG AATCGTACGT TGTCCATATC CAAACATATA AATAAAAATT
 601 CAAAAGTAGT ATTATACTGG ATGTTTAGAG ATCAACGTGT ACAAGATAAT TGGGCTTTAA
 661 TTTACGCACA ACGATTAGCG TTAAAACTCA AAATACCTCT AAGAATATGC TTTTGTGTCG
 721 TGCCAAAATT TCACACTACT ACTTCTAGAC ACTTTATGTT TTTAATATCC GGTCTTAAAG
 781 AAGTCGCGGA AGAATGTAAA AGACTATGTA TAGGGTTTTC ATTGATATAT GGCGTACCAA
 841 AAGTAATAAT TCCGTGTATA GTAAAAAAAT ACAGAGTCGG AGTAATCATA ACGGATTTCT
 901 TTCCATTACG TGTTCCCGAA AGATTAATGA AACAGACTGT AATATCTCTT CCAGATAACA
 961 TACCTTTTAT ACAAGTAGAC GCTCATAATA TAGTACCTTG TTGGGAAGCT TCTGATAAAG
1021 AAGAATACGG TGCACGAACT TTAAGAAAAA AGATATTTGA TAAATTATAT GAATATATGA
1081 CAGAATTTCC TGTTGTTCGT AAACATCCAT ACGGTCCATT TTCTATATCT ATTGCAAAAC
1141 CCAAAAATAT ATCATTAGAC AAGACGGTAT TACCCGTAAA ATGGGCAACG CCTGGAACAA
1201 AAGCTGGAAT AATTGTTTTA AAAGAATTTA TAAAAAACAG ATTACCGTCA TACGACGCGG
1261 ATCATAACAA TCCTACGTGT GACGCTTTGA GTAACTTATC TCCGTGGCTA CATTTTGGTC
1321 ATGTATCCGC ACAACGTGTT GCCTTAGAAG TATTAAAATG TATACGAGAA AGCAAAAAAA
1381 ACGTTGAAAC GTTTATAGAT GAAATAATTG TAAGAAGAGA ACTATCGGAT AATTTTTGTT
1441 ACTATAACAA ACATTATGAT AGTATCCAGT CTACTCATTC ATGGGTTAGA AAAACATTAG
1501 AAGATCACAT TAATGATCCT AGAAAGTATA TATATTCCAT TAAACAACTC GAAAAAGCGG
1561 AAACTCATGA TCCTCTATGG AACGCGTCAC AAATGCAGAT GGTGAGAGAA GGAAAAATGC
1621 ATAGTTTTTT ACGAATGTAT TGGGCTAAGA AGATACTTGA ATGGACTAGA ACACCTGAAG
1681 ACGCTTTGAG TTATAGTATC TATTTGAACA ACAAGTACGA ACTAGACGGC ACGGATCCTA
1741 ACGGATACGT AGGTTGTATG TGGTCTATTT GCGGATTACA CGATAGAGCG TGGAAAGCAA
1801 GACCGATATT TGGAAAGATA AGATATATGA ATTATGAGAG TTCTAAGAAG AAATTTGATG
1861 TTGCTGTATT TATACAGAAA TACAATTAAG ATAAATAATA TACAGCATTG TAACCATCGT
1921 CATCCGTTAT ACGGGGAATA ATATTACCAT ACAGTATTAT TAAATTTTCT TACGAAGAAT
1981 ATAGATCGGT ATTTATCGTT AGTTTATTTT ACATTTATTA ATTAAACATG TCTACTATTA
2041 CCTGTTATGG AAATGACAAA TTTAGTTATA TAATTTATGA TAAAATTAAG ATAATAATAA
2101 TGAAATCAAA TAATTATGTA AATGCTACTA GATTATGTGA ATTACGAGGA AGAAAGTTTA
2161 CGAACTGGAA AAAATTAAGT GAATCTAAAA TATTAGTCGA TAATGTAAAA AAAATAAATG
2221 ATAAAACTAA CCAGTTAAAA ACGGATATGA TTATATACGT TAAGGATATT GATCATAAAG
2281 GAAGAGATAC TTGCGGTTAC TATGTACACC AAGATCTGGT ATCTTCTATA TCAAATTGGA
2341 TATCTCCGTT ATTCGCCGTT AAGGTAAATA AAATTATTAA CTATTATATA TGTAATGAAT
2401 ATGATATACG ACTTAGCGAA ATGGAATCTG ATATGACAGA AGTAATAGAT GTAGTTGATA
2461 AATTAGTAGG AGGATACAAT GATGAAATAG CAGAAATAAT ATATTTGTTT AATAAATTTA
2521 TAGAAAAATA TATTGCTAAC ATATCGTTAT CAACTGAATT ATCTAGTATA TTAAATAATT
2581 TTATAAATTT TATAAATTTT AATAAAAAAT ACAATAACGA CATAAAGATA TTTAATCTTT
2641 AATTCTTGAT CTGAAAAACA CATCTATAAA ACTAGATAAA AAGTTATTCG ATAAAGATAA
2701 TAATGAATCG AACGATGAAA AATTGGAAAC AGAAGTTGAT AAGCTAATTT TTTTCATCTA
2761 AATAGTATTA TTTTATTGAA GTACGAAGTT TTACGTTAGA TAAATAATAA AGGTCGATTT
2821 TTACTTTGTT AAATATCAAA TATGTCATTA TCTGATAAAG ATACAAAAAC ACACGGTGAT
2881 TATCAACCAT CTAACGAACA GATATTACAA AAAATACGTC GGACTATGGA AAACGAAGCT
2941 GATAGCCTCA ATAGAAGAAG CATTAAAGAA ATTGTTGTAG ATGTTATGAA GAATTGGGAT
3001 CATCCTCAAC GAAGAAATAG ATAAAGTTCT AAACTGGAAA AATGATACAT TAAACGATTT
3061 AGATCATCTA AATACAGATG ATAATATTAA GGAAATCATA CAATGTCTGA TTAGAGAATT
3121 TGCGTTTAAA AAGATCAATT CTATTATGTA TAGTTATGCT ATGGTAAAAC TCAATTCAGA
3181 TAACGAACAT TGAAAGATAA AATTAAGGAT TATTTTATAG AAACTATTCT TAAAGACAAA
3241 CGTGGTTATA AACAAAAGCC ATTACCCGGA TTGGAAACTA AAATACTAGA TAGTATTATA
3301 AGATTTTAAA AACATAAAAT TAATAGGTTT TTATAGATTG ACTTATTATA TACAATATGG
3361 ATAAAAGATA TATATCAACT AGAAAGTTGA ATGACGGATT CTTAATTTTA TATTATGATT
3421 CAATAGAAAT TATTGTCATG TCGTGTAATC ATTTTATAAA TATATCAGCG TTACTAGCTA
3481 AGAAAAACAA GGACTTTAAT GAATGGCTAA AGATAGAATC ATTTAGAGAA ATAATAGATA
3541 CTTTAGATAA AATTAATTAC GATCTAGGAC AACGATATTG TGAAGAACTT ACGGCGCATC
3601 ACATTCCAGT GTAATTATTG AGGTCAAAGC TAGTAACTTA ATAGATGACA GGACAGCTG
```

FIG. 11

```
   1 TGTCTGGACT AACTGATTTC ATGGAACAAT TTTCATCAAA AATATCAGTT ATACCTAGTT
  61 CTACAAAGAC AGAACTTTGA TGTTATGTTT GTGTTTGTAT AGAAAATTTT GGGATACTAA
 121 CTGATATTTC TGAATATTTC TGAATATTTC ATGTTACTTA CTTACTCCTA TCTTAGACGA
 181 TAATAAAATT CGAGGCGTAA TATGTTTTTC CAAATATTTG AAATTCTTAT ACGTATCGGC
 241 GAAGAAAAGT AACATACTAT AAGTGTTATG CAAGTAAGGT ATGTTAATGA TATTGGATTT
 301 AATTTCATTG ACAATACATA TGTCCAAACA TTCCACTCGT AATTATGTAC GGAACGACTT
 361 TAGTTAAATA CTTAGTCACA AAAAACTTAT GACTGTCATT ATCTGAAAAC GGTGATTCCC
 421 ATAAATCAGA ATACTTAATA TTAAATAGAA TGCTCGCTTC TGGAGGTTTC CGGATACTAG
 481 ATAACATATC TTCTGTATTA TAGTTTAATT CACTCATTTT ATTACATAAT ACAGTAACAT
 541 CTCCCGAAAC CAATGATGTT ATATTAGATT TACTTACATA CTTCTTGTAA CTATCATGAA
 601 TACGTTTGTT GATGTCTATA AAGAAGATGG ATGTATATTC TGTTCTAGAT AGCAAGTTCT
 661 TTAAGTTATT CTTTGTCTGT ATTACTATCA TCGTCTTCAT CATCGTCTAA AGGTAGCATT
 721 ATATAATAAA TCTAATAGTT GATTTCTCGA TCTATCAGTA CTCGCTTTCA ATAACATTTT
 781 TACTATAAGC ATAATAGAAG GCGGTGATAT CACTATATTT TTATCGGGTA TTCTTTTAGT
 841 AATTAGTTAG TTCGTAGAAT TTCGTAGAGA TAAAAGCCAA TTTGTTGTTG ATACTGCTTA
 901 CGTTACTCAT GTTTCTTGTT TCTGTTAATT AACAGGTATA CCCTTACAAT AAGTTTAATT
 961 AACTTTTAGG TTTTTGTGAA GAACTTTTAG CTTCTAGTTC CCTTATCCAT AATTGGGTCT
1021 TAGATCTAGA TTCTTCCCAT GTATAAAGGG GGACATACCC AAAATCTTTA AATGCTTTGT
1081 CCGTTTCTAT AGTAAATGTC GTACATTCCT TAATCAAAGT ATAAGGATTT AGTAAAGGCG
1141 TGTAAGAACA AATAGGTGAT AGTAATACTC TTAAACCTTT ATTAATATTA GCGATAAACC
1201 TTAAACACCA TAAAGGAAGA CATGTATTCC GTAGATCCAT CCCTAATTGA TTAAAGAAAT
1261 GCATGTTAAA ATCATGATAA TGTTCAGTAG GAGAGGTATC GTAACAGTAA TACACGTTAT
1321 TGCAGAGAGG ACTATGTTGA CCATTTTCTA TCATATTTCT TGCTGCTAAA ATATGCATCC
1381 AAGCTACGTT TCCTGCATAG ACTCTGCTAT GAAATACTTT ATCATCCGCA TATTTATACA
1441 TTTTCCTGCT TTTATACGAT CTTCTGTATA AAGTTTCTAG TACTGGACAG TATTCTCCGA
1501 AAACACGTAA TGGGCGTAGC GACAAGTGCA TAATCTAAGT CCTATATTAG ACATAGTACC
1561 GTTAGCTTCT AGTATATATT TCTCAGATAA CTTGTTTACT AAGAGGATAA GCCTCTTTAT
1621 GGTTAGATTG ATAATACGTA TTCTCGTTTC CTCTTATCAT CGCATCTCCG GAGAAAGTTA
1681 GGACCTACCG CAGAATAACT ACTCGTATAT ACTAAGACTC TTACGCCGTT ATACAGACAA
1741 GAATCTACTA CGTTCTTCGT TCCGTTGATA TTAACGTCCA TTATAGAGTC GTTAGTAAAC
1801 TTACCCGCTA CATCATTTAT CGAAGCAATA TGAATGACCA CATCTGCTGA TCTAAGCGCT
1861 TCGTCCAAAG TACTTTTATT TCTAACATCT CCAATCACGG GAACTATCTT TATTATATTA
1921 CATTTTTCTA CAAGATCTAG TAACCATTGG TCGATTCTAA TATCGTAAAC ACGAACTTCT
1981 TTTTAAAGAG GATTCGAACA AGATAAGATT ATTTATAATG TGTCTACCTA AAAATCCACA
2041 CCCTCCGGTT ACCACGTATA CTAGTGTACG CATTTTGAGT ATTAACTATA TAAGACCAAA
2101 ATTATATTTT CATTTTCTGT TATATTATAC TATATAATAA AAACAAATAA ATATACGAAT
2161 ATTATAAGAA ATTTAGAACA CGTTATTAAA GTATTGCCTT TTTTATTAAC GGCGTGTTCT
2221 TGTAATTGCC GTTTAGAATA GTCTTTATTT ACTTTAGATA ACTCTTCTAT CATAACCGTC
2281 TCCTTATTCC AATCTTCTTC AGAAGTACAT GAGTACTTAC CGAAGTTTAT CATCATAGAG
2341 ATTATATATG AAGAAA
```

FIG.12

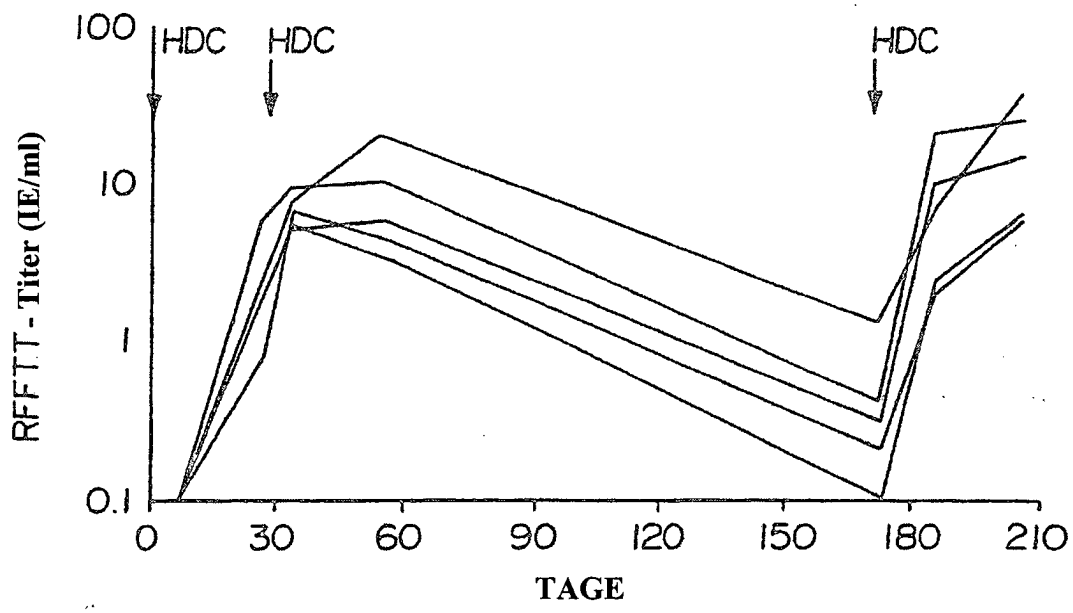


FIG. 13A

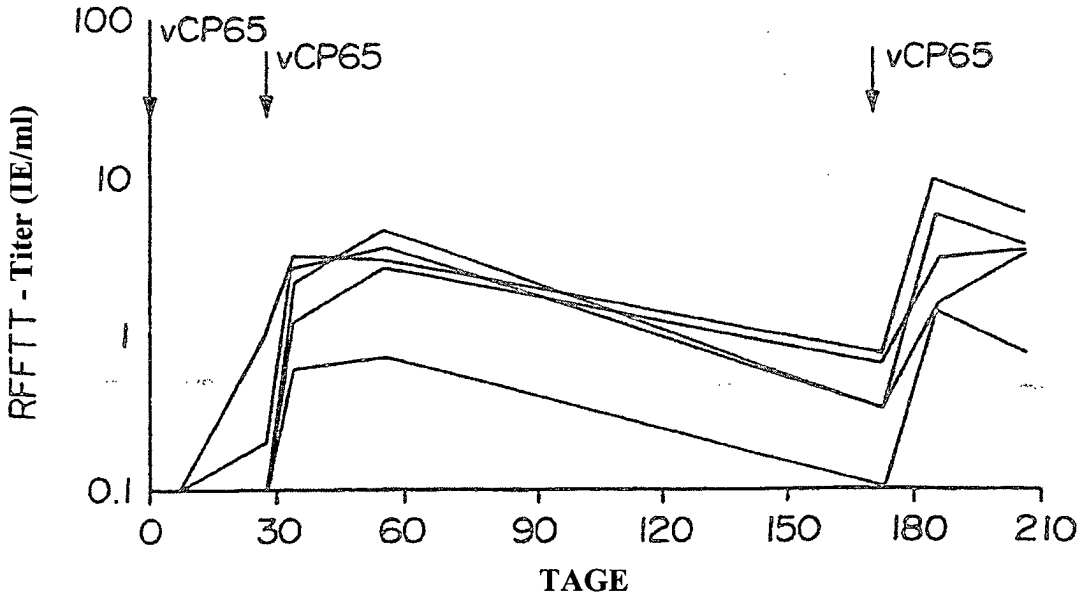


FIG. 13C

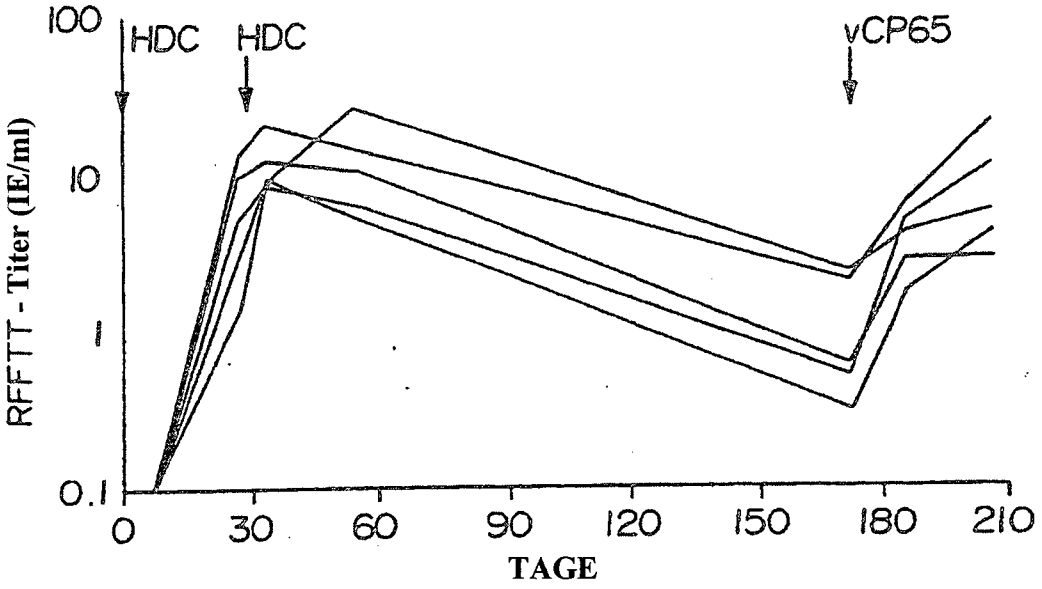


FIG. 13B

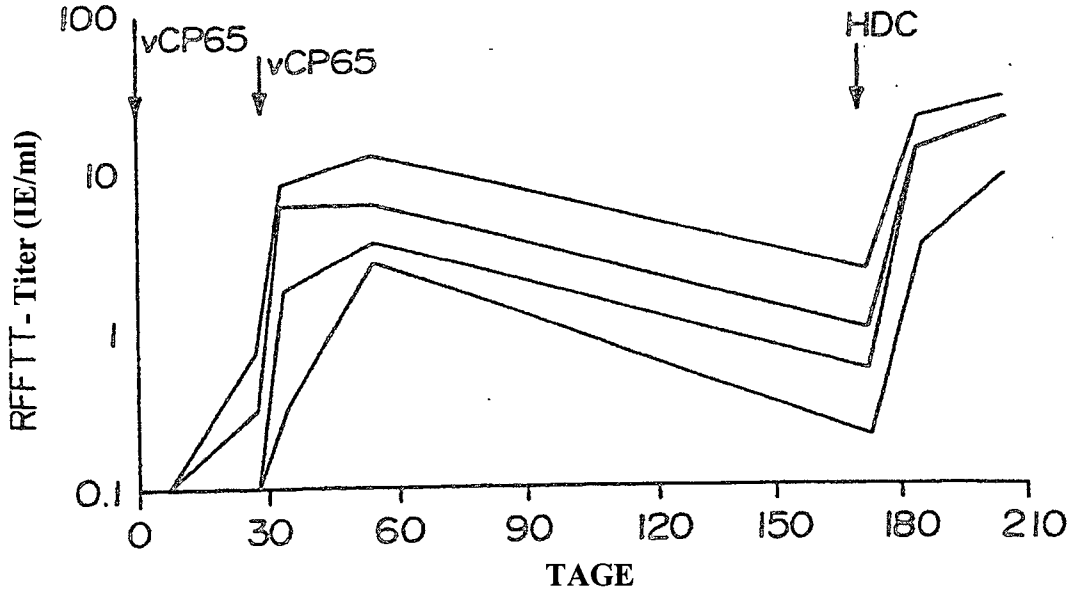


FIG. 13D

```
   1 AGATATTTGT TAGCTTCTGC CGGAGATACC GTGAAAATCT ATTTTCTGGA AGGAAAGGGA
  61 GGTCTTATCT ATTCTGTCAG CAGAGTAGGT TCCTCTAATG ACGAAGACAA TAGTGAATAC
 121 TTGCATGAAG GTCACTGTGT AGAGTTCAAA ACTGATCATC AGTGTTTGAT AACTCTAGCG
 181 TGTACGAGTC CTTCTAACAC TGTGGTTTAT TGGCTGGAAT AAAAGGATAA AGACACCTAT
 241 ACTGATTCAT TTTCATCTGT CAACGTTTCT CTAAGAGATT CATAGGTATT ATTATTACAT
 301 CGATCTAGAA GTCTAATAAC TGCTAAGTAT ATTATTGGAT TTAACGCGCT ATAAACGCAT
 361 CCAAAACCTA CAAATATAGG AGAAGCTTCT CTTATGAAAC TTCTTAAAGC TTTACTCTTA
 421 CTATTACTAC TCAAAAGAGA TATTACATTA ATTATGTGAT GAGGCATCCA ACATATAAAG
 481 AAGACTAAAG CTGTAGAAGC TGTTATGAAG AATATCTTAT CAGATATATT AGATGCATTG
 541 TTAGTTCTGT AGATCAGTAA CGTATAGCAT ACGAGTATAA TTATCGTAGG TAGTAGGTAT
 601 CCTAAAATAA ATCTGATACA GATAATAACT TTGTAAATCA ATTCAGCAAT TTCTCTATTA
 661 TCATGATAAT GATTAATACA CAGCGTGTCG TTATTTTTTG TTACGATAGT ATTTCTAAAG
 721 TAAAGAGCAG GAATCCCTAG TATAATAGAA ATAATCCATA TGAAAAATAT AGTAATGTAC
 781 ATATTTCTAA TGTTAACATA TTTATAGGTA AATCCAGGAA GGGTAATTTT TACATATCTA
 841 TATACGCTTA TTACAGTTAT TAAAAATATA CTTGCAAACA TGTTAGAAGT AAAAAAGAAA
 901 GAACTAATTT TACAAAGTGC TTTACCAAAA TGCCAATGGA AATTACTTAG TATGTATATA
 961 ATGTATAAAG GTATGAATAT CACAAACAGC AAATCGGCTA TTCCCAAGTT GAGAAACGGT
1021 ATAATAGATA TATTTCTAGA TACCATTAAT AACCTTATAA GCTTGACGTT TCCTATAATG
1081 CCTACTAAGA AAACTAGAAG ATACATACAT ACTAACGCCA TACGAGAGTA ACTACTCATC
1141 GTATAACTAC TGTTGCTAAC AGTGACACTG ATGTTATAAC TCATCTTTGA TGTGGTATAA
1201 ATGTATAATA ACTATATTAC ACTGGTATTT TATTTCAGTT ATATACTATA TAGTATTAAA
1261 AATTATATTT GTATAATTAT ATTATTATAT TCAGTGTAGA AAGTAAAATA CTATAAATAT
1321 GTATCTCTTA TTTATAACTT ATTAGTAAAG TATGTACTAT TCAGTTATAT TGTTTTATAA
1381 AAGCTAAATG CTACTAGATT GATATAAATG AATATGTAAT AAATTAGTAA TGTAGTATAC
1441 TAATATTAAC TCACATTATG AATACTACTA ATCACGAAGA ATGCAGTAAA ACATATGATA
1501 CAAACATGTT AACAGTTTTA AAAGCCATTA GTAATAAACA GTACAATATA ATTAAGTCTT
1561 TACTTAAAAA AGATATTAAT GTTAATAGAT TATTAACTAG TTATTCTAAC GAAATATATA
1621 AACATTTAGA CATTACATTA TGTAATATAC TTATAGAACG TGCAGCAGAC ATAAACATTA
1681 TAGATAAGAA CAATCGTACA CCGTTGTTTT ATGCGGTAAA GAATAATGAT TATGATATGG
1741 TTAAACTCCT ATTAAAAAAT GGCGCGAATG TAAATTTACA AGATAGTATA GGATATTCAT
1801 GTCTTCACAT CGCAGGTATA CATAATAGTA ACATAGAAAT AGTAGATGCA TTGATATCAT
1861 ACAAACCAGA TTTAAACTCC CGCGATTGGG TAGGTAGAAC ACCGCTACAT ATCTTCGTGA
1921 TAGAATCTAA CTTTGAAGCT GTGAAATTAT TATTAAAGTC AGGTGCATAT GTAGGTTTGA
1981 AAGACAAATG TAAGCATTTT CCTATACACC ATTCTGTAAT GAAATTAGAT CACTTAATAT
2041 CAGGATTGTT ATTAAAATAT GGAGCAAATC CAAATACAAT TAACGGCAAT GGAAAAACAT
2101 TATTAAGCAT TGCTGTAACA TCTAATAATA CACTACTGGT AGAACAGCTG CTGTTATATG
2161 GAGCAGAAGT TAATAATGGT GGTTATGATG TTCCAGCTCC TATTATATCC GCTGTCAGTG
2221 TTAACAATTA TGATATTGTT AAGATACTGA TACATAATGG TGCGAATATA AATGTATCCA
2281 CGGAAGATGG TAGAACGTCT TTACATACAG CTATGTTTTG GAATAACGCT AAAATAATAG
2341 ATGAGTTGCT TAACTATGGA AGTGACATAA ACAGCGTAGA TACTTATGGT AGAACTCCGT
2401 TATCTTGTTA TCGTAGCTTA AGTTATGATA TCGCTACTAA ACTAATATCA CGTATCATTA
2461 TAACAGATGT CTATCGTGAA GCACCAGTAA ATATCAGCGG ATTTATAATT AATTTAAAAA
2521 CTATAGAAAA TAATGATATA TTCAAATTAA TTAAAGATGA TTGTATTAAA GAGATAAACA
2581 TACTTAAAAG TATAACCCTT AATAAATTTC ATTCATCTGA CATATTTATA CGATATAATA
2641 CTGATATATG TTTATTAACG AGATTTATTC AACATCCAAA GATAATAGAA CTAGACAAAA
2701 AACTCTACGC TTATAAATCT ATAGTCAACG AGAGAAAAAT CAAAGCTACT TACAGGTATT
2761 ATCAAATAAA AAAAGTATTA ACTGTACTAC CTTTTTCAGG ATATTTCTCT ATATTGCCGT
2821 TTGATGTGTT AGTATATATA CTTGAATTCA TCTATGATAA TAATATGTTG GTACTTATGA
```

FIG. 14A

```
2941 AATGGCAGGA ATTTTGTGTA AACTAAGCCA CATACTTGCC AATGAAAAAA ATAGTAGAAA
3001 GGATACTATT TTAATGGGAT TAGATGTTAA GGTTCCTTGG GATTATAGTA ACTGGGCATC
3061 TGTTAACTTT TACGACGTTA GGTTAGATAC TGATGTTACA GATTATAATA ATGTTACAAT
3121 AAAATACATG ACAGGATGTG ATATTTTTCC TCATATAACT CTTGGAATAG CAAATATGGA
3181 TCAATGTGAT AGATTTGAAA ATTTCAAAAA GCAAATAACT GATCAAGATT TACAGACTAT
3241 TTCTATAGTC TGTAAAGAAG AGATGTGTTT TCCTCAGAGT AACGCCTCTA AACAGTTGGG
3301 AGCGAAAGGA TGCGCTGTAG TTATGAAACT GGAGGTATCT GATGAACTTA GAGCCCTAAG
3361 AAATGTTCTG CTGAATGCGG TACCCTGTTC GAAGGACGTG TTTGGTGATA TCACAGTAGA
3421 TAATCCGTGG AATCCTCACA TAACAGTAGG ATATGTTAAG GAGGACGATG TCGAAAACAA
3481 GAAACGCCTA ATGGAGTGCA TGTCCAAGTT TAGGGGGCAA GAAATACAAG TTCTAGGATG
3541 GTATTAATAA GTATCTAAGT ATTTGGTATA ATTTATTAAA TAGTATAATT ATAACAAATA
3601 ATAAATAACA TGATAACGGT TTTTATTAGA ATAAAATAGA GATAATATCA TAATGATATA
3661 TAATACTTCA TTACCAGAAA TGAGTAATGG AAGACTTATA AATGAACTGC ATAAAGCTAT
3721 AAGGTATAGA GATATAAATT TAGTAAGGTA TATACTTAAA AAATGCAAAT ACAATAACGT
3781 AAATATACTA TCAACGTCTT TGTATTTAGC CGTAAGTATT TCTGATATAG AAATGGTAAA
3841 ATTATTACTA GAACACGGTG CCGATATTTT AAAATGTAAA AATCCTCCTC TTCATAAAGC
3901 TGCTAGTTTA GATAATACAG AAATTGCTAA ACTACTAATA GATTCTGGCG CTGACATAGA
3961 ACAGATACAT TCTGGAAATA GTCCGTTATA TATTTCTGTA TATAGAAACA ATAAGTCATT
4021 AACTAGATAT TTATTAAAAA AAGGTGTTAA TTGTAATAGA TTCTTTCTAA ATTATTACGA
4081 TGTACTGTAT GATAAGATAT CTGATGATAT GTATAAAATA TTTATAGATT TTAATATTGA
4141 TCTTAATATA CAAACTAGAA ATTTTGAAAC TCCGTTACAT TACGCTATAA AGTATAAGAA
4201 TATAGATTTA ATTAGGATAT TGTTAGATAA TAGTATTAAA ATAGATAAAA GTTTATTTTT
4261 GCATAAACAG TATCTCATAA AGGCACTTAA AAATAATTGT AGTTACGATA TAATAGCGTT
4321 ACTTATAAAT CACGGAGTGC CTATAAACGA ACAAGATGAT TTAGGTAAAA CCCCATTACA
4381 TCATTCGGTA ATTAATAGAA GAAAAGATGT AACAGCACTT CTGTTAAATC TAGGAGCTGA
4441 TATAAACGTA ATAGATGACT GTATGGGCAG TCCCTTACAT TACGCTGTTT CACGTAACGA
4501 TATCGAAACA ACAAAGACAC TTTTAGAAAG AGGATCTAAT GTTAATGTGG TTAATAATCA
4561 TATAGATACC GTTCTAAATA TAGCTGTTGC ATCTAAAAAC AAAACTATAG TAAACTTATT
4621 ACTGAAGTAC GGTACTGATA CAAAGTTGGT AGGATTAGAT AAACATGTTA TTCACATAGC
4681 TATAGAAATG AAAGATATTA ATATACTGAA TGCGATCTTA TTATATGGTT GCTATGTAAA
4741 CGTCTATAAT CATAAAGGTT TCACTCCTCT ATACATGGCA GTTAGTTCTA TGAAAACAGA
4801 ATTTGTTAAA CTCTTACTTG ACCACGGTGC TTACGTAAAT GCTAAAGCTA AGTTATCTGG
4861 AAATACTCCT TTACATAAAG CTATGTTATC TAATAGTTTT AATAATATAA AATTACTTTT
4921 ATCTTATAAC GCCGACTATA ATTCTCTAAA TAATCACGGT AATACGCCTC TAACTTGTGT
4981 TAGCTTTTTA GATGACAAGA TAGCTATTAT GATAATATCT AAAATGATGT TAGAAATATC
5041 TAAAAATCCT GAAATAGCTA ATTCAGAAGG TTTTATAGTA AACATGGAAC ATATAAACAG
5101 TAATAAAAGA CTACTATCTA TAAAAGAATC ATGCGAAAAA GAACTAGATG TTATAACACA
5161 TATAAAGTTA AATTCTATAT ATTCTTTTAA TATCTTTCTT GACAATAACA TAGATCTTAT
5221 GGTAAAGTTC GTAACTAATC CTAGAGTTAA TAAGATACCT GCATGTATAC GTATATATAG
5281 GGAATTAATA CGGAAAAATA AATCATTAGC TTTTCATAGA CATCAGCTAA TAGTTAAAGC
5341 TGTAAAAGAG AGTAAGAATC TAGGAATAAT AGGTAGGTTA CCTATAGATA TCAAACATAT
5401 AATAATGGAA CTATTAAGTA ATAATGATTT ACATTCTGTT ATCACCAGCT GTTGTAACCC
5461 AGTAGTATAA AGTGATTTTA TTCAATTACG AAGATAAACA TTAAATTTGT TAACAGATAT
5521 GAGTTATGAG TATTTAACTA AAGTTACTTT AGGTACAAAT AAAATATTAT GTAATATAAT
5581 AGAAAATTAT CTTGAGTCTT CATTTCCATC ACCGTCTAAA TTTATTATTA AAACCTTATT
5641 ATATAAGGCT GTTGAGTTTA GAAATGTAAA TGCTGTAAAA AAAATATTAC AGAATGATAT
5701 TGAATATGTT AAAGTAGATA GTCATGGTGT CTCGCCTTTA CATATTATAG CTATGCCTTC
5761 AAATTTTTCT CTCATAGACG CTGACATGTA TTCAGAATTT AATGAAATTA GTAATAGACT
```

FIG. 14B

```
5821 TCAAAAATCT AAAGATAGTA ACGAATTTCA ACGAGTTAGT CTACTAAGGA CAATTATAGA
5881 ATATGGTAAT GATAGTGATA TTAATAAGTG TCTAACATTA GTAAAAACGG ATATACAGAG
5941 TAACGAAGAG ATAGATATTA TAGATCTTTT GATAAATAAA GGAATAGATA TAAATATTAA
6001 AGACGATTTA GGAAACACAG CTTTGCATTA CTCGTGTGAT TATGCTAAGG GATCAAAGAT
6061 AGCTAAAAAG TTACTAGATT GTGGAGCAGA TCCTAACATA GTTAATGATT TAGGTGTTAC
6121 ACCACTAGCG TGTGCCGTTA ATACTTGCAA CGAGATACTA GTAGATATTC TGTTAAATAA
6181 TGATGCGAAT CCTGATTCAT CTTCCTCATA TTTTTTAGGT ACTAATGTGT TACATACAGC
6241 CGTAGGTACC GGTAATATAG ATATTGTAAG ATCTTTACTT ACGGCTGGTG CCAATCCTAA
6301 TGTAGGAGAT AAATCTGGAG TTACTCCTTT GCACGTTGCT GCAGCTGATA AAGACAGTTA
6361 TCTGTTAATG GAGATGCTAC TAGATAGCGG GGCAGATCCA AATATAAAAT GCGCAAACGG
6421 TTTTACTCCT TTGTTTAATG CAGTATATGA TCATAACCGT ATAAAGTTAT TATTTCTTTA
6481 CGGGGCTGAT ATCAATATTA CTGACTCTTA CGGAAATACT CCTCTTACTT ATATGACTAA
6541 TTTTGATAAT AAATATGTAA ATTCAATAAT TATCTTACAA ATATATCTAC TTAAAAAAGA
6601 ATATAACGAT GAAAGATTGT TTCCACCTGG TATGATAAAA AATTTAAACT TTATAGAATC
6661 AAACGATAGT CTTAAAGTTA TAGCTAAAAA GTGTAATTCG TTAATACGCT ATAAGAAAAA
6721 TAAAGACATA GATGCAGATA ACGTATTATT GGAGCTTTTA GAGGAAGAGG AAGAAGATGA
6781 AATAGACAGA TGGCATACTA CATGTAAAAT ATCTTAAATA GTAATTAAAT CATTGAAATA
6841 TTAACTTACA AGATGATCGA GGTCACTTAT TATACTCTTT AATAATGGGT ACAAAGAGTA
6901 TTCATACGTT AGTTAAATCT AACGATGTAA TACGTGTTCG TGAATTAATA AAGGATGATA
6961 GATGTTTGAT AAATAAAAGA AATAGAAGAA ATCAGTCACC TGTATATATA GCTATATACA
7021 AAGGACTTTA TGAAATGACT GAAATGTTAT TGCTAAATAA TGCAAGTCTA GATACTAAAA
7081 TACCTTCTTT AATTATAGCA GCTAAAAATA ATGACTTACC TATGATAAAA TTATTGATAC
7141 AATACGGGGC AAAATTAAAT GATATTTATT TAAGGGACAC AGCATTAATG ATAGCTCTCA
7201 GAAATGGTTA CCTAGATATA GCTGAATATT TACTTTCATT AGGAGCAGAA TTTGTTAAAT
7261 ACAGACATAA GGTAATATAT AAATATCTAT CAAAAGATGC GTATGAATTA CTTTTTAGAT
7321 TTAATTATGA CGTTAATATA ATAGATTGAG A
```

FIG. 14C

```
   1 AAAAAGGATCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAGAACGAGACTATCTGCTC
  61 GTTAATTAATTAGAGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTC
 121 TTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATA
 181 TCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCG
 241 AGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCA
 301 GCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG
 361 GAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTCCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGG
 421 CCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAG
 481 CAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGG
 541 CCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCA
 601 TCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCC
 661 ACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCA
 721 AGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCA
 781 TCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATC
 841 GGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGT
 901 GATTTTTATTCTAGAATCGATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCACGGCCGCTTATAA
 961 AGATC
```

FIG. 15

```
   1 GATCTCAAGCCGTCTTTTCTGGTGTAATAAAAATTAATTAATTACTCGAGCCCAGCTTGA
  61 TTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAA
 121 ATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTAT
 181 CGTAATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAA
 241 GAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCT
 301 GATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCCA
 361 GAGGGAAGAGTCCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAGTCAGATC
 421 ATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGA
 481 GGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCT
 541 GAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCT
 601 CTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCAT
 661 CGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAG
 721 GGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGT
 781 CTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGA
 841 CTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGATTTTTATTGGGAGA
 901 TCTAATTTAATTTAATTTATATAACTTATTTTTTGAATATACTTTTA
```

FIG. 16

```
   1 GATTAAAGAAAGTTACTCTGAGACACAAAAGAGGTAGCTGAAGTGGTACTCTCAAAGGTA
  61 CCCCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAGAACGAGACTATCTGCTCGTTAAT
 121 TAATTAGGTCGACGGATCCCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATAC
 181 AAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTA
 241 TCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGA
 301 GCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTACTTCCTGAAAACAACGT
 361 TCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGA
 421 ACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCC
 481 CCGCGTGGCCCCTGGACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTG
 541 GCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCT
 601 GGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAA
 661 CAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACC
 721 CCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGA
 781 GGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCC
 841 TCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACAC
 901 TTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCAC
 961 CATCCACTACAACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCAT
1021 CCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGA
1081 GGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAA
1141 GAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAA
1201 CACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTCACCCTTCA
1261 GATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAA
1321 GGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTC
1381 CAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGA
1441 CTCAGACTGAACGCGTTTTTATCCCGGGCTCGAGTCTAGAATCGATCCCGGGTTTTTATG
1501 ACTAGTTAATCA
```

FIG. 17

```
   1 GGTACGTGACTAATTAGCTATAAAAAGGATCTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAG
  61 AACGAGACTATCTGCTCGTTAATTAATTAGGTCGACGGATCCCCCGGGTTCTTTATTCTA
 121 TACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAG
 181 AAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGGA
 241 GCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATG
 301 GAAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTT
 361 GATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGC
 421 TCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCTGGACCAGCAGCTCCTACACCGGC
 481 GGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTA
 541 CCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGAC
 601 TTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGT
 661 GCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTA
 721 CAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTC
 781 AGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGT
 841 GGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCC
 901 TGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACTACATGTGTAACAGTTCCTGCAT
 961 GGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAA
1021 TCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCG
1081 CACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAG
1141 CACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACT
1201 GGATGGAGAATATTTCACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGA
1261 GCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAG
1321 GGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACT
1381 CATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGAACGCGTTTTTATCCCGGGCTCGAGTC
1441 TAGAATCGATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCACGGCCGC
```

FIG. 18

```
   1 AAAAAGGATCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAGAACGAGACTATCTGCTC
  61 GTTAATTAATTAGAGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTC
 121 TTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATA
 181 TCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCTCTTGAGCAGAGGAGTCTGCACTGCAAGCCTGAGG
 241 AAGCCCTTGAGGCCCAACAAGAGGCCCTGGGCCTGGTGTGTGTGCAGGCTGCCACCTCCT
 301 CCTCCTCTCCTCTGGTCCTGGGCACCCTGGAGGAGGTGCCCACTGCTGGGTCAACAGATC
 361 CTCCCCAGAGTCCTCAGGGAGCCTCCGCCTTTCCCACTACCATCAACTTCACTCGACAGA
 421 GGCAACCCAGTGAGGGTTCCAGCAGCCGTGAAGAGGAGGGGCCAAGCACCTCTTGTATCC
 481 TGGAGTCCTTGTTCCGAGCAGTAATCACTAAGAAGGTGGCTGATTTGGTTGGTTTTCTGC
 541 TCCTCAAATATCGAGCCAGGGAGCCAGTCACAAAGGCAGAAATGCTGGAGAGTGTCATCA
 601 AAAATTACAAGCACTGTTTTCCTGAGATCTTCGGCAAAGCCTCTGAGTCCTTGCAGCTGG
 661 TCTTTGGCATTGACGTGAAGGAAGCAGACCCCACCGGCCACTCCTATGTCCTTGTCACCT
 721 GCCTAGGTCTCTCCTATGATGGCCTGCTGGGTGATAATCAGATCATGCCCAAGACAGGCT
 781 TCCTGATAATTGTCCTGGTCATGATTGCAATGGAGGGCGGCCATGCTCCTGAGGAGGAAA
 841 TCTGGGAGGAGCTGAGTGTGATGGAGGTGTATGATGGGAGGGAGCACAGTGCCTATGGGG
 901 AGCCCAGGAAGCTGCTCACCCAAGATTTGGTGCAGGAAAAGTACCTGGAGTACGGCAGGT
 961 GCCGGACAGTGATCCCGCACGCTATGAGTTCCTGTGGGGTCCAAGGGCCCTCGCTGAAAC
1021 CAGCTATGTGATTTTTATTCTAGAATCGATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCACGGC
1081 CGCTTATAAAGATC
```

FIG.19

```
   1 ATAAATCACTTTTTTATACTAATATTTAATTAATTAAGCTTGGTACCCTCGAAGCTTCTTT
  61 ATTCTATACTTAAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAA
 121 AGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAAT
 181 GTCTCTTGAGCAGAGGAGTCTGCACTGCAAGCCTGAGGAAGCCCTTGAGGCCCAACAAGA
 241 GGCCCTGGGCCTGGTGTGTGTGCAGGCTGCCACCTCCTCCTCCTCTCCTCTGGTCCTGGG
 301 CACCCTGGAGGAGGTGCCCACTGCTGGGTCAACAGATCCTCCCCAGAGTCCTCAGGGAGC
 361 CTCCGCCTTTCCCACTACCATCAACTTCACTCGACAGAGGCAACCCAGTGAGGGTTCCAG
 421 CAGCCGTGAAGAGGAGGGGCCAAGCACCTCTTGTATCCTGGAGTCCTTGTTCCGAGCAGT
 481 AATCACTAAGAAGGTGGCTGATTTGGTTGGTTTTCTGCTCCTCAAATATCGAGCCAGGGA
 541 GCCAGTCACAAAGGCAGAAATGCTGGAGAGTGTCATCAAAAATTACAAGCACTGTTTTCC
 601 TGAGATCTTCGGCAAAGCCTCTGAGTCCTTGCAGCTGGTCTTTGGCATTGACGTGAAGGA
 661 AGCAGACCCCACCGGCCACTCCTATGTCCTTGTCACCTGCCTAGGTCTCTCCTATGATGG
 721 CCTGCTGGGTGATAATCAGATCATGCCCAAGACAGGCTTCCTGATAATTGTCCTGGTCAT
 781 GATTGCAATGGAGGGCGGCCATGCTCCTGAGGAGGAAATCTGGGAGGAGCTGAGTGTGAT
 841 GGAGGTGTATGATGGGAGGGAGCACAGTGCCTATGGGGAGCCCAGGAAGCTGCTCACCCA
 901 AGATTTGGTGCAGGAAAAGTACCTGGAGTACGGCAGGTGCCGGACAGTGATCCCGCACGC
 961 TATGAGTTCCTGTGGGGTCCAAGGGCCCTCGCTGAAACCAGCTATGTGATTTTTATTCTA
1021 GAACTAGTGGATCCCCCGGGTAGCTAGCTAATTTTTCTTTTACGTATTATATATGTAATA
1081 AACG
```

FIG.20

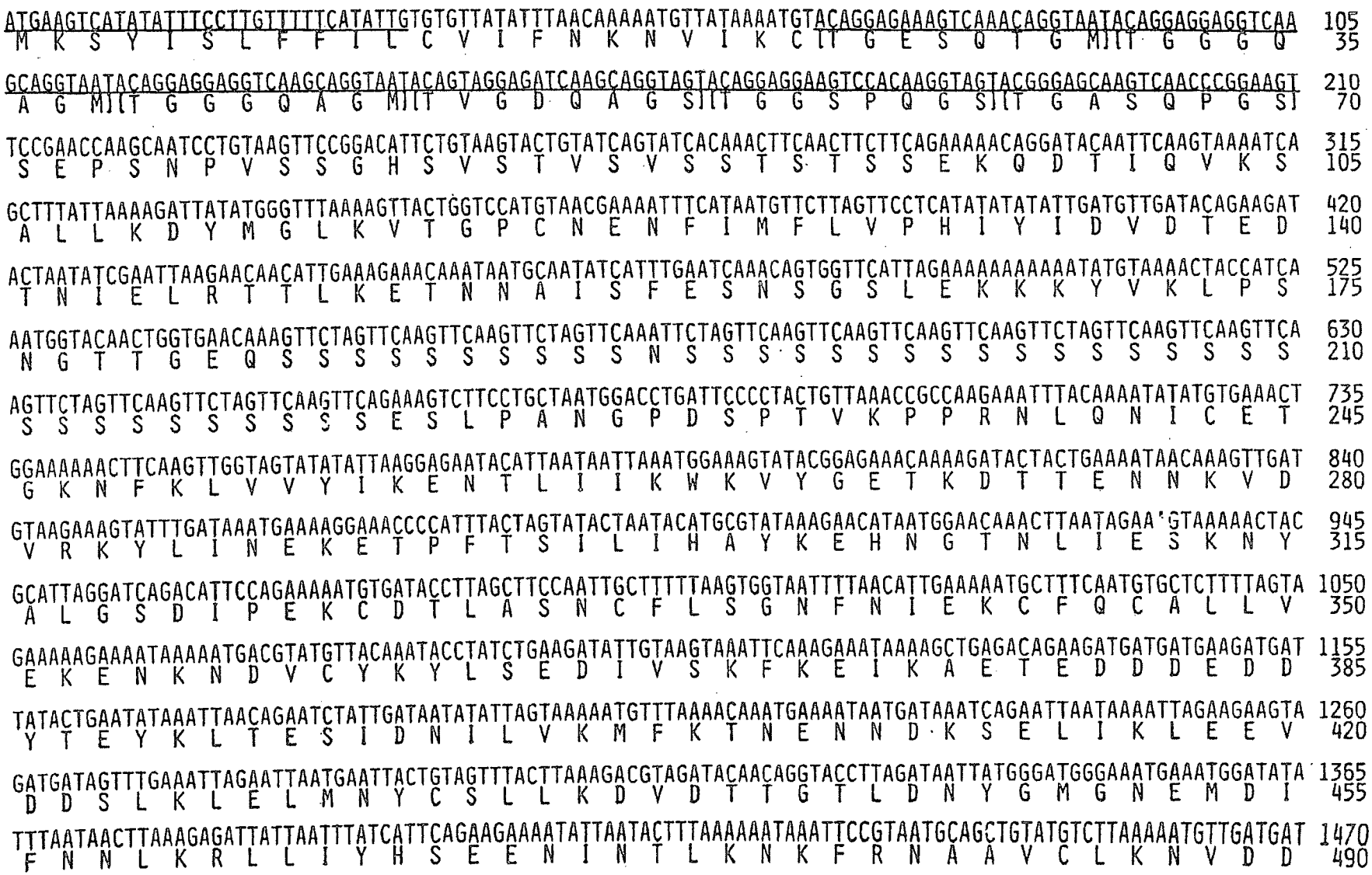

ATGAAGTCATATATTTCCTTGTTTTTCATATTGTGTGTTATATTTAACAAAAATGTTATAAAATGTACAGGAGAAAGTCAAACAGGTAATACAGGAGGAGGTCAA 105
M K S Y I S L F F I L C V I F N K N V I K C T G E S Q T G M T G G G Q 35
GCAGGTAATACAGGAGGAGGTCAAGCAGGTAATACAGTAGGAGATCAAGCAGGTAGTACAGGAGGAAGTCCACAAGGTAGTACGGGAGCAAGTCAACCCGGAAGT 210
A G M T G G G Q A G M T V G D Q A G S T G G S P Q G S T G A S Q P G S 70
TCCGAACCAAGCAATCCTGTAAGTTCCGGACATTCTGTAAGTACTGTATCAGTATCACAAACTTCAACTTCTTCAGAAAAACAGGATACAATTCAAGTAAAATCA 315
S E P S N P V S S G H S V S T V S V S S T S T S S E K Q D T I Q V K S 105
GCTTTATTAAAAGATTATATGGGTTTAAAAGTTACTGGTCCATGTAACGAAAATTTCATAATGTTCTTAGTTCCTCATATATATATTGATGTTGATACAGAAGAT 420
A L L K D Y M G L K V T G P C N E N F I M F L V P H I Y I D V D T E D 140
ACTAATATCGAATTAAGAACAACATTGAAAGAAACAAATAATGCAATATCATTTGAATCAAACAGTGGTTCATTAGAAAAAAAAAAATATGTAAAACTACCATCA 525
T N I E L R T T L K E T N N A I S F E S N S G S L E K K K Y V K L P S 175
AATGGTACAACTGGTGAACAAAGTTCTAGTTCAAGTTCAAGTTCTAGTTCAAATTCTAGTTCAAGTTCAAGTTCAAGTTCAAGTTCTAGTTCAAGTTCAAGTTCA 630
N G T T G E Q S S S S S S S S S S N S S S S S S S S S S S S S S S S S 210
AGTTCTAGTTCAAGTTCTAGTTCAAGTTCAGAAAGTCTTCCTGCTAATGGACCTGATTCCCCTACTGTTAAACCGCCAAGAAATTTACAAAATATATGTGAAACT 735
S S S S S S S S S S S E S L P A N G P D S P T V K P P R N L Q N I C E T 245
GGAAAAAACTTCAAGTTGGTAGTATATATTAAGGAGAATACATTAATAATTAAATGGAAAGTATACGGAGAAACAAAAGATACTACTGAAAATAACAAAGTTGAT 840
G K N F K L V V Y I K E N T L I I K W K V Y G E T K D T T E N N K V D 280
GTAAGAAAGTATTTGATAAATGAAAAGGAAACCCCATTTACTAGTATACTAATACATGCGTATAAAGAACATAATGGAACAAACTTAATAGAA'GTAAAAACTAC 945
V R K Y L I N E K E T P F T S I L I H A Y K E H N G T N L I E S K N Y 315
GCATTAGGATCAGACATTCCAGAAAAATGTGATACCTTAGCTTCCAATTGCTTTTTAAGTGGTAATTTTAACATTGAAAAATGCTTTCAATGTGCTCTTTTAGTA 1050
A L G S D I P E K C D T L A S N C F L S G N F N I E K C F Q C A L L V 350
GAAAAAGAAAATAAAAATGACGTATGTTACAAATACCTATCTGAAGATATTGTAAGTAAATTCAAAGAAATAAAAGCTGAGACAGAAGATGATGATGAAGATGAT 1155
E K E N K N D V C Y K Y L S E D I V S K F K E I K A E T E D D D E D D 385
TATACTGAATATAAATTAACAGAATCTATTGATAATATATTAGTAAAAATGTTTAAAACAAATGAAAATAATGATAAATCAGAATTAATAAAATTAGAAGAAGTA 1260
Y T E Y K L T E S I D N I L V K M F K T N E N N D K S E L I K L E E V 420
GATGATAGTTTGAAATTAGAATTAATGAATTACTGTAGTTTACTTAAAGACGTAGATACAACAGGTACCTTAGATAATTATGGGATGGGAAATGAAATGGATATA 1365
D D S L K L E L M N Y C S L L K D V D T T G T L D N Y G M G N E M D I 455
TTTAATAACTTAAAGAGATTATTAATTTATCATTCAGAAGAAAATATTAATACTTTAAAAAATAAATTCCGTAATGCAGCTGTATGTCTTAAAAATGTTGATGAT 1470
F N N L K R L L I Y H S E E N I N T L K N K F R N A A V C L K N V D D 490

FIG.21A

```
TGGATTGTAAATAAGAGAGGTTTAGTATTACCTGAATTAAATTATGATTTAGAATATTTCAATGAACATTTATATAATGATAAAAATTCTCCAGAAGATAAAGAT 1575
 W  I  V  N  K  R  G  L  V  L  P  E  L  N  Y  D  L  E  Y  F  N  E  H  L  Y  N  D  K  N  S  P  E  D  K  D  525

AATAAAGGAAAAGGTGTCGTACATGTTGATACAACTTTAGAAAAAGAAGATACTTTATCATATGATAACTCAGATAATATGTTTTGTAATAAAGAATATTGTAAC 1680
 N  K  G  K  G  V  V  H  V  D  T  T  L  E  K  E  D  T  L  S  Y  D  N  S  D  N  M  F  C  N  K  E  Y  C  N  560

AGATTAAAAGATGAAAATAATTGTATATCTAATCTTCAAGTTGAAGATCAAGGTAATTGTGATACTTCATGGATTTTTGCTTCAAAATATCATTTAGAAACTATT 1785
 R  L  K  D  E  N  N  C  I  S  N  L  Q  V  E  D  Q  G  N  C  D  T  S  W  I  F  A  S  K  Y  H  L  E  T  I  595

AGATGTATGAAAGGATATGAACCTACCAAAATTTCTGCTCTTTATGTAGCTAATTGTTATAAAGGTGAACATAAAGATAGATGTGATGAAGGTTCTAGTCCAATG 1890
 R  C  M  K  G  Y  E  P  T  K  I  S  A  L  Y  V  A  N  C  Y  K  G  E  H  K  D  R  C  D  E  G  S  S  P  M  630

GAATTCTTACAAATTATTGAAGATTATGGATTCTTACCAGCAGAATCAAATTATCCATATAACTATGTGAAAGTTGGAGAACAATGTCCAAAGGTAGAAGATCAC 1995
 E  F  L  Q  I  I  E  D  Y  G  F  L  P  A  E  S  N  Y  P  Y  N  Y  V  K  V  G  E  Q  C  P  K  V  E  D  H  665

TGGATGAATCTATGGGATAATGGAAAAATCTTACATAACAAAAATGAACCTAATAGTTTAGATGGTAAGGGATATACTGCATATGAAAGTGAAAGATTTCATGAT 2100
 W  M  N  L  W  D  N  G  K  I  L  H  N  K  N  E  P  N  S  L  D  G  K  G  Y  T  A  Y  E  S  E  R  F  H  D  700

AATATGGATGCATTTGTTAAAATTATTAAAACTGAAGTAATGAATAAAGGTTCAGTTATTGCATATATTAAAGCTGAAAATGTTATGGGATATGAATTTAGTGGA 2205
 N  M  D  A  F  V  K  I  I  K  T  E  V  M  N  K  G  S  V  I  A  Y  I  K  A  E  N  V  M  G  Y  E  F  S  G  735

AAGAAAGTACAGAACTTATGTGGTGATGATACAGCTGATCATGCAGTTAATATTGTTGGTTATGGTAATTATGTGAATAGCGAAGGAGAAAAAAAATCCTATTGG 2310
 K  K  V  Q  N  L  C  G  D  D  T  A  D  H  A  V  N  I  V  G  Y  G  N  Y  V  N  S  E  G  E  K  K  S  Y  W  770

ATTGTAAGAAACAGTTGGGGTCCATATTGGGGAGATGAAGGTTATTTTAAAGTAGATATGTATGGACCAACTCATTGTCATTTTAACTTTATTCACAGTGTTGTT 2415
 I  V  R  N  S  W  G  P  Y  W  G  D  E  G  Y  F  K  V  D  M  Y  G  P  T  H  C  H  F  N  F  I  H  S  V  V  805

ATATTCAATGTTGATTTACCTATGAATAATAAAACAACTAAAAAAGAATCAAAAATATATGATTATTATTTAAAGGCCTCTCCAGAATTTTATCATAACCTTTAC 2520
 I  F  N  V  D  L  P  M  N  N  K  T  T  K  K  E  S  K  I  Y  D  Y  Y  L  K  A  S  P  E  F  Y  H  N  L  Y  840

TTTAAGAATTTTAATGTTGGTAAGAAAAATTTATTCTCTGAAAAGGAAGATAATGAAAACAACAAAAAATTAGGTAACAACTATATTATATTCGGTCAAGATACG 2625
 F  K  N  F  N  V  G  K  K  N  L  F  S  E  K  E  D  N  E  N  N  K  K  L  G  N  N  Y  I  I  F  G  Q  D  T  875

GCAGGATCAGGACAAAGTGGAAAGGAAAGCAATACTGCATTAGAATCTGCAGGAACTTCAAATGAAGTCTCAGAACGTGTTCATGTTTATCACATATTAAAACAT 2730
 A  G  S  G  Q  S  G  K  E  S  N  T  A  L  E  S  A  G  T  S  N  E  V  S  E  R  V  H  V  Y  H  I  L  K  H  910

ATAAAGGATGGCAAAATAAGAATGGGTATGCGTAAATATATAGATACACAAGATGTAAATAAGAAACATTCTTGTACAAGATCCTATGCATTTAATCCAGAGAAT 2835
 I  K  D  G  K  I  R  M  G  M  R  K  Y  I  D  T  Q  D  V  N  K  K  H  S  C  T  R  S  Y  A  F  N  P  E  N  945

TATGAAAAATGTGTAAATTTATGTAATGTGAACTGGAAAACATGCGAGGAAAAAACATCACCAGGACTTTGTTTATCCAAATTGGATACAAATAACGAATGTTAT 2940
 Y  E  K  C  V  N  L  C  N  V  N  W  K  T  C  E  E  K  T  S  P  G  L  C  L  S  K  L  D  T  N  N  E  C  Y  980

TTCTGTTATGTATAAAATAATATAACAAAAAAAAAAAAAA                                                                2981
 F  C  Y  V  *                                                                                           984
```

FIG.21B

```
   1 GAAGCAATAG CTTGTATGCT TTTTATTTGA TTAACTAGTC ATAAAAATCG GGATCCTTCT
  61 TTATTCTATA CTTAAAAAGT GAAAATAAAT ACAAAGGTTC TTGAGGGTTG TGTTAAATTG
 121 AAAGCGAGAA ATAATCATAA ATTATTTCAT TATCGCGATA TCCGTTAAGT TTGTATCGTA
 181 ATGGAGTCTC CCTCGGCCCC TCCCCACAGA TGGTGCATCC CCTGGCAGAG GCTCCTGCTC
 241 ACAGCCTCAC TTCTAACCTT CTGGAACCCG CCCACCACTG CCAAGCTCAC TATTGAATCC
 301 ACGCCGTTCA ATGTCGCAGA GGGGAAGGAG GTGCTTCTAC TTGTCCACAA TCTGCCCCAG
 361 CATCTTTTTG GCTACAGCTG GTACAAAGGT GAAAGAGTGG ATGGCAACCG TCAAATTATA
 421 GGATATGTAA TAGGAACTCA ACAAGCTACC CCAGGGCCCG CATACAGTGG TCGAGAGATA
 481 ATATACCCCA ATGCATCCCT GCTGATCCAG AACATCATCC AGAATGACAC AGGATTCTAC
 541 ACCCTACACG TCATAAAGTC AGATCTTGTG AATGAAGAAG CAACTGGCCA GTTCCGGGTA
 601 TACCCGGAGC TGCCCAAGCC CTCCATCTCC AGCAACAACT CCAAACCCGT GGAGGACAAG
 661 GATGCTGTGG CCTTCACCTG TGAACCTGAG ACTCAGGACG CAACCTACCT GTGGTGGGTA
 721 AACAATCAGA GCCTCCCGGT CAGTCCCAGG CTGCAGCTGT CCAATGGCAA CAGGACCCTC
 781 ACTCTATTCA ATGTCACAAG AAATGACACA GCAAGCTACA AATGTGAAAC CCAGAACCCA
 841 GTGAGTGCCA GGCGCAGTGA TTCAGTCATC CTGAATGTCC TCTATGGCCC GGATGCCCCC
 901 ACCATTTCCC CTCTAAACAC ATCTTACAGA TCAGGGGAAA ATCTGAACCT CTCCTGCCAC
 961 GCAGCCTCTA ACCCACCTGC ACAGTACTCT TGGTTTGTCA ATGGGACTTT CCAGCAATCC
1021 ACCCAAGAGC TCTTTATCCC CAACATCACT GTGAATAATA GTGGATCCTA TACGTGCCAA
1081 GCCCATAACT CAGACACTGG CCTCAATAGG ACCACAGTCA CGACGATCAC AGTCTATGCA
1141 GAGCCACCCA AACCCTTCAT CACCAGCAAC AACTCCAACC CCGTGGAGGA TGAGGATGCT
1201 GTAGCCTTAA CCTGTGAACC TGAGATTCAG AACACAACCT ACCTGTGGTG GGTAAATAAT
1261 CAGAGCCTCC CGGTCAGTCC CAGGCTGCAG CTGTCCAATG ACAACAGGAC CCTCACTCTA
1321 CTCAGTGTCA CAAGGAATGA TGTAGGACCC TATGAGTGTG GAATCCAGAA CGAATTAAGT
1381 GTTGACCACA GCGACCCAGT CATCCTGAAT GTCCTCTATG GCCCAGACGA CCCCACCATT
1441 TCCCCCTCAT ACACCTATTA CCGTCCAGGG GTGAACCTCA GCCTCTCCTG CCATGCAGCC
1501 TCTAACCCAC CTGCACAGTA TTCTTGGCTG ATTGATGGGA ACATCCAGCA ACACACACAA
1561 GAGCTCTTTA TCTCCAACAT CACTGAGAAG AACAGCGGAC TCTATACCTG CCAGGCCAAT
1621 AACTCAGCCA GTGGCCACAG CAGGACTACA GTCAAGACAA TCACAGTCTC TGCGGAGCTG
1681 CCCAAGCCCT CCATCTCCAG CAACAACTCC AAACCCGTGG AGGACAAGGA TGCTGTGGCC
1741 TTCACCTGTG AACCTGAGGC TCAGAACACA ACCTACCTGT GGTGGGTAAA TGGTCAGAGC
1801 CTCCCAGTCA GTCCCAGGCT GCAGCTGTCC AATGGCAACA GGACCCTCAC TCTATTCAAT
1861 GTCACAAGAA ATGACGCAAG AGCCTATGTA TGTGGAATCC AGAACTCAGT GAGTGCAAAC
1921 CGCAGTGACC CAGTCACCCT GGATGTCCTC TATGGGCCGG ACACCCCCAT CATTTCCCCC
1981 CCAGACTCGT CTTACCTTTC GGGAGCGAAC CTCAACCTCT CCTGCCACTC GGCCTCTAAC
2041 CCATCCCCGC AGTATTCTTG GCGTATCAAT GGGATACCGC AGCAACACAC ACAAGTTCTC
2101 TTTATCGCCA AAATCACGCC AAATAATAAC GGGACCTATG CCTGTTTTGT CTCTAACTTG
2161 GCTACTGGCC GCAATAATTC CATAGTCAAG AGCATCACAG TCTCTGCATC TGGAACTTCT
2221 CCTGGTCTCT CAGCTGGGGC CACTGTCGGC ATCATGATTG GAGTGCTGGT TGGGGTTGCT
2281 CTGATATAGT TTTTATCTCG AGGAATTCCT GCAGCCCGGG GTGACCTAAT TAATTAAGCT
2341 ACAAATAGTT TCGTTTTCAC CTTGTCTAAT AACTAATTAA TTAACCGGGT TTTTATAGCT
2401 AATTAGTCAA ATGTGAGTTA ATATTAGTAT ACTA
```

FIG.22

```
   1 TAAAAATAAA TCACTTTTTA TACTAATATT TAATTAATTA AGCTTGGTAC CCTCGAAGCT
  61 TCTTTATTCT ATACTTAAAA AGTGAAAATA AATACAAAGG TTCTTGAGGG TTGTGTTAAA
 121 TTGAAAGCGA GAAATAATCA TAAATTATTT CATTATCGCG ATATCCGTTA AGTTTGTATC
 181 GTAATGGAGT CTCCCTCGGC CCCTCCCCAC AGATGGTGCA TCCCCTGGCA GAGGCTCCTG
 241 CTCACAGCCT CACTTCTAAC CTTCTGGAAC CCGCCCACCA CTGCCAAGCT CACTATTGAA
 301 TCCACGCCGT TCAATGTCGC AGAGGGGAAG GAGGTGCTTC TACTTGTCCA CAATCTGCCC
 361 CAGCATCTTT TTGGCTACAG CTGGTACAAA GGTGAAAGAG TGGATGGCAA CCGTCAAATT
 421 ATAGGATATG TAATAGGAAC TCAACAAGCT ACCCCAGGGC CCGCATACAG TGGTCGAGAG
 481 ATAATATACC CCAATGCATC CCTGCTGATC CAGAACATCA TCCAGAATGA CACAGGATTC
 541 TACACCCTAC ACGTCATAAA GTCAGATCTT GTGAATGAAG AAGCAACTGG CCAGTTCCGG
 601 GTATACCCGG AGCTGCCCAA GCCCTCCATC TCCAGCAACA ACTCCAAACC CGTGGAGGAC
 661 AAGGATGCTG TGGCCTTCAC CTGTGAACCT GAGACTCAGG ACGCAACCTA CCTGTGGTGG
 721 GTAAACAATC AGAGCCTCCC GGTCAGTCCC AGGCTGCAGC TGTCCAATGG CAACAGGACC
 781 CTCACTCTAT TCAATGTCAC AAGAAATGAC ACAGCAAGCT ACAAATGTGA AACCCAGAAC
 841 CCAGTGAGTG CCAGGCGCAG TGATTCAGTC ATCCTGAATG TCCTCTATGG CCCGGATGCC
 901 CCCACCATTT CCCCTCTAAA CACATCTTAC AGATCAGGGG AAAATCTGAA CCTCTCCTGC
 961 CACGCAGCCT CTAACCCACC TGCACAGTAC TCTTGGTTTG TCAATGGGAC TTTCCAGCAA
1021 TCCACCCAAG AGCTCTTTAT CCCCAACATC ACTGTGAATA ATAGTGGATC CTATACGTGC
1081 CAAGCCCATA ACTCAGACAC TGGCCTCAAT AGGACCACAG TCACGACGAT CACAGTCTAT
1141 GCAGAGCCAC CCAAACCCTT CATCACCAGC AACAACTCCA ACCCCGTGGA GGATGAGGAT
1201 GCTGTAGCCT TAACCTGTGA ACCTGAGATT CAGAACACAA CCTACCTGTG GTGGGTAAAT
1261 AATCAGAGCC TCCCGGTCAG TCCCAGGCTG CAGCTGTCCA ATGACAACAG GACCCTCACT
1321 CTACTCAGTG TCACAAGGAA TGATGTAGGA CCCTATGAGT GTGGAATCCA GAACGAATTA
1381 AGTGTTGACC ACAGCGACCC AGTCATCCTG AATGTCCTCT ATGGCCCAGA CGACCCCACC
1441 ATTTCCCCCT CATACACCTA TTACCGTCCA GGGGTGAACC TCAGCCTCTC CTGCCATGCA
1501 GCCTCTAACC CACCTGCACA GTATTCTTGG CTGATTGATG GGAACATCCA GCAACACACA
1561 CAAGAGCTCT TTATCTCCAA CATCACTGAG AAGAACAGCG GACTCTATAC CTGCCAGGCC
1621 AATAACTCAG CCAGTGGCCA CAGCAGGACT ACAGTCAAGA CAATCACAGT CTCTGCGGAG
1681 CTGCCCAAGC CCTCCATCTC CAGCAACAAC TCCAAACCCG TGGAGGACAA GGATGCTGTG
1741 GCCTTCACCT GTGAACCTGA GGCTCAGAAC ACAACCTACC TGTGGTGGGT AAATGGTCAG
1801 AGCCTCCCAG TCAGTCCCAG GCTGCAGCTG TCCAATGGCA ACAGGACCCT CACTCTATTC
1861 AATGTCACAA GAAATGACGC AAGAGCCTAT GTATGTGGAA TCCAGAACTC AGTGAGTGCA
1921 AACCGCAGTG ACCCAGTCAC CCTGGATGTC CTCTATGGGC CGGACACCCC CATCATTTCC
1981 CCCCCAGACT CGTCTTACCT TTCGGGAGCG AACCTCAACC TCTCCTGCCA CTCGGCCTCT
2041 AACCCATCCC CGCAGTATTC TTGGCGTATC AATGGGATAC CGCAGCAACA CACACAAGTT
2101 CTCTTTATCG CCAAAATCAC GCCAAATAAT AACGGGACCT ATGCCTGTTT TGTCTCTAAC
2161 TTGGCTACTG GCCGCAATAA TTCCATAGTC AAGAGCATCA CAGTCTCTGC ATCTGGAACT
2221 TCTCCTGGTC TCTCAGCTGG GGCCACTGTC GGCATCATGA TTGGAGTGCT GGTTGGGGTT
2281 GCTCTGATAT AGTTTTTATC TCGAGGGATC CCCCGGGTAG CTAGCTAATT TTTCTTTTAC
2341 GTATTATAT
```

FIG.23

```
1   ATGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTCACATTGACACTTGTGCTCCTTGTCAACAGC
61  GCACCCACTTCAAGCTCCACTTCAAGCTCTACAGCGGAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAG
121 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCACCTGGAGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGC
181 AGGATGGAGAATTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTTG
241 CCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATGAACTTGGACCTCTG
301 CGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAAGCTTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTC
361 ATCAGCAATATCAGAGTAACTGTTGTAAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGC
421 CAATTCGATGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCTTCTGT
481 CAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAATAA
```

FIG.24

```
1   ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGT
61  GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTTCTGGAT
121 TTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTC
181 ACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA
241 GAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTA
301 AGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAA
361 ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGA
421 TGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTTGA
```

FIG.25

```
1   ACATCATGCAGTGGTTAAACAAAAACATTTTTATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATAT
61  ATATCATTATATTACAAAGTACAATTATTTAGGTTTAATCATGAACGCTACACACTGCAT
121 CTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCAT
181 TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAAAA
241 GAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGAACTGGCAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCA
301 GAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGACAATCAGGCCAT
361 CAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCAACAGCAA
421 GGCGAAAAAGGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCCA
481 GCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCT
541 CAGGAAGCGGAAAAGGAGTCGCTGCTGATTCGGGGTGGGGAAGAGATTGTCCCAATAA
```

FIG.26

```
1   ACATCATGCAGTGGTTAAACAAAAACATTTTTATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATAT
61  ATATCATTATATTACAAAGTACAATTATTTAGGTTTAATCATGAAATATACAAGTTATAT
121 CTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATA
181 TGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGA
241 TAATGGAACTCTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAAT
301 AATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACTTTTTAAAAACTTTAAAGATGACCA
361 GAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAG
421 CAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTTGAA
481 TGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGC
541 TAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCAAGGTCGAAGAGCATCCCAGTA
601 A
```

FIG.27

```
1     AAGCTTCTATCAAAAGTCTTAATGAGTTAGGTGTAGATAGTATAGATATTACTACAAAGG
61    TATTCATATTTCCTATCAATTCTAAAGTAGATGATATTAATAACTCAAAGATGATGATAG
121   TAGATAATAGATACGCTCATATAATGACTGCAAATTTGGACGGTTCACATTTTAATCATC
181   ACGCGTTCATAAGTTTCAACTGCATAGATCAAAATCTCACTAAAAAGATAGCCGATGTAT
241   TTGAGAGAGATTGGACATCTAACTACGCTAAAGAAATTACAGTTATAAATAATACATAAT
301   GGATTTTGTTATCATCAGTTATATTTAACATAAGTACAATAAAAAGTATTAAATAAAAAT
361   ACTTACTTACGAAAAAATGTCATTATTACAAAAACTATATTTTACAGAACAATCTATAGT
421   AGAGTCCTTTAAGAGTTATAATTTAAAAGATAACCATAATGTAATATTTACCACATCAGA
481   TGATGATACTGTTGTAGTAATAAATGAAGATAATGTACTGTTATCTACAAGATTATTATC
541   ATTTGATAAAATTCTGTTTTTTAACTCCTTTAATAACGGTTTATCAAAATACGAAACTAT
601   TAGTGATACAATATTAGATATAGATACTCATAATTATTATATACCTAGTTCTTCTTCTTT
661   GTTAGATATTCTAAAAAAAAGAGCGTGTGATTTAGAATTAGAAGATCTAAATTATGCGTT
721   AATAGGAGACAATAGTAACTTATATTATAAAGATATGACTTACATGAATAATTGGTTATT
781   TACTAAAGGATTATTAGATTACAAGTTTGTATTATTGCGCGATGTAGATAAATGTTACAA
841   ACAGTATAATAAAAAGAATACTATAATAGATATAATACATCGCGATAACAGACAGTATAA
901   CATATGGGTTAAAAATGTTATAGAATACTGTTCTCCTGGCTATATATTATGGTTACATGA
961   TCTAAAAGCCGCTGCTGAAGATGATTGGTTAAGATACGATAACCGTATAAACGAATTATC
1021  TGCGGATAAATTATACACTTTCGAGTTCATAGTTATATTAGAAAATAATATAAAACATTT
1081  ACGAGTAGGTACAATAATTGTACATCCAAACAAGATAATAGCTAATGGTACATCTAATAA
1141  TATACTTACTGATTTTCTATCTTACGTAGAAGAACTAATATATCATCATAATTCATCTAT
1201  AATATTGGCCGGATATTTTTTAGAATTCTTTGAGACCACTATTTTATCAGAATTTATTTC
1261  TTCATCTTCTGAATGGGTAATGAATAGTAACTGTTTAGTACACCTGAAAACAGGGTATGA
1321  AGCTATACTCTTTGATGCTAGTTTATTTTTCCAACTCTCTACTAAAAGCAATTATGTAAA
1381  ATATTGGACAAAGAAAACTTTGCAGTATAAGAACTTTTTTAAAGACGGTAAACAGTTAGC
1441  AAAATATATAATTAAGAAAGATAGTCAGGTGATAGATAGAGTATGTTATTTACACGCAGC
1501  TGTATATAATCACGTAACTTACTTAATGGATACGTTTAAAATTCCTGGTTTTGATTTTAA
1561  ATTCTCCGGAATGATAGATATACTACTGTTTGGAATATTGCATAAGGATAATGAGAATAT
1621  ATTTTATCCGAAACGTGTTTCTGTAACTAATATAATATCAGAATCTATCTATGCAGATTT
1681  TTACTTTATATCAGATGTTAATAAATTCAGTAAAAAGATAGAATATAAAACTATGTTTCC
1741  TATACTCGCAGAAAACTACTATCCAAAAGGAAGGCCCTATTTTACACATACATCTAACGA
1801  AGATCTTCTGTCTATCTGTTTATGCGAAGTAACAGTTTGTAAAGATATAAAAAATCCATT
1861  ATTATATTCTAAAAAGGATATATCAGCAAAACGATTCATAGGTTTATTTACATCTGTCGA
1921  TATAAATACGGCTGTTGAGTTAAGAGGATATAAAATAAGAGTAATAGGATGTTTAGAATG
1981  GCCTGAAAAGATAAAAATATTTAATTCTAATCCTACATACATTAGATTATTACTAACAGA
2041  AAGACGTTTAGATATTCTACATTCCTATCTGCTTAAATTTAATATAACAGAGGATATAGC
2101  TACCAGAGATGGAGTCAGAAATAATTTACCTATAATTTCTTTTATCGTCAGTTATTGTAG
2161  ATCGTATACTTATAAATTACTAAATTGCCATATGTACAATTCGTGTAAGATAACAAAGTG
2221  TAAATATAATCAGGTAATATATAATCCTATATAGGAGTATATATAATTGAAAAAGTAAAA
2281  TATAAATCATATAATAATGAAACGAAATATCAGTAATAGACAGGAACTGGCAGATTCTTC
2341  TTCTAATGAAGTAAGTACTGCTAAATCTCCAAAATTAGATAAAAATGATACAGCAAATAC
2401  AGCTTCATTCAACGAATTACCTTTTAATTTTTTCAGACACACCTTATTACAAACTAACTA
2461  AGTCAGATGATGAGAAAGTAAATATAAATTTAACTTATGGGTATAATATAATAAAGATTC
2521  ATGATATTAATAATTTACTTAACGATGTTAATAGACTTATTCCATCAACCCCTTCAAACC
2581  TTTCTGGATATTATAAAATACCAGTTAATGATATTAAAATAGATTGTTTAAGAGATGTAA
2641  ATAATTATTTGGAGGTAAAGGATATAAAATTAGTCTATCTTTCACATGGAAATGAATTAC
2701  CTAATATTAATAATTATGATAGGAATTTTTTAGGATTTACAGCTGTTATATGTATCAACA
2761  ATACAGGCAGATCTATGGTTATGGTAAAACACTGTAACGGGAAGCAGCATTCTATGGTAA
2821  CTGGCCTATGTTTAATAGCCAGATCATTTTACTCTATAAACATTTTACCACAAATAATAG
2881  GATCCTCTAGATATTTAATATTATATCTAACAACAACAAAAAAATTTAACGATGTATGGC
2941  CAGAAGTATTTTCTACTAATAAAGATAAAGATAGTCTATCTTATCTACAAGATATGAAAG
3001  AAGATAATCATTTAGTAGTAGCTACTAATATGGAAAGAAATGTATACAAAAACGTGGAAG
3061  CTT
```

FIG.28

```
1     GAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTTAGGTGTAGATAGTATAGATATTAC
61    TACAAAGGTATTCATATTTCCTATCAATTCTAAAGTAGATGATATTAATAACTCAAAGAT
121   GATGATAGTAGATAATAGATACGCTCATATAATGACTGCAAATTTGGACGGTTCACATTT
181   TAATCATCACGCGTTCATAAGTTTCAACTGCATAGATCAAAATCTCACTAAAAAAGATAGC
241   CGATGTATTTGAGAGAGATTGGACATCTAACTACGCTAAAGAAATTACAGTTATAAATAA
301   TACATAATGGATTTTGTTATCATCAGTTATATTTAACATAAGTACAATAAAAAGTATTAA
361   ATAAAAATACTTACTTACGAAAAATGACTAATTAGCTATAAAAACCCGGGCTGCAGCTCG
421   AGGAATTCTTTTTATTGATTAACTAGTCAAATGAGTATATATAATTGAAAAAGTAAAATA
481   TAAATCATATAATAATGAAACGAAATATCAGTAATAGACAGGAACTGGCAGATTCTTCTT
541   CTAATGAAGTAAGTACTGCTAAATCTCCAAAATTAGATAAAAATGATACAGCAAATACAG
601   CTTCATTCAACGAATTACCTTTTAATTTTTTCAGACACACCTTATTACAAACTAACTAAG
661   TCAGATGATGAGAAAGTAAATATAAATTTAACTTATGGGTATAATATAATAAAGATTCAT
721   GATATTAATAATTTACTTAACGATGTTAATAGACTTATTCCATCAACCCCTTCAAACCTT
781   TCTGGATATTATAAAATACCAGTTAATGATATTAAAATAGATTGTTTAAGAGATGTAAAT
841   AATTATTTGGAGGTAAAGGATATAAAATTAGTCTATCTTTCACATGGAAATGAATTACCT
901   AATATTAATAATTATGATAGGAATTTTTTAGGATTTACAGCTGTTATATGTATCAACAAT
961   ACAGGCAGATCTATGGTTATGGTAAAACACTGTAACGGGAAGCAGCATTCTATGGTAACT
1021  GGCCTATGTTTAATAGCCAGATCATTTTACTCTATAAACATTTTACCACAAATAATAGGA
1081  TCCTCTAGATATTTAATATTATATCTAACAACAACAAAAAAATTTAACGATGTATGGCCA
1141  GAAGTATTTTCTACTAATAAAGATAAAGATAGTCTATCTTATCTACAAGATATGAAAGAA
1201  GATAATCATTTAGTAGTAGCTACTAATATGGAAAGAAATGTATACAAAAACGTGGAAGCT
1261  TTTATATTAAATAGCATATTACTAGAAGATTTAAAATCTAGACTTAGTATAACAAAACAG
1321  TTAAATGCCAATATCGATTCTATATTTCATCATAACAGTAGTACATTAATCAGTGATATA
1381  CTGAAACGATCTACAGACTCAACTATGCAAGGAATAAGCAATATGCCAATTATGTCTAAT
1441  ATTTTAACTTTAGAACTAAAACGTTCTACCAATACTAAAAATAGGATACGTGATAGGCTG
1501  TTAAAAGCTGCAATAAATAGTAAGGATGTAGAAGAAATACTTTGTTCTATACCTTCGGAG
1561  GAAAGAACTTTAGAACAACTTAAGTTTAATCAAACTTGTATTTATGAAGGTACC
```

FIG.29

```
1     GAATTCGAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGTTAGTTCTC
61    TCTAAAAATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGTTGTCATCCTGCTCTTCTTTCTCGAATGTAC
121   CAGGAGCCATATCCACGGATGCGACAAAAATCACTTGAGAGAGATCATCGGCATTTTGAA
181   CGAGGTCACAGGAGAAGGGACGCCATGCACGGAGATGGATGTGCCAAACGTCCTCACAGC
241   AACGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCTCGTCTGTAGGGCTTCCAAGGTGCTTCGTATATT
301   TTATTTAAAACATGGGAAAACTCCATGCTTGAAGAAGAACTCTAGTGTTCTCATGGAGCT
361   GCAGAGACTCTTTCGGGCTTTTCGATGCCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATGAATGA
421   GTCCAAGTCCACATCACTGAAAGACTTCCTGGAAAGCCTAAAGAGCATCATGCAAATGGA
481   TTACTCGTAG
```

FIG.30

```
1     GAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAA
61    AATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGTTCTTCCTGCTAGCATGTGCCGGCAA
121   CTTTGTCCACGGACACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGATCATCAAAACTTTGAACAG
181   CCTCACAGAGCAGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTC
241   CAAGAACACAACTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCAGTTCTA
301   CAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCA
361   CAAGCAGCTGATCCGATTCCTGAAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGCTT
421   GAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTTGGAAAACTTCTTGGAAAGGCT
481   AAAGACGATCATGAGAGAGAAATATTCAAAGTGTTCGAGCTGA
```

FIG.31

```
1    GAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAA
61   AATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGC
121  CCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCG
181  GCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCAT
241  CTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAA
301  GCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCA
361  CTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGACTATCACCTT
421  TGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGA
481  GCCAGTCCAGGAGTGA
```

FIG.32

```
1    CAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTG
61   GTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGT
121  TTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTG
181  TGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGG
241  CTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTG
301  TCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGG
361  AATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAG
421  ATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTAC
481  TGATTTGACATTCAGTGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTG
541  CGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTC
601  AGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGT
661  CATGGTGGATGCCGTTCACAAGCTCAAGTATGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAG
721  GGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCG
781  GCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTC
841  CCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTT
901  CACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGC
961  CCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTAG
```

FIG.33

```
1    GAATAAAAAAATGATAAAGTAGGTTCAGTTTTATTGCTGGTTGTGTTAGTTCTCTCTAAA
61   AATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCAG
121  TTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCA
181  CTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGA
241  ATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAG
301  CACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAG
361  AGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGAT
421  GGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGAC
481  CATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCT
541  GGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAA
601  ATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCA
661  TGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGACAGAGTGACGAGCTATCTGAATGCTTCCTA
721  A
```

FIG.34

```
1   ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTCCAAGG
61  CTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGATGTTGATGAA
121 CAACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACTCTCCTCAT
181 GAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAGTGGTGCTGTCTGTC
241 ATTGCTGGGAAACTAAAAGTGTGGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACT
301 ACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGGTCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTC
361 GTTCAAAAGAAGGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCC
421 ATCAAAGCTGACTTCTCTACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACT
481 AAAAGGATTACCTGCTTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAA
541 AATGGAAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
601 TACACCATTAGTAGCCAACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGTGTCTC
661 ATTAAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAAAAACCCCCAGAAGAC
721 CCTCCTGATAGCAAGAACACACTTGTGCTCTTTGGGGCAGGATTCGGCGCAGTAATAACA
801 GTCGTCGTCATCGTTGTCATCATCAAATGCTTCTGTAAGCACAGAAGCTGTTTCAGAAGA
861 AATGAGGCAAGCAGAGAAACAAACAACAGCCTTACCTTCGGGCCTGAAGAAGCATTAGCT
901 GAACAGACCGTCTTCCTTTAG
```

FIG.35

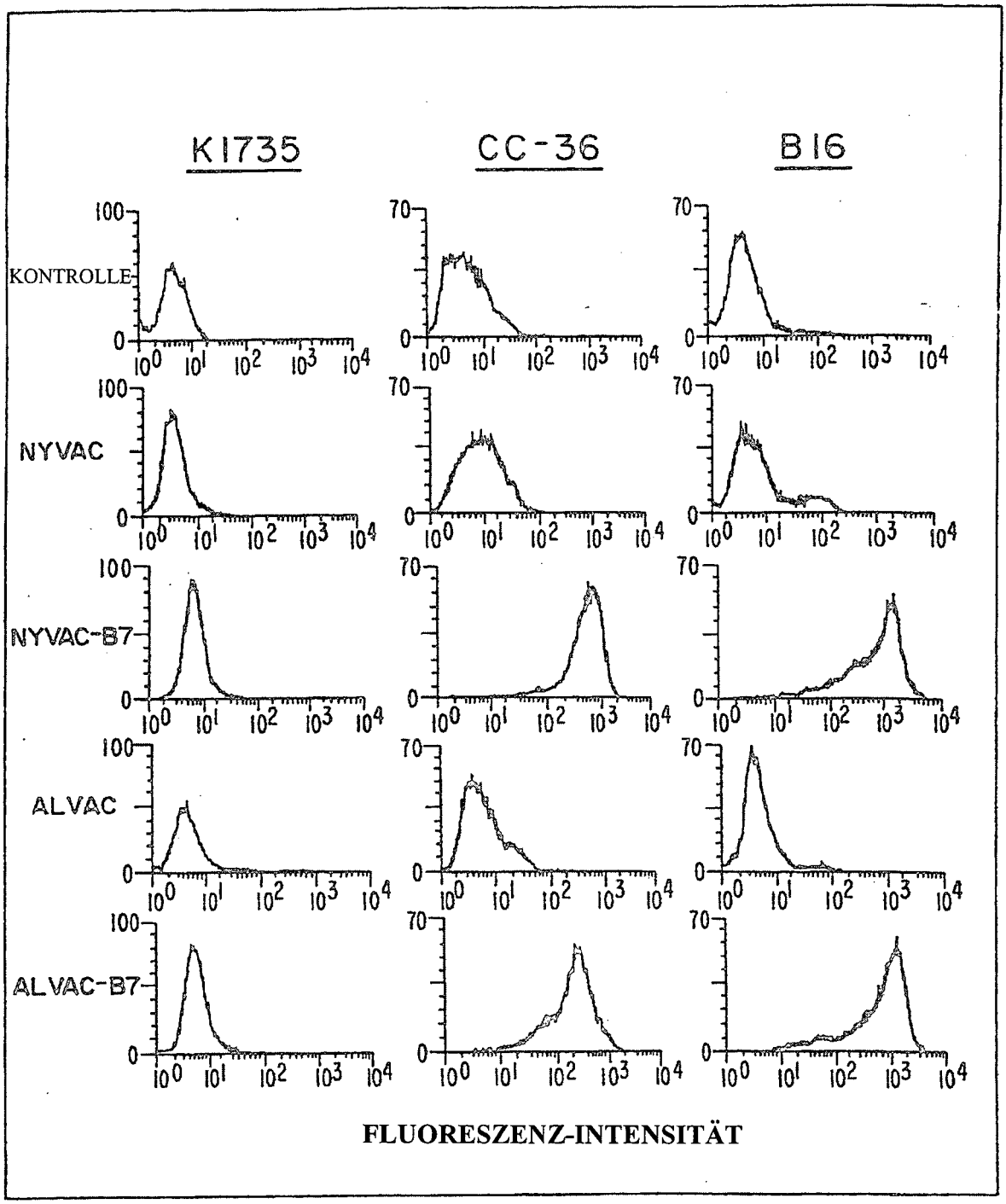

K1735
CC-36
B16
KONTROLLE
NYVAC
NYVAC-B7
ALVAC
ALVAC-B7
100
70
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FLUORESZENZ-INTENSITÄT

FIG.36

```
1    ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTT
61   CAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAG
121  GAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCA
181  CAAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGAC
241  ATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCC
301  ATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAG
361  TATGAAAAAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCT
421  GACTTCCCTACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACTTCTAATATTAGAAGGATA
481  ATTTGCTCAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAA
541  GAATTAAATGCCATCAACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTT
601  AGCAGCAAACTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTAT
661  GGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCAAGCAAGAGCATTTTCCT
721  GATAACCTGCTCCCATCCTGGGCCATTACCTTAATCTCAGTAAATGGAATTTTTGTGATA
781  TGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCCCCAAGATGCAGAGAGAGAAGGAGGAATGAGAGATTG
841  AGAAGGGAAAGTGTACGCCCTGTATAA
```

FIG.37

```
1     ATGACTGCCATGGAGGAGTCACAGTCGGATATCAGCCTCGAGCTCCCTCTGAGCCAGGAG
61    ACATTTTCAGGCTTATGGAAACTACTTCCTCCAGAAGATATCCTGCCATCACCTCACTGC
121   ATGGACGATCTGTTGCTGCCCCAGGATGTTGAGGAGTTTTTTGAAGGCCCAAGTGAAGCC
181   CTCCGAGTGTCAGGAGCTCCTGCAGCACAGGACCCTGTCACCGAGACCCCTGGGCCAGTG
241   GCCCCTGCCCCAGCCACTCCATGGCCCCTGTCATCTTTTGTCCCTTCTCAAAAAACTTAC
301   CAGGGCAACTATGGCTTCCACCTGGGCTTCCTGCAGTCTGGGACAGCCAAGTCTGTTATG
361   TGCACGTACTCTCCTCCCCTCAATAAGCTATTCTGCCAGCTGGCGAAGACGTGCCCTGTG
421   CAGTTGTGGGTCAGCGCCACACCTCCAGCTGGGAGCCGTGTCCGCGCCATGGCCATCTAC
481   AAGAAGTCACAGCACATGACGGAGGTCGTGAGACGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCC
541   GATGGTGATGGCCTGGCTCCTCCCCAGCATCTTATCCGGGTGGAAGGAAATTTGTATCCC
601   GAGTATCTGGAAGACAGGCAGACTTTTCGCCACAGCGTGGTGGTACCTTATGAGCCACCC
661   GAGGCCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGCATG
721   GGGGGCATGAACCGCCGACCTATCCTTACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGGAAC
781   CTTCTGGGACGGGACAGCTTTGAGGTTCGTGTTTGTGCCTGCCCTGGGAGAGACCGCCGT
841   ACAGAAGAAGAAAATTTCCGCAAAAAGGAAGTCCTTTGCCCTGAACTGCCCCCAGGGAGC
901   GCAAAGAGAGCGCTGCCCACCTGCACAAGCGCCTCTCCCCCGCAAAAGAAAAAACCACTT
961   GATGGAGAGTATTTCACCCTCAAGATCCGCGGGCGTAAACGCTTCGAGATGTTCCGGGAG
1021  CTGAATGAGGCCTTAGAGTTAAAGGATGCCCATGCTACAGAGGAGTCTGGAGACAGCAGG
1081  GCTCACTCCAGCTACCTGAAGACCAAGAAGGGCCAGTCTACTTCCCGCCATAAAAAAACA
1141  ATGGTCAAGAAAGTGGGGCCTGACTCAGACTGA
```

FIG.38

```
1     ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCA
61    GACCTATGGAAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATG
121   GATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCA
181   GATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCCT
241   ACACCGGCGGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAG
301   AAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAG
361   TCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACC
421   TGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATG
481   GCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAG
541   CGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAAT
601   TTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTAT
661   GAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACTACATGTGTAACAGT
721   TCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCC
781   AGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGA
841   GACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCC
901   CCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAG
961   AAACCACTGGATGGAGAATATTTCACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATG
1021  TTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGG
1081  GGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCAT
1141  AAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA
```

FIG.39