

**Orf Virusvektor: Entwicklung neuer
Selektionsstrategien, Identifikation neuer Fremdgen-
Insertionsorte sowie Herstellung, Charakterisierung und
Wirksamkeit eines rekombinanten Tollwutimpfstoffs**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Ralf Ernst Amann

aus Sigmaringen

Tübingen

2014

Meiner Familie und Meli,
meinen Freunden,
dem BVB

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

<u>1</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>3</u>
<u>3</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>5</u>
3.1	IMPfstoffe	5
3.2	DAS ORF-VIRUS	6
3.2.1	KLASSIFIZIERUNG, MORPHOLOGIE UND GENOM	6
3.2.2	VIRALE REPLIKATION	7
3.2.3	KLINISCHE MANIFESTATION, PATHOGENITÄT UND ZOONOTISCHES POTENZIAL	7
3.2.4	ORFV ALS IMMUNSTIMULIERENDER, APATHOGENER VEKTOR	8
3.2.5	DIE ENTWICKLUNG DES ORFV-VEKTORS D1701-V	9
3.3	DAS TOLLWUTVIRUS UND TOLLWUTIMPfstoffe	10
3.4	DAS INFLUENZA A VIRUS (IAV) UND IMPfstoffe GEGEN IAV	12
<u>4</u>	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>16</u>
<u>5</u>	<u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</u>	<u>18</u>
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</u>	<u>20</u>
6.1	AKZEPTIERTE PUBLIKATIONEN: ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
6.1.1	„ A NEW RABIES VACCINE BASED ON A RECOMBINANT ORF VIRUS (PARAPOXVIRUS) EXPRESSING THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN“	20
6.1.2	„ NEW ORF VIRUS (PARAPOXVIRUS) RECOMBINANT EXPRESSING H5 HEMAGGLUTININ PROTECTS MICE AGAINST H5N1 AND H1N1 INFLUENZA A VIRUS“	28
6.2	ZUR VERÖFFENTLICHUNG VORBEREITETE ERGEBNISTEILE	34
6.2.1	HERSTELLUNG EINES POLYVALENTEN ORFV-VEKTORS - EINLEITUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION	34
6.2.2	NEUE SELEKTIONSMETHODEN ZUR ISOLIERUNG REKOMBINANTER ORFV - EINLEITUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
<u>7</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>55</u>
<u>8</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>67</u>
<u>9</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>70</u>
<u>10</u>	<u>PUBLIKATIONEN</u>	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcGFP	Aequorea coerulea Green Fluorescence Protein
AIV	Aviäres Influenzavirus
bzw.	Beziehungsweise
cdv-H	Canine Distemper Virus H-Protein
dsDNA	double-stranded DNA
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FelV gp70	Felines Leukämievirus Glykoproteinform (70 kDa)
HA	Hämagglutinin
HI	Haemagglutination Inhibition
i.d.	intra-dermal
i.m.	intra-muscular
i.n.	intra-nasal
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venous
IA	Immunantwort
IAV	Influenza A Virus
IF	Immunfluoreszenz
IPMA	Immunperoxidase Monolayer-Assay
ITR	Inverted Terminal Repeat
IU	International Units
kDa	Kilodalton
kpb	Kilobasenpaare
MACS	Magnetic Cell Separation
MCS	Multiple Cloning Site
MVA	Modern Vaccinia Virus Ankara
NA	Neuraminidase
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
ORFV	Orf Virus

Abkürzungsverzeichnis

P	Promoter
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Postexpositions Prophylaxe
RabG	Rabiesvirus Glykoprotein
RV	Rabiesvirus
s.c.	subkutan
sog.	sogenannt
SOIV	Swine Origin Influenza Virus
ssRNA	single-stranded RNA
TF	Transkriptionsfaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VNA	Virusneutralisierender Antikörper
WB	Western Blot

1 Zusammenfassung

Die vorgelegte Dissertation basiert auf Arbeiten mit dem Orf-Virusvektor D1701-V und lässt sich in zwei Schwerpunktthemen, rekombinante Impfstoffentwicklung und Vektormodifikation, untergliedern.

Virale Vektoren stellen eine vielversprechende Plattformtechnologie zur Herstellung rekombinanter Impfstoffe dar, die neben der klassischen Prävention von Infektionskrankheiten zunehmend auch zur Entwicklung neuer, innovativer Therapiekonzepte, wie beispielsweise als therapeutische Tumorimpfstoffe, eingesetzt werden.

Das Orf-Virus (ORFV) gehört zu der Familie der Pockenviren und verfügt über eine Vielzahl an Eigenschaften, welche es als Vektorvakzine interessant macht und gegenüber anderen Plattformtechnologien präferieren. Die hervorragende immunstimulierende und prophylaktisch nutzbare Wirkung ORFV-basierter Rekombinanten konnte in den letzten Jahren durch die Etablierung einer Reihe von Vakzinen gegen unterschiedliche virale Infektionskrankheiten gezeigt werden.

Im Rahmen meiner Dissertation konnte ich einen rekombinanten, ORFV-basierten Tollwutimpfstoff entwickeln, der das Hauptantigen des Tollwutvirus, das Rabiesvirus Glykoprotein (RabG) exprimiert. In diesem Zusammenhang wurden die RabG-Expression und die Wachstumseigenschaften des rekombinanten ORFV *in vitro* charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Integration des RabG-Fremdgens in das virale Genom die charakteristischen Eigenschaften des ORFV-Vektors nicht verändert. Zudem konnte eine frühe, starke Oberflächenexpression des RabG-Fremdgens nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit, Immunogenität, Verträglichkeit und Sicherheit des Impfstoffs *in vivo* untersucht. Der neue rekombinante Impfstoff besitzt eine hervorragende Immunantwort und vermittelt

langanhaltenden Schutz in unterschiedlichen Tierspezies. Vergleiche mit bereits zugelassenen Tollwutimpfstoffen demonstrierten dessen Überlegenheit. Zusätzliche, extern ausgeführte Tierversuche (Charles Rivers Laboratories, Irland) dokumentierten unabhängig neben einer sehr starken Induktion der Immunantwort, die sehr gute Impfstoffverträglichkeit und Bio-Sicherheit (keine Biodistribution). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort über verschiedene Applikationsrouten induziert werden kann. Insbesondere ist hierbei die Induktion nach oraler bzw. intranasaler Gabe zu nennen, womit prinzipiell die Voraussetzung für die Anwendung als flächendeckender Impfstoff für wildlebende Tiere gegeben ist. Auch konnte nach bereits erfolgter Tollwutinfektion in der Maus eine therapeutische Wirkung der Vakzine nachgewiesen werden.

Darüber hinaus gelangen während meiner Dissertation bedeutende Weiterentwicklungen des ORFV-Vektorsystems hinsichtlich Variabilität und Verwendungsmöglichkeiten. So wurde ein weiterer Bereich im viralen Genom identifiziert, der eine stabile Fremdgenexpression ermöglicht. Zusätzlich wurden neue Transferplasmide entwickelt, die eine gleichzeitige Integration mehrerer Fremdgene unter Kontrolle neuentworfener, artifizierlicher früher ORFV-Promotoren in einem Insertionslokalus erlauben. Dies eröffnet bei der Generierung von neuen Rekombinanten eine Vielzahl weiterer Optionen, wie beispielsweise die gleichzeitige Expression mehrere Antigene oder eine Verbesserung der Immunantwort durch Kombination von Antigenen und immunstimulierenden Zytokinen. Weiterhin ergibt sich nun die Möglichkeit, individualisierte Impfstoffe herzustellen die sich aus viralen und patientenspezifischen Antigenen zusammensetzen. Mithilfe des Einsatzes der MACS-Technologie konnte das notwendige Selektionsverfahren so vereinfacht werden, dass sich die Herstellung neuer Rekombinanten von vormals 6-12 Monaten nun innerhalb 1-2 Wochen kostengünstig durchführen lässt, was für therapeutische Anwendungen - insbesondere individualisierte Impfstoffe - eine ganz entscheidende Voraussetzung darstellt.

2 Abstract

The presented PhD thesis describes results of research on the Orf virus vector D1701-V and can be divided into two main topics: Development of recombinant vaccines and modification of the viral vaccine vector.

Viral vectors represent a promising platform for the development of recombinant vaccines to prevent infectious diseases. More recently they were utilized for the development of new, innovative concepts, e.g. the development of therapeutic cancer vaccines.

The Orf virus (ORFV) belongs to the family of *poxviridae* and has several attributes favoring it a promising candidate for a virus-based vaccine vector. During the last decade, the excellent immune stimulating und prophylactic capacity of ORFV-based recombinants against numerous different viral diseases has been demonstrated manifold.

In the context of my PhD thesis I was able to develop a novel, recombinant ORFV-based vaccine against rabies which expresses the major antigen of rabies virus, the rabies glycoprotein (RabG). In this regard I characterized the RabG expression as well as growth characteristics of the recombinant ORFV *in vitro*. The integration of the foreign RabG gene did not affect the distinct properties of the ORFV. In addition, an early strong surface expression of the inserted RabG could be demonstrated. Moreover, efficacy, immunogenicity, tolerance and safety of the vaccine were estimated *in vivo*. The new recombinant vaccine induces excellent immune responses and long-lasting immunity concomitant with protection in different animal species. Comparative experiments with approved commercial rabies vaccines showed the superiority of the ORFV-based vaccine. Outsourced animal immunization experiments (Charles Rivers Laboratories, Ireland) independently documented the induction of a strong immune response and, in addition, safe and well-tolerated viral vector profiles (no side effects or

bio distribution). Furthermore, I could show that the immune response is inducible by several different application routes, whereby the induction after oral or intranasal administration might be of particular importance with respect to vaccination of wildlife animal reservoirs. Moreover, therapeutic efficacy of the recombinant could be demonstrated by successfully immunizing and curing rabies virus infected mice.

In addition to the generation of a potent rabies vaccine, I was able to modify and improve the ORFV vector system in terms of possible applications and variability. Thus, a new region suitable for the stable integration and expression of foreign genes could be identified in the viral genome. Furthermore, new transfer plasmids were designed enabling the simultaneous insertion of several genes of interest which were regulated by distinct artificial early ORFV promoters. This opens numerous additional options for the generation of new recombinants, as for example simultaneous expression of multiple antigens or improvement of immunity by triggering the immune response by co-expression of adequate cytokines. Furthermore the ability of developing individualized vaccines composed of viral and personalized antigens becomes possible. Utilization of MACS technology allowed us to develop a novel, simplified strategy for the selection of new recombinants. Thereby, the time required for generation and selection of recombinants could be shortened dramatically from 6-12 months before to now 1-2 weeks. Our optimized strategy also results in severely reduced costs, which now allows using the ORFV vector platform for therapeutic applications, especially for designing individualized vaccines for e.g. cancer immunotherapies.

3 Einleitung

3.1 Impfstoffe

Impfungen gelten als eine der herausragenden Errungenschaften der Medizin. So führten umfangreiche Impfkampagnen zu einem bedeutsamen Rückgang an Todesfällen durch Infektionskrankheiten und einige hochpathogene Erreger, wie Pocken- oder Polioviren konnten nahezu komplett ausgerottet werden. Basis der eingesetzten Impfstoffe sind dabei zumeist attenuierte (Lebendimpfstoff) oder abgetötete Erreger bzw. einzelne Erregerbestandteile („Subunit“-, Totimpfstoff) (Plotkin, 2005; Plotkin and Plotkin, 2011). Ziel einer Impfung ist das körpereigene Immunsystem dahingehend zu stimulieren, dass eine spezifische Immunantwort gegen relevante Antigene des Pathogens induziert wird ohne dabei der Infektionserkrankung direkt ausgesetzt zu sein. Entscheidend für einen späteren Schutz ist, dass nach der Immunisierung Gedächtniszellen gebildet werden, welche bei nachfolgendem Kontakt mit dem entsprechenden Erreger schnell eine spezifische Immunantwort einleiten und infolgedessen die Infektion möglichst früh und effektiv bekämpfen (Castellino et al., 2009; Pulendran and Ahmed, 2006; Pulendran and Ahmed, 2011; Sallusto et al., 2010). Gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Erreger konnten mithilfe dieser klassischen Impfstoffentwicklung jedoch keine oder nur unzureichende Erfolge erzielt werden (Koff et al., 2013; Rappuoli and Aderem, 2011), sodass Infektionskrankheiten nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit noch immer die zweithäufigste Todesursache darstellen (WHO, 2004). Neue Konzepte zur Entwicklung von Impfstoffen zeigen aber vielversprechende Ansätze (Hoft, Brusica, and Sakala, 2011; Koff et al., 2013; Rueckert and Guzman, 2012; Sette and Rappuoli, 2010). Dabei wird neben Impfstoffen auf DNA-, RNA-, Protein- oder Peptidbasis vermehrt auf die Verwendung rekombinanter viraler Vektoren fokussiert, die sich durch mehrere Vorteile auszeichnen (Draper and Heeney, 2010; Liu, 2010; Nabel, 2013; Rollier et al., 2011). Beispielsweise wird aufgrund ihres

immunstimulierenden Potenzials ihr Einsatz neben der klassischen Prävention von Infektionskrankheiten zunehmend auch innerhalb neuer, innovativer Therapien, wie z.B. als therapeutischer Tumorimpfstoff, erprobt (Dougan and Dranoff, 2009; Goldman and DeFrancesco, 2009; Larocca and Schlom, 2011; Mellman, Coukos, and Dranoff, 2011).

3.2 Das Orf-Virus

3.2.1 Klassifizierung, Morphologie und Genom

Das Orf-Virus (ORFV) stellt den Prototyp der Gattung der Parapockenviren dar und ist der Familie der *Poxviridae* zuzuordnen. ORFV sind behüllte, komplexe dsDNA-Viren von wollknäulartiger Morphologie und einer mittleren Größe von ca. 260 x 160 nm (Abdussalam and Cosslett, 1957; Spehner et al., 2004). Sie besitzen ein lineares, GC-reiches, ca. 130 – 150 kbp großes DNA-Genom, dessen zentraler Bereich beidseitig von ITR-Regionen (Inverted Terminal Repeat) abgegrenzt wird und in einer Haarnadelstruktur endet, welche beide DNA-Einzelstränge kovalent miteinander verknüpft (Baroudy and Moss, 1982; Baroudy, Venkatesan, and Moss, 1982; Büttner and Rziha, 2002; Menna et al., 1979). Im zentralen Bereich des Genoms finden sich überwiegend Gene die hauptsächlich für die virale Replikation und Morphogenese essentiell und innerhalb der Pockenviren hochkonserviert sind (Delhon et al., 2004; Mercer et al., 1995). Dagegen befinden sich in den ITR-Regionen sogenannte nicht-konservierte Virulenzgene welche maßgeblich das Wirtsspektrum, die Pathogenität und die Immunmodulation bestimmen und somit das Virus charakterisieren (Buller and Palumbo, 1991; Haig and Mercer, 1998; McFadden, 2005; McInnes et al., 2001; Seet et al., 2003; Turner and Moyer, 1990). Diese Virulenzgene sind für die Virusvermehrung meist nicht-essentiell, sodass nach Deletion entsprechender Gene oftmals eine Attenuierung des Virus erfolgt.

3.2.2 Virale Replikation

Die virale Replikation ist bei Pockenviren auf das Zytoplasma restringiert und beginnt mit der unspezifischen Bindung des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle (Moss, 2001; Moss, 2011). Nach der Fusion wird das sogenannte virale Core (ein Proteinnukleolid), welches das virale Genom, frühe virale mRNA sowie virale Transkriptionsfaktoren (TF) beinhaltet, in das Zytoplasma freigesetzt (Condit, Moussatche, and Traktman, 2006; Moss, 2001). Nachfolgend beginnt die frühe virale Genexpression, in der unter Kontrolle von poxspezifischen frühen („early“) Promotoren virale mRNA synthetisiert wird. Nach Auflösung der Corestruktur wird die virale DNA im Zytoplasma freigesetzt (Broyles, 2003). Im Gegensatz zu der Transkription von early Genen, die ausschließlich unter Kontrolle viraler TF verläuft, ist die nachfolgende „intermediate“ und „late“ Gentranskription auf die Mithilfe zellulärer TF angewiesen (Broyles, 2003; Moss, 2001). Somit benötigt die poxvirale Expression früher Gene, im Unterschied zur Expression von intermediate und late Genen, weder die Replikation viraler DNA noch eine Virusproduktion.

3.2.3 Klinische Manifestation, Pathogenität und zoonotisches Potenzial

Das ORFV zeichnet sich durch einen sehr engen natürlichen Wirtsbereich aus, der Schaf und Ziege umfasst. Infektionen erfolgen über Läsionen der Haut die das Eindringen des Virus ermöglichen. Die Vermehrung des dermatropen Virus ist anschließend auf regenerative Keratinozyten begrenzt, wodurch eine kontagiöse Dermatitis (Ecthyma contagiosum) ausgelöst wird (Jenkinson, 1992; McKeever et al., 1988). Diese in der Regel mild verlaufende, selbstlimitierende Infektion manifestiert sich als lokal begrenzte Haut- bzw. Schleimhautläsion, wobei die durch die massive Infiltration polymorphkerniger Lymphozyten ausgelöste Pustelbildung hauptsächlich an Maul und Euter auftreten (Abdussalam and Cosslett, 1957). Die Läsion heilt nach ca. 4 – 6 Wochen ohne Narbenbildung ab (Robinson, Ellis, and Balassu, 1982). Ein

langanhaltender Immunschutz wird trotz der starken Immunantwort nicht ausgebildet, sodass eine Reinfektion bereits nach kurzer Zeit möglich ist, wenngleich klinische Symptome und Virusproduktion deutlich vermindert sind (Haig and Mercer, 1998; Mayr, 1990). Eine systemische Verbreitung oder Virämie wurde für ORFV nicht beobachtet; auch nicht nach experimenteller intravenöse Injektion hoher Dosen infektiöser Viren (*Hussain and Burger, 1989; Rziha, unpublished data*).

ORFV gilt als zoonotischer Erreger und ist in seltenen Fällen über die verletzte Haut auch auf den Menschen übertragbar (Mercer et al., 1997). Nach Infektion kommt es zu lokal begrenzten nodulären Schwellungen die sich zumeist auf Finger und Hände beschränken, sowie vereinzelt zu Schwellung der Lymphknoten und Fieber. Für gewöhnlich ist der Verlauf harmlos, frei von Komplikationen und heilt innerhalb 3-8 Wochen ohne klinische Nachwirkungen vollständig ab. Bei immunsupprimierten Personen wurden auch schwerere Infektionsverläufe beobachtet, die jedoch nach Behandlung mit Virostatika (Cidofovir oder Imiquimod) vollständig verheilten (Ara et al., 2008).

3.2.4 ORFV als immunstimulierender, apathogener Vektor

Das ORFV verfügt über eine Vielzahl an Eigenschaften, die es als Vektorvakzine interessant macht und auch gegenüber anderen Plattformtechnologien präferiert.

Im Vergleich zu Orthopockenviren zeichnet es sich durch einen sehr engen natürlichen Wirtstropismus aus, der Schaf und Ziege umfasst. Damit kann im Menschen eine durch natürliche Infektion verursachte, inhibierende „Prä-Immunität“ gegen den Vektor, wie sie bei den gängigsten viralen Vektoren Vaccinia- und Adenovirus beobachtet wird, nahezu ausgeschlossen werden (Brun et al., 2008; Rziha et al., 2000). Des Weiteren ermöglicht die außergewöhnlich schwache und kurzlebige ORFV-spezifische Vektorimmunität sehr effektive Booster- und/oder Auffrischimpfungen bzw. Immunisierungen mit ORFV-basierten Impfstoffen, die sich gegen weitere Erreger richten (Fischer et al., 2003).

Die Verabreichung von ORFV führt in permissiven, aber auch in nicht permissiven Wirten zu einer starken immunstimulierenden Reaktion, die sich durch eine ausgeprägte Induktion angeborener Immunmechanismen und der Freisetzung von Interferonen, Zytokinen und Chemokinen auszeichnet (Fachinger et al., 2000; Friebe et al., 2004; McGuire, Johnston, and Sykes, 2012; Schutze et al., 2010). Kurz nach der Immunisierung akkumulieren dendritische Zellen an der Injektionsstelle und leiten anschließend durch Aktivierung von T- und B-Zellen eine spezifische adaptive Immunantwort ein (Haig et al., 1996; Lear, 1996). Im Gegensatz zu Impfstoffen aus inaktivierten Viren oder Lebendvektoren, die meist eine humoral-lastige Immunantwort induzieren, ist die balancierte Induktion der zellulären und der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit rekombinanten ORFV ein entscheidender Vorteil (Fischer et al., 2003). Zugleich macht es den Einsatz von Adjuvantien, die zu unerwünschten Nebenwirkungen und Entzündungsreaktionen führen können, überflüssig. Als weitere Vorteile sind zudem die Möglichkeit der standardisierten Herstellung der rekombinanten Impfstoffe in permanenten Zelllinien ohne den Einsatz von Antibiotika, sowie der Verzicht auf eine Herstellung im Hühnerei (wachsende Anzahl an Eiweiß- und Antibiotika-Unverträglichkeiten) zu nennen.

3.2.5 Die Entwicklung des ORFV-Vektors D1701-V

Als Grundlage des Vektorstammes D1701-V diente der für den Veterinärbereich zugelassene, attenuierte ORFV Impfstoff D1701. Dieser in inaktivierter Form unter dem Handelsnamen Baypamun (Bayer), bzw. Zylexis (Pfizer) bekannte Impfstoff wurde ursprünglich durch Isolierung eines Wildtyp-Virus aus dem Schaf und anschließender Adaptierung infolge mehrfacher Passagierung in Rindernieren-Kulturzellen gewonnen (Mayr, 1981). Es folgte eine weitere Adaptierung in Vero-Zellen (african green monkey kidney cells), was durch den Verlust von 3 größeren Genbereichen gekennzeichnet ist (Büttner and Rziha, 2002) und eine weitere zusätzliche Attenuierung zur Folge hatte, sodass D1701-V selbst in immunsupprimierten Schafen nur asymptomatische Infektionen hervorruft (Rziha et al., 2000).

Für die Herstellung von rekombinanten ORFV wurde als Insertionsort der VEGF-Lokus gewählt. Dies bietet den Vorteil, dass durch die Eliminierung des unter der Kontrolle eines poxspezifischen early Promoters stehenden (Rziha et al., 1999) und als Virulenzfaktor geltenden vegf-e Gens (Savory et al., 2000; Wise et al., 1999) eine weitere Attenuierung des Vektors erfolgt. Um bei der Entwicklung neuer Rekombinanten die Selektion zwischen parentalem Ausgangsvirus und rekombinanter Nachkommenschaft zu vereinfachen, wurde das Blau-Weiß-Selektionssystem für das ORFV adaptiert. Dazu wurde das vegf-e Gen durch die LacZ-Genkassette aus *Escherichia coli* ersetzt (Rziha et al., 1999). Dieses als D1701-VrV bezeichnete ORFV wurde anschließend als Ausgangsvirus zur Generierung neuer Rekombinanten genutzt. Inzwischen wurden mehrere ORFV-basierte, rekombinante Impfstoffe hergestellt und die Wirksamkeit im Tiermodell untersucht. So konnten bereits mehrere rekombinante ORFV-Impfstoffe erfolgreich zum Schutz gegen unterschiedliche Infektionskrankheiten wie beispielsweise gegen Pseudorabies (Dory et al., 2006; Fischer et al., 2003; van Rooij et al., 2010), Tollwut (Amann et al., 2013), Borna'sche Erkrankung (Hausmann et al., 2005; Henkel et al., 2005), Influenza (Rohde, Amann, and Rziha, 2013) oder klassische Schweinepest (Voigt et al., 2007) eingesetzt werden.

3.3 Das Tollwutvirus und Tollwutimpfstoffe

Die Tollwut oder Rabies ist noch immer eine der am meist unterschätzten, zoonotischen Infektionskrankheiten und verursacht jährlich ca. 55.000 Todesfälle. Dabei treten 99 % aller Fälle in Entwicklungsländern in Afrika und Asien auf und werden zumeist über tollwütige Hunde oder Hundartige übertragen (Lembo et al., 2010). Der Auslöser der Tollwut ist das Tollwutvirus (auch Rabiesvirus (RV)), ein negativsträngiges ssRNA-Virus das zur Gattung der Lyssaviren (Familie: *Rhabdoviridae*) gehört (Schnell et al., 2010). Da das Virus im Speichel infizierter Tiere vorhanden ist, erfolgt die Virusübertragung in

der Regel durch den Biss eines infizierten Tieres. Nach der Infektion wandert das RV durch retrograden axonalen Transport in das zentrale Nervensystem des Wirts und löst dort eine schwere Enzephalitis aus, die ohne bestehende Immunität bzw. sofortige Postexpositionsprophylaxe in fast allen Fällen zum Tode führt (Dietzschold, Schnell, and Koprowski, 2005).

Das Hauptantigen ist das Glykoprotein (RabG) das auf der Oberfläche von RV bzw. RV-infizierter Zellen exprimiert wird und das Ziel virusneutralisierender Antikörper (VNA) darstellt (Cox, Dietzschold, and Schneider, 1977; Foley et al., 2000; Macfarlan, Dietzschold, and Koprowski, 1986; Wiktor et al., 1973). Der Schutz gegen Tollwut korreliert mit der Höhe des VNA-Titers, wobei ein Titer von 0.5 Internationalen Units (IU) pro ml Serum als protektiv anerkannt ist.

Anders als in Europa gilt in Entwicklungsländern nicht der Fuchs, sondern streunende Hunde als Hauptreservoir für Tollwut. Eine Massenvakzinierung der Wildtierreservoirs wird als wirkungsvollste Strategie zur Bekämpfung der Tollwut angesehen (Lembo et al., 2010). Hierzu wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Impfstoffe entwickelt. Dessen ungeachtet besteht noch immer ein dringender Bedarf an einem Tollwutimpfstoff, der idealerweise nachfolgende Eigenschaften erfüllt: (a.) Induktion eines Immunschutzes in allen relevanten Zieltieren, (b.) Wirksamkeit auch nach oraler Impfstoffgabe (Schluckimpfung z.B. durch Köder), (c.) Biologische Sicherheit und Unbedenklichkeit (d.) Induktion eines lang anhaltenden Impfschutzes nach einmaliger Immunisierung, (e.) Hohe Stabilität und einfache Handhabung der Vakzine und (f.) Geringe Impfstoffkosten.

Mangels verfügbarer Impfstoffe, die all diese Eigenschaften vereinen, konnten die verbleibenden Tollwutreservoirs noch immer nicht beseitigt werden. Der in Europa erfolgreich zur Ausrottung der Fuchstollwut eingesetzte avirulente Tollwutvirusstamm (Aubert et al., 1994) konnte bspw. in Hunden keine ausreichende Schutzwirkung induzieren (Rupprecht et al., 2005). Gleiches trifft auch für den ersten zugelassenen Pockenvirus-basierten Impfstoff, V-RG, zu (Kieny et al., 1984; Wiktor et al., 1984), der in Nordamerika erfolgreich zur Bekämpfung der Tollwut in Füchsen, Kojoten und Waschbären eingesetzt wurde (Rupprecht et al., 1986). Des Weiteren wurde V-RG mit

schwereren Hautentzündungen in Zusammenhang gebracht und auch die Möglichkeit systemischer V-RG-Pockeninfektionen beim Menschen befürchtet (Rupprecht et al., 2001). Dagegen zeigt der als sicher eingeschätzte, attenuierte und replikationsdefiziente Orthopockenvirus-Vektorstamm MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara) eine deutlich verminderte Immunogenität, kann jedoch keine Protektivität im Hund vermitteln (Ertl, 2009; Weyer et al., 2007).

Alternative Impfstoffe, die auf neuen Technologien wie z.B. „Reverse Genetics“ (Cenna et al., 2009; Faber et al., 2009; Wen et al., 2011; Zhao et al., 2010) oder DNA-Vektoren (Ullas, 2012) basieren geben Anlass zur Hoffnung. Am erfolgversprechendsten bleiben jedoch rekombinante virale Lebendvektoren auf der Basis von z.B. Newcastle Disease Virus (Ge et al., 2011), Sindbis Virus (Saxena et al., 2008), Herpesvirus (Yuan et al., 2008), Baculovirus (Prehaud et al., 1989), Adenovirus (Ertl, 2009) oder Pockenviren (Aspden et al., 2002; Esposito et al., 1988; Taylor et al., 1991; Taylor et al., 1988; Weyer, Rupprecht, and Nel, 2009) (Esposito; Taylor, 1991; Taylor, 1988; Aspden; Weyer, 2009), auch wenn ein endgültiger Durchbruch weiterhin auf sich warten lässt.

3.4 Das Influenza A Virus (IAV) und Impfstoffe gegen IAV

Influenza A Viren (IAV) gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie besitzen ein segmentiertes, negativsträngiges ssRNA-Genom das sich aus 8 RNA-Segmenten zusammensetzt, die die viralen Proteine kodieren (Palese, 2007; Wright PF, 2007). Das Virion besteht aus den zwei Oberflächenglykoproteinen, Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), welche die antigenen Determinanten der Virusoberfläche darstellen und eine hohe genetische Variabilität aufweisen. Daher werden sie für eine weiterführende Klassifizierung des Virus in die Subtypen H1-H17 und N1-N10 genutzt (Bouvier and Palese, 2008; Fouchier et al., 2005; Li et al., 2012; Tong et al., 2012). Hauptreservoir für IAV sind Vögel die alle Subtypen beherbergen können. Allerdings können auch weitere Spezies wie bspw. Hunde, Geflügel, Pferde, Schweine oder

Menschen infiziert werden (Tumpey and Belser, 2009). Menschen sind vor allem für die antigenen Subtypen H1-3 und N1-2 empfänglich (Wright PF, 2007). Jedoch sind weitere vereinzelte artenübergreifende Übertragungen, wie bspw. H5N1-Infektionen (Chan, 2002; Li et al., 2004) oder die derzeit in China endemischen H7N9- oder H10N8-Vogelgrippen (Koopmans and de Jong, 2013; Li et al., 2013; To et al., 2014) auf Menschen nicht selten.

Mehrere Millionen Menschen erkranken jedes Jahr an der saisonalen Influenza, einer Erkrankung des Respirationstrakts, die in der Regel selbstlimitierend verläuft, jedoch insbesondere bei Kindern, immunsupprimierten Personen und älteren Menschen einen schwereren Verlauf nehmen kann, dem jährlich ca. 250.000 – 500.000 Personen erliegen (WHO, 2009). Grundlage dieser jährlichen Epidemien ist vor allem der sogenannte „Antigenic drift“ der viralen Oberflächenproteine HA und NA. Dabei kommt es während der IAV-Replikation aufgrund der fehleranfälligen RNA-Polymerase ohne Proofreading-Mechanismus (Parvin et al., 1986) zu einer Anhäufung von Punktmutationen die aufgrund positiven Selektionsdrucks insbesondere das HA- und im geringeren Ausmaß das NA-Gen betreffen. Durch diese Änderungen werden präexistierende Immunitäten gegen IAV umgangen, sodass neue saisonale Influenzaepidemien die Folge sein können.

Die verheerenden Influenzapandemien (Kilbourne, 2006; Wright PF, 2007) des letzten Jahrhunderts wurden aber nicht durch Antigenic drift veränderte IA-Viren ausgelöst, sondern hatten ihren Ursprung in Viren die infolge des sogenannten Antigenic shift mutierten. Grundlage des Antigenic shifts ist eine Koinfektion mit zwei unterschiedlichen IAV-Subtypen, die eine Reassortierung von unterschiedlichen Gensegmenten ermöglicht und damit einhergehend zur Entstehung neuer Tochterviren (Subtypen) führt. Beispielsweise waren die im Jahr 2009 aufgetretene, durch H1N1 SOIV (Swine Origin Influenza Virus) ausgelöste „Schweinegrippe“ (Garten et al., 2009) oder die von 1918-1920 dauernde H1N1-assoziierte „Spanische Grippe“, der geschätzt 40 Millionen Menschen zum Opfer fielen (Gatherer, 2009; Taubenberger and Morens, 2006), Folgen eines solchen Antigenic shift Ereignisses.

Seit Ende des letzten Jahrtausends bereitete das verstärkte Auftreten von H5N1-Virusinfektionen in Menschen und der damit einhergehenden hohen Mortalitätsrate von bis zu 60 % große Sorgen (Peiris, de Jong, and Guan, 2007; WHO, 2014a). Das hochpathogene H5N1-Virus ist epidemisch in Vögeln und nutzt eine α 2,3-Acetylsialinsäure-Verknüpfung als Rezeptor zum HA-vermittelten Eintritt in die Wirtszelle. Menschen besitzen im oberen Respirationstrakt überwiegend den α 2,6-Acetylsialinsäurerezeptor (Kuiken et al., 2006), während α 2,3-Acetylsialinsäureverbindungen dagegen nur auf den Zellen des wenig infektionsanfälligen unteren Respirationstrakts vorkommen (Matrosovich et al., 2004; Skehel and Wiley, 2000; van Riel et al., 2006). Dadurch wird eine Infektion drastisch erschwert und die Übertragung von Mensch zu Mensch kann praktisch ausgeschlossen werden (Medina and Garcia-Sastre, 2011). Dennoch muss befürchtet werden, dass durch HA H5-Mutationen H5-Viren entstehen die an den α 2,6-Acetylsialinsäurerezeptoren binden können (Chandrasekaran et al., 2008; Gambaryan et al., 2006) und folglich ein enormes pandemisches Potenzial aufweisen würden.

HA ist ein entscheidender Faktor für Virulenz, Tropismus und IAV-Übertragung (Herfst et al., 2012; Imai et al., 2012; Russell et al., 2012; Srinivasan et al., 2008) und stellt das Hauptantigen für die humorale Immunantwort dar (Palese, 2007). Die eingesetzten inaktivierten Impfstoffe richten sich hauptsächlich gegen das HA sowie die NA von derzeit zirkulierenden Influenzaviren. Aufgrund der hohen Variabilität dieser Antigene und der Möglichkeit einer Immunevasion durch Antigenic drift muss die Impfstoffzusammensetzung jährlich neu überarbeitet und den zirkulierenden IAV-Stämmen angepasst werden. Ein kurzfristiger Schutz gegen völlig neue IAV-Stämme, wie während der H1N1-Schweinegrippepandemie 2009, kann nicht vermittelt werden. Ziel der Influenzavirusforschung ist daher die Entwicklung eines universellen Impfstoffs gegen unterschiedliche Influenzavirus-Subtypen und –Stämme (Chen, Ma, and Wong, 2011; Lambert and Fauci, 2010; Nabel and Fauci, 2010). Dabei werden mehrere verschiedene Ansätze verfolgt, die sich hauptsächlich auf die Optimierung des HA durch Verwendung von Konsensussequenzen (Chen, Ma, and Wong, 2011; Laddy et al., 2008; Xu et al., 2011), Kreierung chimärer HA (Hai et al., 2012; Pica and Palese, 2013) oder Spezifizierung auf bestimmte Epitope des HAs (Bommakanti et al., 2010)

fokussieren. Das Nukleoprotein (NP) ist im Gegensatz zu HA auch zwischen Influenzavirus-Subtypen hochkonserviert und wird als vielversprechendes Antigen für die zelluläre Immunantwort diskutiert (Swain et al., 2006; Teijaro et al., 2010; Ulmer et al., 1998) und könnte somit ein Bestandteil einer universellen Vakzine darstellen (Doherty et al., 2006; Heiny et al., 2007; Hillaire, Osterhaus, and Rimmelzwaan, 2011).

Ein Impfstoff, der sich aus HA und NP zusammensetzt, könnte demzufolge die Voraussetzungen erfüllen um sowohl eine humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort zu induzieren, und somit einen breiten Schutz gegen verschiedene Influenzavirusstämme und –Subtypen vermitteln.

4 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit kann in zwei Themenbereiche untergliedert werden.

Zum einen sollte der vorhandene ORFV-Vektor D1701-VrV genutzt werden, um weitere Impfstoffe herzustellen und deren Wirksamkeit im Tiermodell zu erproben. Im Vordergrund stand ein neuer ORFV-basierter Impfstoff gegen die Tollwut. Hierfür sollte das Hauptantigen des Tollwutvirus, das Rabies Glykoprotein stabil in das ORFV-Genom integriert und das rekombinante Virus über Plaquereinigungen homogen selektioniert werden. Die korrekte Insertion des RabG-Proteins sollte *in vitro* anhand molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden. Da der Schutz vor Tollwut hauptsächlich auf der Bildung virusneutralisierender Antikörper beruht, sollten Mäuse mit der neuen Vakzine immunisiert und die Induktion von VNA in deren Serum nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte der Einfluss verschiedener Applikationsrouten sowie Impfdosen ermittelt werden. Die Funktionalität der VNA sollte schließlich durch die Belastungsinfektion immunisierter Mäuse mit einem hochpathogenen RV sichergestellt werden. Weiter sollte untersucht werden, ob sich die Immunität durch Boosterimmunisierungen steigern lässt bzw. ob hierdurch eine Verlängerung der Dauer des Immunschutzes erreichen werden kann. Um die Beteiligung unterschiedlicher T-Zell-Populationen am Aufbau des impfstoffvermittelten Immunschutzes und an der Eliminierung des RV nach Infektion immunisierter Tiere zu ermitteln, sollten T-Zell-Depletionsversuche im Mausmodell durchgeführt werden. Letztlich sollte in Kooperation mit Pfizer Animal Health die Wirksamkeit des rekombinanten Impfstoffs in weiteren, relevanten Tiermodellen (Hund, Katze, Rind) erprobt und im Vergleich zu zugelassenen Tollwutvakzinen quantifiziert werden.

Der zweite Teilbereich der Dissertation sollte sich mit der Weiterentwicklung und Modifikation der ORFV-Vektoren D1701-V und D1701-VrV befassen. Zum einen sollte

die bisher genutzte Selektionsmethode verbessert werden. Da die bisher notwendige Blau-Weiß-Selektion rekombinanter ORFV arbeitsintensiv und zeitaufwendig ist sowie ein hohes technisches Knowhow und Expertise erfordert, sollten Möglichkeiten einer vereinfachten Selektion etabliert werden. Dadurch sollte der Arbeits- und Zeitaufwand reduziert und die Erfolgchancen der Generierung neuer ORFV-Rekombinanten gesteigert werden. Somit könnte ein nicht unbedeutender Nachteil des ORFV-Vektorsystems im Vergleich zu einigen anderen Impfstoff-Plattformtechnologien behoben werden.

Zum anderen sollte der Virusvektor für den Einsatz zur Herstellung polyvalenter Vakzine weiterentwickelt werden. Daher sollte untersucht werden, ob sich im ORFV-Genom neben dem VEGF-Lokus noch weitere Bereiche zur stabilen Insertion von Fremdgenen eignen. Zusätzlich sollte erprobt werden, ob und wie sich mehrere Fremdgene in einem Insertionsort des ORFV-Genoms exprimieren lassen. Dies erforderte die Konzeption und Testung neuer artifizierlicher früher ORFV-Promotoren. Insgesamt sollten die Arbeiten dazu dienen um die Variabilität und die Verwendungsmöglichkeiten des ORFV-Vektorsystems zu erweitern. So könnten bspw. Rekombinanten hergestellt werden, die mehrere Antigene desselben oder unterschiedlicher Krankheitserreger exprimieren oder durch die Kombination von Antigenen und immunstimulierenden Zytokinen die Immunantwort gezielt verbessern.

5 Erklärung zum Eigenanteil

Die in der Publikation „ **A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein**“ (Ralf Amann, Jörg Rohde, Ulrich Wulle, Douglas Conlee, Rudiger Raue, Olivier Martinon, and Hanns-Joachim Rziha, **2013**, Journal of Virology **87(3)**: 1618-30) veröffentlichte Rekombinante wurde von mir mit technischer Assistenz von Frau Berthilde Bauer hergestellt und die korrekte Insertion in das virale Genom über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Southern Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz-Analysen, Western Blot-Analysen und Immunperoxidase Monolayer-Assays, sowie die Kontrolle der Wachstumseigenschaften für die *in vitro* Charakterisierung der D1701-V-RabG-Rekombinante wurden von mir durchgeführt. Sämtliche Immunisierungen, T-Zell-Depletionen, Infektionen und Probeentnahmen der Tiere des Mausmodells wurden selbstständig konzipiert und ausgeführt. Die Ermittlung der virusneutralisierenden Serumantikörpertiter erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Ulrich Wulle, die Auswertung der Daten wurde von mir übernommen. Die Immunisierung der Katzen und Hunde wurde von Douglas Conlee, Olivier Martinon und Rudiger Raue (alle Pfizer Animal Health) koordiniert und erfolgte extern (Charles River Laboratories, Ireland). Auch die Bestimmungen der virusneutralisierenden Antikörpertiter der Hunde- und Katzenserum wurden extern in Auftrag gegeben (Biobest Laboratories Ltd., Edinburgh, United Kingdom). An der Versuchsplanung und der Diskussion der Ergebnisse wurde ich von Jörg Rohde und Hanns-Joachim Rziha unterstützt. Das Manuskript wurde in Zusammenarbeit mit Hanns-Joachim Rziha entworfen und verfasst. Die gesamte Arbeit wurde von Hanns-Joachim Rziha betreut.

Die in der Publikation „ **New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus**“ (Jörg Rohde, Ralf Amann, Hanns-Joachim Rziha, **2013**, PLoS One **8(12)**: e83802) vorgestellte HA-Rekombinante wurde von mir und Jörg Rohde konzipiert und konstruiert. Die Tests zur Untersuchung der HA-Expression *in vitro* (Immunfluoreszenz, Western Blot, Immunperoxidase Monolayer-Assay) wurden von mir in Zusammenarbeit mit Jörg Rohde etabliert. Sämtliche Immunisierungen, Belastungsinfektionen und Probeentnahmen wurden von Jörg Rohde durchgeführt. Die Überwachung des Gesundheitsstatus infizierter Tiere wurde von mir und Herrn Rohde vorgenommen.

Experimentelle Planung und Studiendesign wurden zusammen mit Jörg Rohde und Hanns-Joachim Rziha konzipiert und alle Daten gemeinsam ausgewertet sowie diskutiert. Das Manuskript wurde in Zusammenarbeit mit Hanns-Joachim Rziha und Jörg Rohde entworfen und von Jörg Rohde und Hanns-Joachim Rziha verfasst. Die gesamte Arbeit wurde von Hanns-Joachim Rziha betreut.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

6.1 Akzeptierte Publikationen: Ergebnisse und Diskussion

6.1.1 „ A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein“

Ralf Amann, Jörg Rohde, Ulrich Wulle, Douglas Conlee, Rudiger Raue, Olivier Martinon, and Hanns-Joachim Rziha, 2013, Journal of Virology 87(3): 1618-30

Obwohl Impfstoffe gegen Tollwut erhältlich sind, sterben jährlich noch immer ca. 55.000 Menschen aufgrund einer Tollwutvirusinfektion und weitere 15 Millionen müssen mit einer sogenannten Postexpositions Prophylaxe (PEP) nach einer Virusinfektion behandelt werden (WHO, 2013). Die Infektion wird in ca. 99 % aller Fälle durch den Biss eines tollwütigen Hundes übertragen (Lembo et al., 2010), sodass eine flächendeckende Immunisierung von streunenden Hunden als wirksamstes Mittel angesehen wird um die Tollwut zu kontrollieren (WHO, 2014b). Aufgrund des Fehlens eines Impfstoffes der auch in Hunden nach oraler Aufnahme (z.B. durch Auslegung von Ködern) einen Schutz gegen RV vermittelt, ist dieses Vorhaben bislang erfolglos. Virale Vektoren stellen eine vielversprechende Plattformtechnologie dar und könnten sich zur Herstellung verbesserter Tollwutimpfstoffe besonders eignen (Liniger, Zuniga, and Naim, 2007; Liu, 2010; Rollier et al., 2011). Das Potenzial des ORFV-Vektors zur Herstellung rekombinanter Vakzine konnte in vorangegangenen Arbeiten gegen unterschiedliche Infektionserreger mehrfach erfolgreich gezeigt werden (Dory et al., 2006; Fischer et al., 2003; Henkel et al., 2005; Rohde et al., 2011; van Rooij et al., 2010; Voigt et al., 2007). Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung eines ORFV-basierten Impfstoffes der das Rabiesvirus Glykoprotein (RabG) exprimiert, welches als Hauptantigen des RV bekannt ist (Cox, Dietzschold, and Schneider, 1977; Foley et al., 2000; Macfarlan, Dietzschold, and Koprowski, 1986; Wiktor et al., 1973). Anschließend

sollte die neue Rekombinante D1701-V-RabG in Tierversuchen *in vivo* hinsichtlich der Induktion einer protektiven Immunantwort untersucht werden.

Die RabG-Gensequenz des RV-Stammes PV11 (Acc. No. AF233275), welche eine 97-98 % Sequenzhomologie mit anderen RV-Stämmen aufweist, wurde von der Firma Blue Heron Biotech chemisch synthetisiert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in das Plasmid pdV-Rec1 kloniert. Das neu entstandene Transferplasmid pdV-RabG wurde sequenziert und die korrekte Insertion des RabG-Gens in den Vektor bestätigt. Anschließend wurden mit der LacZ-exprimierenden ORFV-Rekombinante D1701-VrV infizierte Vero-Zellen mit dem Transferplasmid pdV-RabG transfiziert, wodurch die Integration des RabG-Gens anstelle des LacZ-Gens mittels homologer Rekombination möglich war. Rekombinante, RabG-exprimierende Viren (D1701-V-RabG) wurden anschließend über die herkömmliche Blau-Weiß-Selektion identifiziert und über Virusplaque-Reinigungen isoliert. Der Nachweis der korrekten Integration des RabG-Gens im Austausch mit dem LacZ-Gen in den VEGF-Lokus konnte über Southern Blot-Hybridisierung und spezifische PCR-Analysen nachgewiesen werden. Nach viermaliger Einzelplaque-Reinigung konnte schließlich die genetische Homogenität RabG-positiver und LacZ-negativer ORFV-Rekombinanten sichergestellt werden. Anschließend wurde das Virus in Vero-Zellen vermehrt und mittels Ultrazentrifugation zu hohen Virustitern angereichert.

Die Expression des RabG in D1701-V-RabG infizierten Zellen wurde *in vitro* durch Northern und Western Blot-Analysen, immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das RabG bereits vier Stunden nach Infektion in korrekter Größe (62kDa) exprimiert und an der Oberfläche der Wirtszelle unter Ausbildung der für RabG-typischen „Spikes“ präsentiert wird. Durch Behandlung der Zellen mit Cytosinarabinosid (AraC), das die ORFV-Replikation inhibiert, konnte bestätigt werden, dass RabG unter Kontrolle des frühen vegf-e Promoters P_{vegf} ORFV-Replikationsunabhängig exprimiert wird (Fischer et al., 2003; Henkel et al., 2005; Rohde et al., 2011; Voigt et al., 2007). Insbesondere hinsichtlich bestehender Sicherheitserfordernisse, sowie einer Anwendung in für das ORFV nichtpermissiven Wirten stellt dies eines der wichtigsten Vorzüge des ORFV-

Vektorsystems dar. Die Integration des RabG-Gens in das ORFV-Genom zeigte im Vergleich zu der LacZ-exprimierenden parentalen Ausgangsvariante keine Veränderung der Wachstumseigenschaften, der Plaquemorphologie oder der produzierten Virusmenge.

Nachdem die korrekte, virusreplikationsunabhängige, starke und frühe Expression des RabG *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde die Eignung von D1701-V-RabG in der Maus, einem für ORFV nichtpermissiven Tiermodell evaluiert. Zuerst konnte in einem Vorversuch ein D1701-V-RabG-vermittelter Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit einer ungewöhnlich hohen Dosis des hochvirulenten RV-Stamm CVS-11 gezeigt werden. In einem nachfolgenden Experiment wurde überprüft, ob eine Impfdosis gefunden werden kann, die bereits nach einmaliger intramuskulärer (i.m.) Verabreichung einen vollständigen Schutz gegen eine RV-Infektion vermittelt. Gleichzeitig wurde die Anwesenheit von RV-neutralisierenden Antikörpern in Seren der immunisierten Tiere quantitativ bestimmt. Tiergruppen wurden mit unterschiedlichen Dosen (10^4 - 10^7 PFU) immunisiert, der Antikörpertiter 10 Tage später bestimmt und die Mäuse an Tag 17 mit einer 1000-fachen LD₅₀ des RV CVS-11 intrazerebral infiziert. Wie auch für andere Vektoren gezeigt (Ge et al., 2011; Li et al., 2006; Taylor et al., 1991; Weyer et al., 2007) korrelierte sowohl der induzierten VNA-Titer, als auch die vermittelte Schutzrate mit der Impfdosis. Alle mit 10^7 PFU immunisierten Tiere waren komplett geschützt, während in der Gruppe, die mit 10^5 PFU immunisiert wurde immerhin noch 58 % der Tiere die Belastungsinfektion überlebten.

In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob durch Mehrfachimmunisierungen eine Erhöhung der VNA-Titer und des Schutzes erreicht werden kann. Tiergruppen wurde im Abstand von 14 Tagen dreimal mit 10^4 - 10^7 PFU immunisiert. Den Tieren wurde wöchentlich Blut entnommen und der Verlauf der VNA-Titer bestimmt. Die D1701-V-RabG-induzierte Immunität wurde auch mit Tieren verglichen, die mit den kommerziell erwerblichen RV-basierten Totimpfstoffen Rabipur® (Novartis) und Nobivac® (Intervet) immunisiert worden waren.

Nach der Prime-Immunsierung induzierte die Nobivac-Gruppe den höchsten VNA-Titer, dieser konnte durch Boosterimmunisierungen im Gegensatz zu den anderen Gruppen

jedoch nicht weiter gesteigert werden. So zeigten nach der dritten Impfung die Tiere, die mit mindestens 10^6 PFU des rekombinanten ORFV immunisiert wurden die höchsten VNA-Titer, die Nobivac- und Rabipur-immunisierten Tiere induzierten dagegen niedrigere VNA-Titer, die in etwa mit denen von 10^5 ORFV- bzw. 10^4 ORFV-immunisierter Tiere vergleichbar waren. Nach abschließender RV-Infektion zeigte sich, dass im Gegensatz zu Nobivac bzw. Rabipur-immunisierten Mäusen, alle Tiere die eine Dosis von mindestens 10^6 PFU D1701-V-RabG verabreicht bekommen hatten, die Belastungsinfektion überlebten. Die Tatsache, dass nach Immunisierung mit Rabipur nur 14 % der Mäuse überlebten, steht im Gegensatz zu anderen Publikationen in denen ein vollständiger Schutz bereits nach einmaliger Immunisierung gezeigt werden konnte (Saxena et al., 2008). Grund hierfür ist wahrscheinlich die zur Belastungsinfektion eingesetzte hohe RV-Dosis des CVS-11 Stamms sowie die intrazerebrale Infektionsroute; dementsprechend erscheint der ORFV-induzierten Schutz umso beachtlicher.

Eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale von Impfstoffen ist die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis und damit einhergehend langanhaltenden Schutz aufzubauen. Henkel et al. konnten diese Eigenschaft bereits im Rattenmodell für einen ORFV-basierten Impfstoff gegen die Borna'sche Krankheit nachweisen (Henkel et al., 2005). Um zu untersuchen, ob sich dieses wichtige Kriterium auch mit der RabG-Rekombinante bestätigen lässt, wurden Mäuse mit unterschiedlichen Dosen D1701-V-RabG (10^5 - 10^7 PFU) einmal, zweimal oder dreimal im Abstand von 3 Wochen immunisiert und der VNA-Titer über einen Zeitraum von 40 Wochen beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich in allen Tiergruppen der VNA-Titer durch Mehrfachimmunisierungen deutlich erhöhen ließ. Dies lässt sich damit erklären, dass natürliche ORFV-Infektionen durch das Fehlen von ORFV-neutralisierenden Antikörpern und eine generelle kurzlebige ORFV-Vektorimmunität (Büttner and Rziha, 2002; Haig, 2006) gekennzeichnet sind. Außerdem stellt die Maus einen Wirt dar, in welchem sich ORFV nicht vermehrt (nicht-permissiv). Gerade im Vergleich zu anderen pox- oder adenoviralen Vektoren, die aufgrund von induzierten und/oder vorbestehenden Vektorimmunitäten nach Boosterimmunisierungen oftmals keine oder nur schwache Effekte aufweisen (Kanasa-thasan et al., 2000; Kundig et al., 1993; Lodmell and Ewalt,

2000; McCoy et al., 2007; Sharpe et al., 2001; Weyer, Rupprecht, and Nel, 2009), stellt die Möglichkeit zur wiederholten Immunisierung einen wichtigen Vorteil des ORFV-Vektorsystems dar. Belastungsinfektionen 43 Wochen nach der Erstimmunisierung zeigten, dass ein funktionales immunologisches Gedächtnis gebildet und langanhaltender Schutz vermittelt wurde, was sowohl von der Dosis, als auch von der Anzahl der Immunisierungen abhing. Alle Tiere die dreimal mit mindestens 10^6 PFU oder zweimal mit 10^7 PFU immunisiert wurden, waren vollständig gegen die Belastungsinfektion geschützt.

Wie einleitend beschrieben, ist eines der größten Hindernisse bei der Bekämpfung der Hundetollwut das Fehlen eines effektiven Schluckimpfstoffs. Daher sollte untersucht werden, ob neben der intramuskulären, auch weitere Applikationsrouten geeignet sind um nach D1701-V-RabG-Immunisierung eine protektive Immunantwort zu induzieren. Mäuse wurden dreimal mit 10^7 PFU auf sieben unterschiedlichen Wegen immunisiert (i.m., intravenös (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intranasal (i.n.), oral, intradermal (i.d.), subcutan (s.c.)) und der VNA-Titerverlauf wöchentlich kontrolliert. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Applikationswege eine Immunantwort induzieren, wobei sich Verlauf und Höhe der VNA-Titer jedoch teilweise erheblich unterschieden. Beispielsweise wurde nach i.m., i.v. oder i.p. Verabreichung bereits nach einmaliger Immunisierung ein VNA-Titer von über 100 IU erreicht, wohingegen i.n. oder oral immunisierte Tiere hierfür mindestens eine Boosterimmunisierung benötigten. S.c oder i.d. immunisierte Tiere zeigten die geringsten VNA-Titer und den schlechtesten Schutz gegenüber einer Belastungsinfektion. Dagegen konnte mit allen anderen Immunisierungsrouten eine Schutzrate von mindestens 70 % erreicht werden während alle i.n. immunisierte Tiere vollständig geschützt waren, was auf eine sehr effektive D1701-V-RabG-vermittelte Immuninduktion über die Schleimhäute hinweist (Gherardi and Esteban, 2005). Dafür sprechen auch die guten Ergebnisse nach oraler Impfstoffgabe, insbesondere im Vergleich zu anderen, in der Literatur beschriebenen, RabG-exprimierenden Vektoren (Li et al., 2006; Weyer et al., 2007). Einschränkend muss gesagt werden, dass sich das Mausmodell für diese Fragestellung nur bedingt eignet und folglich das Potenzial der ORFV-Rekombinanten zur oralen Immunisierung umso vielversprechender erscheint.

Die Beteiligung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen am Aufbau der Immunität nach D1701-V-RabG-Immunsierung sowie an der Bekämpfung einer RV-Infektion immunisierter Tiere wurde eingehender untersucht. Zu unterschiedlichen Phasen wurden CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen durch die Gabe CD4- bzw. CD8-neutralisierender Antikörper temporär eliminiert. Die Ergebnisse zeigten, dass zum Aufbau eines funktionalen immunologischen Gedächtnisses die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen enorm wichtig ist. Ein Fehlen dieser Zellen führt zu einem deutlich verringerten Immunschutz gegen eine spätere Belastungsinfektion. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Befunde zur Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen bei der Errichtung einer RV-spezifischen Immunität (Dietzschold et al., 1987; Perry and Lodmell, 1991). Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Tatsache, dass CD4⁺ T-Zellen bei der Stimulierung und Reifung von B-Zellen eine entscheidende Rolle spielen, ihr Fehlen die Antikörperproduktion verringert (Swain, McKinstry, and Strutt, 2012; Whitmire, 2011) und Tollwut generell als T_H2-„responsive disease“ angesehen wird (Moore et al., 2006). Dagegen spielten CD4⁺ T-Zellen in Tieren mit einem bereits vorhandenen D1701-V-RabG-vermittelten Immunschutz bei der Bekämpfung einer RV-Infektion nur eine nebensächliche Rolle, was durch Beobachtungen von Perry und Lodmell unterstützt wird (Perry and Lodmell, 1991). CD8⁺ T-Zellen schienen bei der Induktion der D1701-V-RabG-vermittelten Immunität nur eine untergeordnete, bei der Immunantwort D1701-V-RabG-immunisierter Tiere gegen eine RV-Infektion praktisch keine Rolle zu spielen. Dies überrascht nicht, da der Schutz gegen Tollwut hauptsächlich VNA-vermittelt ist. Um die Bedeutung von B-Zellen und der damit verbundenen humoralen Immunantwort bei einer RV-Infektion zu untersuchen, wurden B-Zell-defiziente μ MT-Mäuse dreimal mit der Rekombinante immunisiert und anschließend mit RV infiziert. Es zeigte sich, dass μ MT-Mäuse nicht gegen Tollwut geschützt waren und der Krankheitsverlauf dem nicht-immunisierter Mäuse glich. Dies lässt darauf schließen, dass B-Zellen für einen D1701-V-RabG-vermittelten Schutz gegen Tollwut zwingend erforderlich sind.

Um sicherzustellen, dass die neu entwickelte Rekombinante auch in relevanten Zieltieren eine protektive Immunantwort gegen RV induzieren kann, wurden Hunde und Katzen mit D1701-V-RabG immunisiert und über einen Zeitraum von 7 Wochen die

VNA-Titer ermittelt. Im Gegensatz zu Mäusen ist bei Hunden und Katzen ein VNA-Titer von 0,5 IU/ml ein zuverlässiges Indiz für einen Schutz gegen Tollwut.

Die Katzen wurden mit unterschiedlichen Dosen D1701-V-RabG einmalig s.c. geimpft. Als Vergleich wurden Tiere mit dem zugelassenen, Canarypox-basierten Lebendimpfstoff PureVax® Feline Rabies (Merial) immunisiert. Tiere, die die höchste Dosis rekombinantes ORFV verabreicht bekommen hatten serokonvertierten am schnellsten und entwickelten fast doppelt so hohe VNA-Titer, wie Katzen die mit PureVax , bzw. mit der zweithöchsten Dosis D1701-V-RabG immunisiert wurden. Auch nach Verabreichung sehr geringer D1701-V-RabG-Dosen konnte in allen Katzen (mit einer Ausnahme) eine Serokonversion nachgewiesen werden.

Die Hunde wurden in einem Abstand von 4 Wochen zweimal entweder i.m. oder s.c. immunisiert. Alle immunisierten Hunde serokonvertierten innerhalb einer Woche und beide Applikationsrouten induzierten sehr hohe VNA-Titer (bis zu 100 IU/ml). Wie schon bei der Immunisierung von Mäusen gezeigt, war auch hier die i.m. Immunisierung der ORFV-Rekombinanten einer s.c. Verabreichung überlegen. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Tollwutimpfstoffe (Aubert et al., 1994). Die Zweitimmunisierung führte zu einem starken Boostereffekt und deutlich erhöhte VNA-Titer. Dies spricht dafür, dass nur eine schwache ORFV-Vektorspezifische Immunität induziert wird, was im Vergleich zu anderen rekombinanten Tollwutimpfstoffen (Hu et al., 2006) einen wichtigen Vorteil darstellt.

Zusammenfassend konnten anhand der gewonnenen Ergebnisse gezeigt werden, dass sich der hergestellte Impfstoff D1710-V-RabG exzellent dazu eignet, eine starke Immunantwort und lang anhaltenden Schutz gegen RV in unterschiedlichen Spezies zu induzieren. Die Möglichkeit das Immunsystem nach D1701-V-RabG-Immunisierung über unterschiedliche Routen, insbesondere nach intranasaler und oraler Applikation, effektiv stimulieren zu können, sowie die sehr gute Immunantwort in Hunden und Katzen schaffen die Grundvoraussetzung die noch bestehenden Hürden bei der Bekämpfung von Tollwut zu überwinden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass alle Tiere eine sehr gute ORFV-Verträglichkeit und keinerlei Nebenwirkungen aufwiesen.

Neben den in der Publikation gezeigten Daten wurden noch weitere Versuche mit der RabG-exprimierenden Rekombinante durchgeführt von denen die wichtigsten Erkenntnisse noch kurz erwähnt werden sollen.

Zum einen wurde eine vergleichende Immunisierung mit D1701-V-RabG und IMRAB® (Merial), einem auch für den Menschen zugelassenen mit einem Adjuvants versetzten Totimpfstoff, in Rindern durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass D1701-V-RabG- im Vergleich zu IMRAB-immunisierten Tiere einen ca. 25-mal höheren VNA-Titer entwickelten, welcher sich durch weitere Immunisierungen weiter erhöhen ließ. Zum anderen konnte in einem PEP-Modell die Eignung der Rekombinante zur therapeutischen Anwendung in RV-infizierten Tieren nachgewiesen werden. So konnten bis zu 90 % der infizierten Tiere durch eine sich anschließende D1701-V-RabG-Behandlung geheilt werden. Aufgrund der Vielzahl positiver Eigenschaften der RabG-Rekombinante wurde eine Patentanmeldung eingereicht (Pat.Nr.: WO2011145013) und von der Zoetis (ehemals Pfizer Animal Health) eine Zulassung für den Veterinärmarkt angestrebt.

6.1.2 „ New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus“

Jörg Rohde, Ralf Amann, Hanns-Joachim Rziha, 2013, PLoS One 8(12): e83802

Influenza A Virus-Epidemien infizieren jährlich zwischen 10-20 % der Weltbevölkerung und führen zu ca. 300.000 Todesfälle. Aktuell zugelassene Impfstoffe schützen gegen Influenza, richten sich aber hauptsächlich gegen das HA, welches das Hauptantigen von IAV darstellt. Aufgrund des Antigenic drifts der Influenzaviren verändert sich das HA jedoch kontinuierlich und es kommt zu sogenannten Escapevarianten, die sich einem bestehenden Immunschutz entziehen. Um die Effektivität der Impfstoffe zu gewährleisten, ist daher eine jährliche Anpassung an das HA saisonal zirkulierender IAV-Stämme erforderlich. Zudem schützen die gegenwärtigen Impfstoffe nicht oder nicht ausreichend gegen plötzlich auftretende Pandemien, wie bspw. 2009 bei der sogenannten Schweinegrippe zu sehen war. Aus diesem Grund steht die Entwicklung universeller Influenzaimpfstoffe, die auch gegen unterschiedliche IAV-Stämme Schutz bieten, im Fokus der Impfstoffforschung.

Die exzellenten immunstimulierenden und schutzvermittelnden Eigenschaften des ORFV-Vektor D1701-V konnte bereits mehrfach anhand unterschiedlicher Impfstoffe gezeigt werden (Amann et al., 2013; Dory et al., 2006; Fischer et al., 2003; Henkel et al., 2005; Rohde et al., 2011; van Rooij et al., 2010; Voigt et al., 2007). Die vorgestellte Publikation beschreibt die erfolgreiche Herstellung von ORFV-Rekombinanten, die das HA- bzw. das NP-Gen hochpathogener H5N1-IAV exprimieren. Nachdem die korrekte Expression des Fremdgens *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollten die immunstimulierenden Fähigkeiten und die protektive Wirksamkeit der neuen rekombinanten Vakzine gegen unterschiedliche IAV-Stämme (Cross-Clades) und Subtypen im Mausmodell untersucht werden.

Das HA-Gen (Acc. No. AY818135, (Mayrhofer et al., 2009)) und das NP-Gen (Acc. No. DQ792924) wurden in Auftrag synthetisiert (Gene Art) und in das pdV-Rec1 Transferplasmid kloniert. Anschließend wurden Vero-Zellen nach Infektion mit D1701-VrV (enthält eine LacZ-Kassette) mit den HA- bzw. NP-enthaltenden Transferplasmiden transfiziert und neu generierte rekombinante ORFV durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert und die durch Plaquereinigungen erhaltenen homogenen, weißen Rekombinanten D1701-V-NPh5 und D1701-V-HA5n angezogen. Die korrekte Integration der Fremdgene in den VEGF-Lokus des viralen Genoms wurde über PCR-Analysen und Southern Blot-Hybridisierung überprüft, die Proteinexpression des HA oder NP mittels IPMA, Western Blot, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl das NP als auch das HA analog wie nach einer natürlichen IAV-Infektion exprimiert wurden. So wurde das NP hauptsächlich im Zellkern, das HA dagegen überwiegend an der Zelloberfläche exprimiert. Im Western Blot konnten neben dem 56 kDa großen NP-Protein auch das 80 kDa große Hämagglutinin-Vorläuferprotein HA0 sowie das daraus folgende 55 kDa große Spaltprodukt HA1 nachgewiesen und deren korrekte Größen bestätigt werden. Aufgrund der *vegf-e* Promoterkontrolle der beiden Fremdgene erfolgte erwartungsgemäß deren Expression früh nach Infektion. *In vitro* Wachstumskurven zeigten, dass die Insertion des HA bzw. NP-Gens keinen Einfluss auf die Wachstumseigenschaften der neuen Rekombinanten im Vergleich zum parentalen Ausgangsvirus D1701-V hatte.

Die protektive Wirksamkeit der neuen Rekombinanten wurde *in vivo* im Mausmodell untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die NP-exprimierende ORFV-Rekombinante auch nach mehrmaliger Gabe hoher Impfdosen keinen ausreichenden Schutz gegen eine nachfolgende IAV-Infektion vermittelte und alle Mäuse erkrankten. Dies überrascht, da in der Literatur das NP als Zielantigen für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen beschrieben ist (LaMere et al., 2011; Rimmelzwaan et al., 2009; Ulmer et al., 1998) und zudem NP-spezifische Antikörper nachgewiesen wurden (LaMere et al., 2011). Daher bleibt zu klären, ob das Ausbleiben einer protektiven Immunität der ungenügenden Stimulation von Effektor-T-Zellen und/oder dem Fehlen NP-spezifischer Antikörper geschuldet ist. Auch könnte durch die Verwendung eines weniger virulenten IAV-Stamms für die

Belastungsinfektion oder einer geringeren Virusdosis evaluiert werden, ob durch die ORFV-Rekombinante zumindest ein partieller Schutz gegen AIV induziert werden könnte.

Die Immunisierung mit D1701-V-HAh5n vermittelte dagegen eine starke Immunantwort und guten Schutz. Zwar konnte eine einmalige i.m. Immunisierung in C57BL/6-Mäusen nur partiell gegen eine Infektion mit dem hochpathogenen H5N1-Stamm MB1 schützen, die meisten Mäuse erkrankten und verloren an Gewicht, jedoch erholten sich die Tiere vollständig, die mit 10^7 PFU die höchste Impfdosis erhalten hatten und erlangten ihr ursprüngliches Ausgangsgewicht zurück. Von den Tieren die mindestens 10^6 PFU der ORFV-Rekombinanten erhalten hatten, verloren ca. die Hälfte der Mäuse mehr als 25 % ihres Ausgangsgewichts und mussten aufgrund der Tierschutzbestimmungen eingeschläfert werden. Eine zweite Immunisierung wirkte sich hingegen positiv auf die Protektion gegen die IAV-Infektion aus. So überlebten, ausgenommen einer Maus (10^5 PFU), alle zweifach-immunisierten Tiere den Challenge. Auch waren die Krankheitsverläufe weniger schwer und die Mäuse verloren weniger Gewicht. Tiere die zweimal mit 10^7 PFU immunisiert wurden, waren vollständig gegen das Virus geschützt und blieben frei von jeglichen Krankheitssymptomen. Um einen unspezifischen Immuneffekt durch das Vektorvirus ausschließen zu können, wurden Mäuse einer Kontrollgruppe zweimal mit dem parentalen ORFV D1701-VrV immunisiert. Die Tiere waren erwartungsgemäß nicht geschützt und entwickelten einen nahezu identischen Krankheitsverlauf wie nicht-immunisierte Mäuse, sodass davon auszugehen ist, dass nach Verabreichung von D1701-V-HAh5n ein HA-spezifischer Schutz induziert wurde.

HA-spezifische Serumantikörper gelten als entscheidend für die Neutralisation von Influenzaviren und ein HI-(Hämagglutination-Inhibitions) Titer von mindestens 1:40 wird als protektiv angesehen (Bodewes, Osterhaus, and Rimmelzwaan, 2010). Deshalb wurden nach Immunisierung der Mäuse mit D1701-V-HAh5n die Titer HI-spezifischer Serumantikörper im HI-Test bestimmt. Nach einmaliger Immunisierung konnte nur in einer von zehn Mäusen eine Serokonversion festgestellt werden. Eine zweite Vakzinierung führte bei allen Mäusen die mit mindestens 10^6 PFU D1701-V-HAh5n immunisiert wurden, zu einer Serokonversion und einem durchschnittlichem HI-Titer von

1:144. Dagegen blieben Mäuse, die nur 10^5 PFU der Rekombinanten erhielten, HI-seronegativ. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch Mäuse die keinen oder nur einen sehr geringen HI-Titer aufwiesen, vor der Belastungsinfektion geschützt waren, was auf eine HA- induzierte Beteiligung zellulärer Immunmechanismen deuten könnte (Guo et al., 2011; Laidlaw et al., 2013; Stittelaar et al., 2010) und auch nach Applikation anderer poxvirusbasierter HA-Rekombinanten berichtet wurde (Hessel et al., 2011; Mayrhofer et al., 2009).

Die HAh5n-Rekombinante wurde auch in BALB/c-Mäusen, welche ca. 30-mal empfänglicher für das MB1-Challengevirus als C57BL/6-Mäuse sind, getestet. Auch in diesem Mausstamm konnte die volle schützende Wirkung nach zweimaliger Immunisierung mit mindestens 10^6 PFU der ORFV-Rekombinante bestätigt werden. Die Belastungsinfektion führte bei keiner der immunisierten Mäuse zu einer Erkrankung oder Gewichtsverlust. Dies ist sehr beachtlich, da im Vergleich zu dem MB1-Challengevirus (Clade 2.2.1), das ORFV-exprimierte HA von einer unterschiedlichen genetischen Variante (Clade 1) des H5N1-Virus abstammt. In einem weiteren Versuch sollte daher ermittelt werden, ob D1701-V-HAh5n-Immunisierung auch gegenüber anderen H5N1-Stämmen Schutz vermittelte. Mäuse wurden ein- oder zweimal mit 10^7 PFU der Rekombinante immunisiert und mit der SN1-Variante (Clade 2.2.3) infiziert. Da, von einer Ausnahme abgesehen, alle Mäuse die Belastungsinfektion ohne Anzeichen von Krankheitssymptomen oder Gewichtsverlust überlebten, konnte der sogenannte „Cross-clade“-Schutz nach D1701-V-HAh5n-Vakzinierung bestätigt werden. Ein solcher Schutz gegen mehrere H5N1-Varianten wurde zuvor für eine andere poxvirusbasierte Rekombinante, die das HA eines H5N1 AIV exprimiert, beschrieben (Hessel et al., 2011; Swain et al., 2006).

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob neben der Induktion einer protektiven Immunität gegen „Cross-Clade“-Infektionen auch vor Infektionen mit heterologen Influenzavirusstämmen geschützt werden konnte. BALB/c- und C57BL/6-Mäuse wurden ein- bzw. zweimal mit 10^7 PFU D1701-V-HAh5n immunisiert und anschließend mit dem H1N1 AIV-Stamm PR8 infiziert. Während eine einmalige Vakzinierung nicht ausreichte um eine protektive Immunantwort zu induzieren, waren

nach zweimaliger Immunisierung die meisten Mäuse partiell geschützt. Die Belastungsinfektion führte zwar bei fast allen Mäusen zu einer Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen und Gewichtsverlust, jedoch erholten sich alle PR8-infizierten BALB/c- und 80 % der C57BL/6-Mäuse vollständig. Bedenkt man, dass die HA Aminosäurehomologie des H1N1-Influenzavirusstamms zu dem von D1701-V-HAh5n-exprimierten HA nur 66 % beträgt, so scheint die HAh5n-exprimierende Rekombinante ein vielversprechender Kandidat für eine universellere Vakzine.

Um den Einfluss von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf die D1701-V-HAh5n-vermittelte protektive Immunität zu untersuchen, wurden die beiden T-Zellsubpopulationen durch die Gabe CD4- bzw. CD8-neutralisierender Antikörper temporär depletiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei Tieren, mit bereits vorhandenem D1701-V-HAh5n-vermitteltem Immunschutz, das Fehlen beider T-Zell-Subpopulationen während der Belastungsinfektion keinen messbaren Einfluss auf den Schutz hatte. Dies ist vermutlich auf das Vorhandensein HA-spezifischer Antikörper zurückzuführen, die nach der Immunisierung gebildet wurden und auf die die T-Zelldepletion keinen Effekt mehr hatte. Bemerkenswert ist, dass auch während der Immunisierung eine Abwesenheit von T-Zellen nur wenig Einfluss auf die induzierte Immunität zu haben schien. Zwar führte die Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen während der Immunisierung dazu, dass die Mäuse nach Belastungsinfektion zeitweise erkrankten, jedoch erholten sich fast alle Tiere wieder. Aufgrund der wichtigen Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei der B-Zell-Aktivierung, war dies eher nicht zu erwarten (Swain et al., 2006; Swain, McKinstry, and Strutt, 2012).

Zusammenfassend konnte in dieser Veröffentlichung gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit der ORFV-basierten Rekombinante D1701-V-HAh5n ein Schutz gegen unterschiedliche H5N1-Stämme und gegen weitere Influenzavirusstypen induziert werden kann. Hinsichtlich der Notwendigkeit neue, universelle Influenzavirusimpfstoffe zu entwickeln, die gegen divergente IAV-Stämme und Pandemien schützen, könnten HA-exprimierende ORFV-Rekombinanten eine attraktive Alternative darstellen. Dagegen konnte mit der NP-exprimierenden Rekombinante D1701-V-NPh5 kein ausreichender Schutz vermittelt werden. Um zu untersuchen, ob

dies an dem ausgewählten NP-Antigen oder grundsätzlich an der Kombination von ORFV und NP liegt, sind weitere Experimente notwendig.

6.2 Zur Veröffentlichung vorbereitete Ergebnisteile

6.2.1 Herstellung eines polyvalenten ORFV-Vektors - Einleitung, Ergebnisse und Diskussion

Einleitung

Bei den bisher entwickelten rekombinanten ORFV handelte es sich um monovalente Vektoren, die nur ein Fremdgen exprimieren. Polyvalente Impfstoffe jedoch bieten mehrere entscheidende Vorteile gegenüber monovalenten Impfstoffen. Beispielsweise ist das Pathogen durch die Verwendung eines polyvalenten Impfstoffes gegen mehrere Antigene für das Immunsystem eindeutiger charakterisiert und kann dementsprechend besser erkannt und bekämpft werden (Earl et al., 2009; Xu et al., 2011). Zusätzlich wird dem Erreger somit die Immunevasion durch Mutationen der Antigene erschwert. Auch lassen sich Impfstoffe gegen mehrere Krankheitserreger (ähnlich zu Kombiimpfstoffen) (Monath et al., 1999; Wang et al., 2014), oder gegen verschiedene Subtypen eines Erregers (Universale Vakzine) herstellen. Schließlich ermöglicht die Option der gleichzeitigen Integration von Antigen und z.B. Zytokinen eine gezielte Modulation der Immunantwort (Lai et al., 2011; Poon et al., 2009).

Die einfachste Möglichkeit für die Herstellung polyvalenter Vektoren ist die Expression mehrerer fusionierter Fremdgene in einem Insertionsort, die unter Kontrolle eines einzigen Promoters stehen und nur durch eine kurze Abfolge an Basen (sog. Spacer) voneinander getrennt sind. (Berthoud et al., 2011; Garcia-Arriaza et al., 2014; Gomez et al., 2013; Lillie et al., 2012). Der Vorteil hierbei ist, dass die gewünschten Fremdgene in einem Herstellungsschritt in den Zielort des Vektors integriert werden können. Jedoch ist diese Methode auch mit zwei bedeutende Nachteilen verbunden: Zum einen lassen sich die einzelnen Gene nicht separat steuern, sodass die Expressionsstärke mit zunehmender Entfernung vom Promoter abnehmen kann, was sich ggf. negativ auf die induzierte Immunantwort auswirkt (Zheng et al., 2007). Zum anderen erlauben einige virale Vektoren wie bspw. Adenoviren nur die Integration von Fremd-DNA limitierter Größe (Bett, Prevec, and Graham, 1993).

Ersteres Problem lässt sich meist durch die Verwendung eigener, den Fremdgenen direkt vorgelagerten Promotoren und der damit verbundenen gezielten Genkontrolle minimieren (Wang et al., 2006; Zheng et al., 2007). Dies hat jedoch zur Folge, dass sich die Länge der zu integrierenden Fremd-DNA weiter vergrößert. Die Identifikation weiterer Insertionsorte zur stabilen Integration von Fremdgenen stellt hierzu eine geeignete Lösung dar. Die Identifikation neuer Fremdgeninsertionsstellen konzentriert sich zumeist auf Bereiche, die während einer Adaption des Vektorvirus in Kulturzellen deletiert werden (sog. Del-Bereiche) und für das Wachstum nicht-essentielle Bereiche im viralen Genom darstellen (Drexler I, 2004; Meyer, Sutter, and Mayr, 1991). So sind für das Vacciniavirus MVA mehrere solcher Bereiche zur Fremdgeninsertion beschrieben (Antonis et al., 2007; Meyer, Sutter, and Mayr, 1991; Staib et al., 2000; Sutter and Moss, 1992; Wyatt et al., 2009) wie z.B. das Hämagglutinin (Antoine et al., 1996) oder das Thymidine-Kinasegen (Scheiflinger, Falkner, and Dorner, 1996), welches im ORFV jedoch nicht existiert (Drexler I, 2004; Rziha et al., 1999). Verglichen zum Wildtyp kam es auch im Genom des ORFV-Stamms D1701-V während der Adaption in Kulturzellen zu natürlichen Deletionen die das Viruswachstum nicht auffallend beeinträchtigen (Rziha, unpublished data; Rziha et al., 2000). Hierbei sind insbesondere die Bereiche Del1, Del2 und Del3 interessant, die neben dem VEGF-Genlokus als potentielle Insertionsstellen in Betracht kommen. Das vegf-e Gen stellt einen nicht-essentiellen Virulenzfaktor des ORFV dar (Cottone et al., 1998; Lyttle et al., 1994; Meyer et al., 1999; Savory et al., 2000; Wise et al., 1999) und wird derzeit erfolgreich für die Fremdgenexpression unter Kontrolle des originären early Promoters des vegf-e Gens genutzt (Rziha et al., 1999).

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Generierung eines polyvalenten ORFV-Vektors, wobei zum einen die Möglichkeit der Insertion mehrerer Fremdgene im vegf-e Genlokus getestet, zum anderen neue stabile Fremdgeninsertionsorte identifiziert werden sollten.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des Projekts zur Generierung einer universellen Influenzavirusvakzine (Siehe Kapitel 6.1.2) sollte eine ORFV-Rekombinante hergestellt werden, die gleichzeitig das NP- und das HA-Gen eines H5N1 IAV-Stamms exprimiert. Dafür wurde das Transferplasmid pdV-HANPh5 konstruiert, in dem unter Kontrolle des vorgelagerten vegf-e Promoters das HAh5- und das NPh5n-Gen durch einen 7bp-langen Spacer in Reihe fusioniert vorlagen (Abb. 1B). Nach erfolgreicher Integration des HA-NP-Fusionskonstrukts in den VEGF-Lokus des parentalen Vektors D1701-VrV wurde die HA- und NP-Expression der neu generierten Rekombinante D1701-V-HANPh5 *in vitro* untersucht. Dabei konnte die Expression beider Fremdgene nachgewiesen werden (Abb. 1C), jedoch zeigte ein Vergleich mit der die Fremdgenexpression der beiden Einzelrekombinanten D7101-V-HAh5 und D1701-V-NPh5n eine deutlich verringerte Expressionsstärke (Abb. 1D + 1E). Auffällig war, dass sich dieser Effekt für das NP deutlich stärker auswirkte als für das HA, was durch den weiteren Abstand des NP-Gens zum vegf-e Promoter erklären werden könnte.

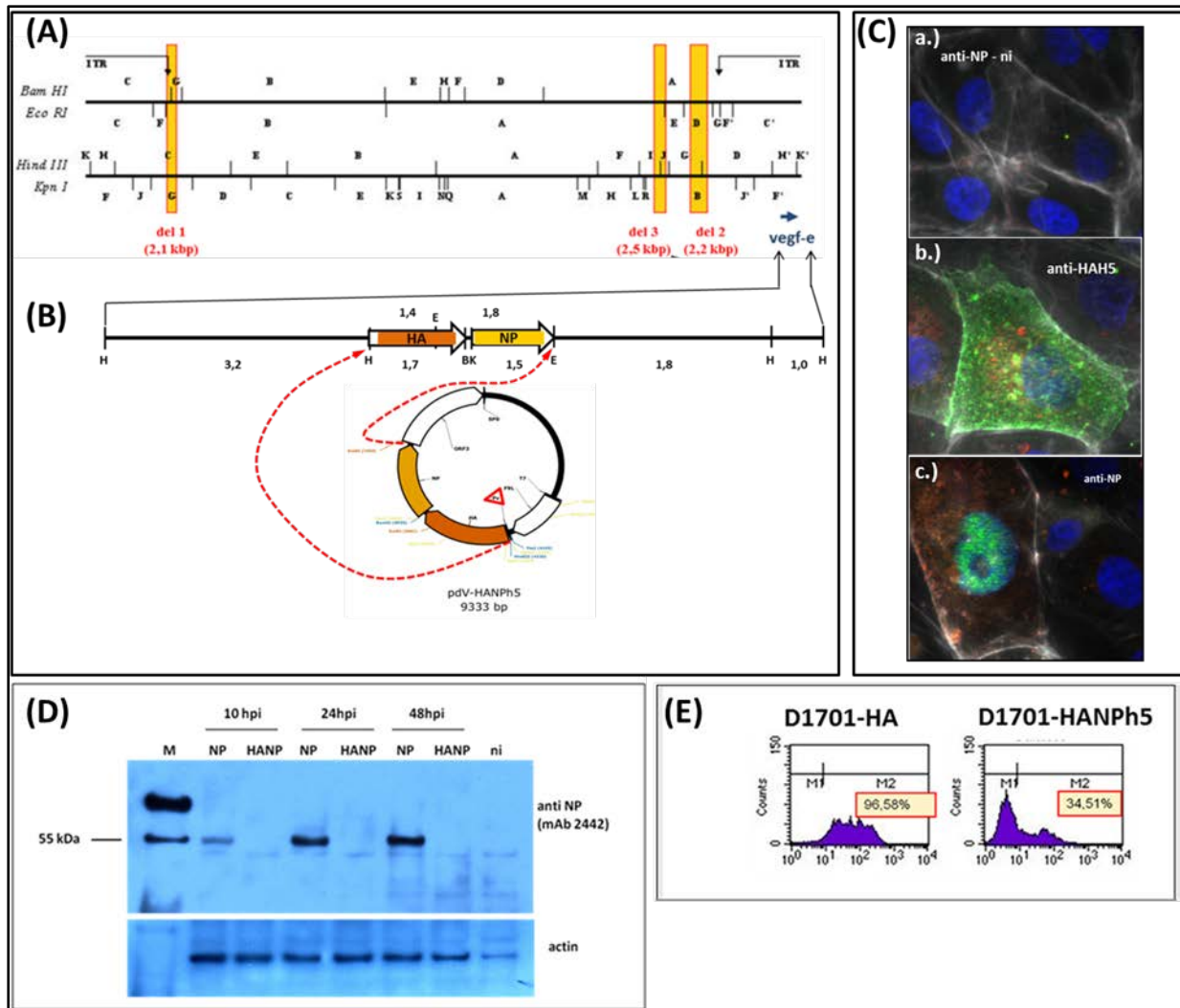
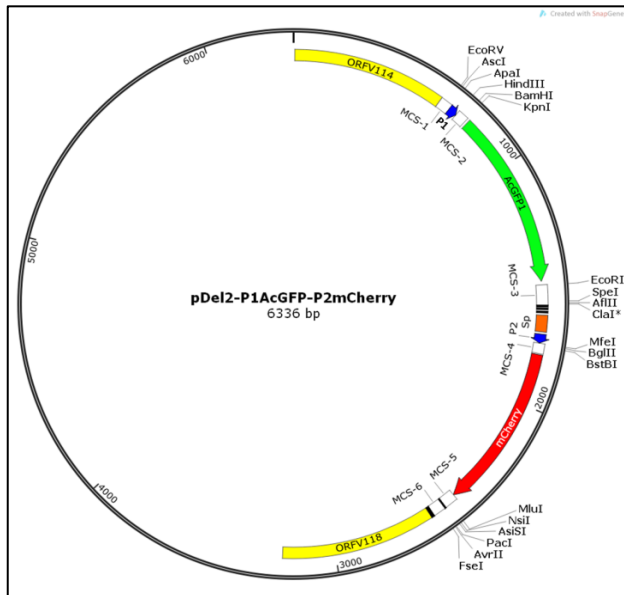


Abb. 1: Herstellung und in vitro Charakterisierung von D1701-V-HANPh5. (A) Restriktionskarte des D1701-V-Genoms. In Gelb sind die während der Vero-Adaption entstandenen über Genomsequenzierung identifizierten Deletionsbereiche Del1-3 gekennzeichnet. Die invertierten terminalen repetitiven Genomabschnitte sind als ITR (Inverted Terminal Repeats) gekennzeichnet. Der zur Fremdgeninsertion genutzte VEGF-Lokus ist mit einem blauen Pfeil markiert. (B) Transferplasmid pdV-HANPh5 und Integration in den Vektor D1701-VrV. Der Vektor zeigt das HANPh5-Fusionskonstrukt das aus den Genen HA5 (Orange) und NPh5 (gelb) besteht, welche durch einen 7bp-langen Spacer voneinander getrennt sind und unter der Kontrolle des originären frühen Promoters P_{veg-f} stehen (roter Pfeil). Die das Fusionskonstrukt umfassenden flankierten Bereiche (dunkelblau) sind in Downstream-Richtung homolog zu dem ORFV-Genombereich ORF-3, in Upstream-Richtung homolog zu dem ORFV-Genombereich F9L-F10L und gewährleisten die zielgerichtete Integration in den VEGF-Lokus des D1701-V-Genoms über homologe Rekombination. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen HindIII und BamHI, sowie KpnI und EcoRI sind ebenso wie das T5NT Signal für den Stopp der frühen poxviralen Transkription dargestellt. Nach Infektion von Vero-Zellen mit dem LacZ-exprimierenden D1701-VrV wurde das Transferplasmid pdV-HANPh5 in die Zellen transfiziert. Die Generierung

rekombinanter D1701-V-HANPh5 erfolgte durch Integration des HANPh5-Fusionskonstrukts im Austausch mit der LacZ-Genkassette nach Rekombination über die homologen Bereiche in den VEGF-Lokus. **(C)** Nachweis der Fremdgenexpression von D1701-V-HANPh5 infizierten Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit D1701-V-HANPh5 infiziert und 24 Stunden nach Infektion mit HA5- (b.) bzw. NPh5- (c.) spezifischen Antikörpern und einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Zellkerne (blau) wurden durch DAPI-Färbung, das Aktin-Zytoskelett (weiß) durch Phalloidin-647 angefärbt. Nicht-infizierte Kontrollzellen (a.) zeigen keine HA- bzw. NP-Expression. **(D)** Vergleich der NP-Expressionstärke von D1701-V-HANPh5 und D1701-V-NPh5. Vero-Zellen wurden mit einer MOI 3,0 mit D1701-V-HANPh5 oder D1701-V-NPh5 infiziert und nach 10, 24 und 48 Stunden das Zelllysate geerntet. Anschließend wurde das NP-Protein (55 kDa) über einen NP-spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion des Haushaltgens beta-Aktin, als Negativkontrolle wurde ein Proteinlysate nicht-infizierter Vero-Zellen eingesetzt. **(E)** Vergleich der HA-Expression von D1701-V-HANPh5 und D1701-V-HA5. Vero-Zellen wurden mit einer MOI 3,0 mit D1701-V-HANPh5 oder D1701-V-HA5 infiziert und 6 Stunden später die HA-Oberflächenexpression mit einem HA-spezifischen Antikörper in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Histogramme zeigen die Zellzahl (Y-Achse) gegenüber der Fluoreszenzintensität (X-Achse) nach Ausschluss 7-AAD positiver, toter Zellen. Zellen ohne HA-Oberflächenexpression befinden sich im Abschnitt M1, HA-exprimierende Zellen im Abschnitt M2. Der prozentuale Anteil HA-exprimierender Zellen ist in den jeweiligen Histogrammen angegeben.

Aufgrund der schwachen Genexpression des NP-Gens wurde eine alternative Strategie zur Herstellung eines polyvalenten Vektors untersucht. Da während der Adaption des ORFV auf Vero-Kulturzellen mehreren Deletionen im viralen Genom auftraten (sog. Del-Bereiche), sollte untersucht werden, ob sich diese Del-Bereiche für die Integration von Fremdgenen eignen (Abb. 1A). Daher wurde neben weiteren Plasmiden das Transferplasmid pDel2 konzipiert, welches die homologen Bereiche der Del2-Region umfasst (Abb. 2). Die Klonierung von Fremdgenen in das Plasmid wurde durch den Einsatz mehrerer Multipler Klonierungsstellen (MCS) ermöglicht. Zusätzlich wurde das Plasmid so konstruiert, dass es die gleichzeitige Integration mehrerer Fremdgene erlaubte, die jeweils unter Kontrolle artifizierlicher früher ORFV-Promotoren stehen und von poxspezifischen T5NT frühen Transkriptions-Stoppmotiven begrenzt sind (Abb. 2).

Abb. 2: Schematische Darstellung des Transferplasmids pDel2-P1AcGFP-P2mCherry. Der Vektor zeigt das AcGFP-Gen (grün), dass unter der Kontrolle des artifiziellen frühen Promoters P1 (blau) sowie das mCherry-Gen (rot), dass unter der Kontrolle des artifiziellen frühen Promoters P2 (blau) steht.



Der Vektor zeigt das AcGFP-Gen (grün), dass unter der Kontrolle des artifiziellen frühen Promoters P1 (blau) sowie das mCherry-Gen (rot), dass unter der Kontrolle des artifiziellen frühen Promoters P2 (blau) steht. Hinter beiden Fluoreszenzgenen befinden sich poxspezifische frühe Transkriptionsstopp-Motive T5NT (schwarz). Die Gene sind über einen Spacer (Sp., orange) voneinander getrennt. Mehrere Multiple Cloning Sites (MCS 1-6, weiß) ermöglichen den Austausch der Fluoreszenzmarkergene durch gewünschte Fremdgene. Die Gene umfassenden flankierten Bereiche (gelb) sind "Downstream" homolog zu dem ORFV-Genombereich ORF-117, "Upstream" homolog zu dem ORFV-Genombereich ORF-114 und gewährleisten eine zielgerichtete Integration in den Del2-Lokus des D1701-V-Genoms über homologe Rekombination.

Die Nukleotidsequenzen der artifiziellen frühen ORFV-Promotoren P1 und P2 wurden unter Berücksichtigung verschiedener publizierter, essentieller Konsensusmotive zur Steuerung früher poxviraler Genexpression entworfen (Cunningham et al., 2003; Davison and Moss, 1989; Hammond, Oke, and Coupar, 1997). In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob der Del2-Lokus für die stabile Integration von Fremdgenen geeignet ist. Hierzu wurde das mCherry-Fluoreszenzmarkergen unter Kontrolle des Promoters P2 in das pDel2-Transferplasmid kloniert. Anschließend wurde das Plasmid in D1701-VrV-infizierte Vero-Zellen transfiziert und neue rekombinante Viren visuell nach Identifikation rot-leuchtender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie selektioniert und die über mehrere Plaquereinigungen erhaltene homogene Rekombinante D1701-V-P2-Cherry angezogen (Abb. 3A,a). Die korrekte Integration des mCherry-Gens in den Del2-Lokus von D1701-VrV wurde über spezifische PCR-Analysen und Southern Blot-Hybridisierungen sichergestellt, die korrekte Expression ließ sich neben Fluoreszenz- und Western Blot-Analysen auch mittels Durchflusszytometrie zeigen (Abb. 3A,b). Dabei konnte eine starke Expression früh nach Infektion nachgewiesen werden. Durch mehrmaliges *in vitro* Passagieren der Rekombinante konnte gezeigt werden, dass die Fremdgen-Integration in das ORFV-Genom stabil war. Weiterhin wurde mithilfe der

hergestellten Rekombinante D1701-V-GFP-P2-Cherry, bei der das AcGFP-Gen im VEGF- und das mCherry-Gen im Del2-Lokus integriert ist, erfolgreich die simultane frühe Expression zweier Fluoreszenzgene in unterschiedlichen Insertionsloci nachgewiesen (Abb. 3B). Weiter sollte untersucht werden, ob gleichzeitig auch ein zweites Fremdgen stabil in den Del2-Lokus integriert werden kann. Hierfür wurde in das pDel2-Transferplasmid neben dem P2-kontrollierten mCherry-Gen, das AcGFP-Gen unter Kontrolle des P1-Promoters kloniert. Die Selektion und Aufreinigung der homologen Rekombinanten D1701-V-P1-GFP-P2-Cherry erfolgte analog zu der vorher beschriebenen D1701-V-P2-Cherry-Selektion. Auch hier wurde über PCR- und Southern Blot-Analysen die korrekte Integration der beiden Fremdgene in den Del2-Lokus gezeigt. Der Nachweis der Expression erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie (Abb. 3C).

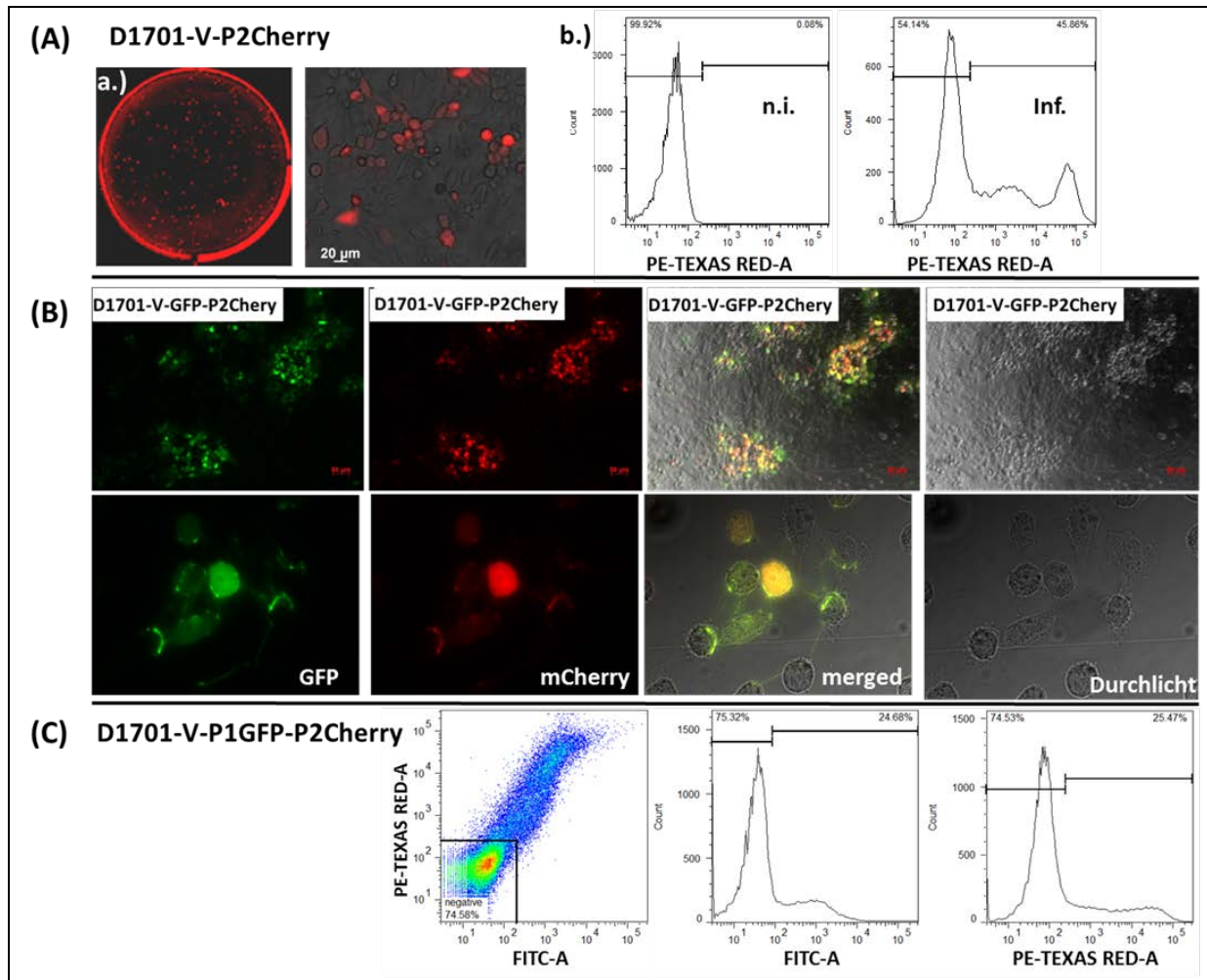
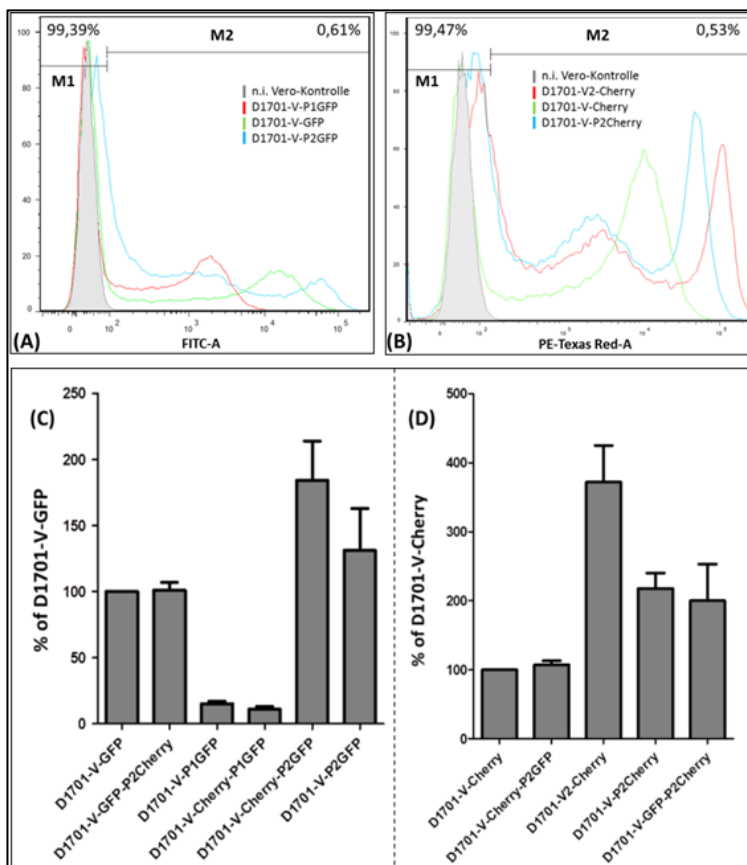


Abb. 3: Expressionsanalyse unterschiedlicher Fluoreszenzrekombinanten. (A,a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer 6-Well-Platte mit D1701-V-P2Cherry infizierten Vero-Zellen. Zur Selektion der Rekombinanten wurden Cherry-fluoreszierende Plaques gepickt und das Virus aus den Plaques angezogen. Nach vier Plaque-Reinigungen konnte die Homogenität von D1701-V-P2Cherry über PCR-Analysen sichergestellt werden. **(A,b)** Bestimmung der Cherry-Expression mittels Durchflusszytometrie. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Expression D1701-V-P2Cherry infizierter Vero-Zellen (MOI = 1,0) im Durchflusszytometer. Nach 48 Stunden exprimieren ca. 45 % aller lebender Einzelzellen Cherry. Nicht-infizierte Vero-Zellen dienen als Negativkontrolle. **(B)** Fluoreszenzexpression der Rekombinante D1701-V-GFP-P2Cherry. Vero-Zellen wurden mit D1701-V-GFP-P2Cherry infiziert (MOI = 0,5). In der oberen Reihe ist eine Fluoreszenzaufnahme 48 Stunden nach Infektion zu sehen (Vergrößerung: 20X). Die untere Reihe zeigt die Fluoreszenzexpression nach 24 Stunden (Vergrößerung: 63X). Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubte die Darstellung der GFP- (grün), der Cherry-Expression (rot), sowie beider Fluoreszenzen in einer Zelle (merged). Zusätzlich wurden die Zellen im Mikroskop-Durchlicht aufgenommen. **(C)** Fluoreszenzexpression der Rekombinante D1701-V-P1GFP-P2Cherry. Vero-Zellen wurden mit D1701-V-P1GFP-P2Cherry infiziert (MOI = 1,0) und die Expression im Durchflusszytometer ermittelt. Nach 24 Stunden exprimierten ca. 25 % aller lebender Einzelzellen sowohl Cherry, als auch GFP. Nicht-infizierte Vero-Zellen dienen als Negativkontrolle.

Die Stärke der Promotoren P1 und P2 wurde untereinander und mit dem Promoter P_{veg} in Expressionsanalysen verglichen. Dabei zeigte sich, dass der Promoter P2 die stärkste, der Promoter P1 die schwächste Genexpression induzierte (Abb. 4A + 4C). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Integration eines zweiten, unter Kontrolle eines eigenständigen Promoters regulierten Fremdgens keine Auswirkung auf die Expressionsstärke des ersten Fremdgens hatte. Dabei war es irrelevant, ob das zweite Gen in denselben oder in einen unterschiedlichen Insertionslokus integriert wurde. Nach der Insertion eines P2-gesteuerten mCherry-Gens in den VEGF-Lokus konnte anhand des Vergleichs mit der Rekombinanten, die das P2-regulierte mCherry-Gen in den Del2-Lokus integriert hatte, der Einfluss des Insertionsorts untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression im VEGF-Lokus etwa zweimal so stark war, wie im Del2-Lokus (Abb. 4B + 4D).

Abb. 4: Bestimmung der Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Rekombinanten. (A) Vero-Zellen wurden mit GFP-exprimierenden Rekombinanten (MOI ca. 1,5) infiziert und 24 Stunden später die mittlere Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Nicht-infizierte Vero-Zellen dienten als Negativkontrolle. M1 beschreibt den Bereich in dem 99,39 % aller nicht-infizierten Zellen (grau ausgefüllte Kurve) detektiert werden. Im Bereich M2 befinden sich dagegen GFP-positive Zellen. Die Population GFP-positiver Zellen war nach Infektion mit den GFP-exprimierenden Rekombinanten vergleichbar (38,2 % – 40,0 %). Dabei war ersichtlich, dass die GFP-Intensität in D1701-V-P1GFP-infizierten Zellen (rote Linie) am geringsten, in D1701-V-P2GFP-infizierten Zellen (blaue Linie) am stärksten war. (B) Vero-Zellen wurden mit Cherry-exprimierenden Rekombinanten (MOI ca. 3,0) infiziert und 24 Stunden später die mittlere Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Nicht-infizierte Vero-Zellen dienten als Negativkontrolle. M1 beschreibt den Bereich in dem 99,47 % aller nicht-infizierten Zellen (grau ausgefüllte Kurve) detektiert werden. Im Bereich M2 befinden sich dagegen Cherry-positive Zellen. Die Population Cherry-positiver Zellen war nach Infektion mit den Cherry-exprimierenden Rekombinanten vergleichbar (38,2 % – 40,0 %). Dabei war ersichtlich, dass die Cherry-Intensität in D1701-V-P1Cherry-infizierten Zellen (rote Linie) am geringsten, in D1701-V-P2Cherry-infizierten Zellen (blaue Linie) am stärksten war.



positiver Zellen war nach Infektion mit den GFP-exprimierenden Rekombinanten vergleichbar (62,5 % – 63,3 %). Dabei war die Cherry-Intensität in D1701-V-Cherry-infizierte Zellen (grüne Linie) deutlich geringer als in D1701-V-P2Cherry- (blaue Linie) bzw. in D1701-V2Cherry-infizierten Zellen (rote Linie). **(C+D)** Die Diagramme zeigen die prozentuale Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Fluoreszenzrekombinanten in Relation zu D1701-V-GFP **(C)** bzw. zu D1701-V-Cherry **(D)**. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu der erfolgreichen Fremdgeninsertion in den Del2-Lokus konnte in den Del3-Lokus keine stabile Fremdgeninsertion erreicht werden. Hier müssen weitere Untersuchungen Aufschluss über die Ursachen geben oder zeigen, ob der Del3-Lokus als Fremdgeninsertionsort generell nicht geeignet ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Orf-Virusvektor D1701-V für die Herstellung polyvalenter Rekombinanten sehr gut geeignet ist. Es konnten mehrere Fremdgene stabil in das virale Genom integriert werden. Die Stärke der Fremdgenexpression ist sowohl von dem Promotor als auch vom Insertionslokus abhängig. Die stärkste Genexpression wurde nach Integration eines P2-gesteuerten Fremdgens im VEGF-Lokus erreicht. Im Rahmen meiner Dissertation wurden weitere unterschiedliche Vektoren hergestellt, die sich durch die Art und Konstellation der verschiedenen Markerfremdgene, Insertionsorte und Promotoren voneinander unterscheiden (Abb. 5). Dies eröffnet für die Entwicklung neuer rekombinanter ORFV-basierter Impfstoffe eine Vielzahl an Optionen. So können Rekombinanten hergestellt werden, die gleichzeitig mehrere Antigene exprimieren. Dies könnte etwa bei der Herstellung einer universeller Vakzine, von Kombinationsimpfstoffen oder von therapeutischen Tumorimpfstoffen, die sich gegen mehrere Tumorantigene richten, ein bedeutender Vorteil sein. Darüber hinaus könnte die Immunantwort durch eine gleichzeitige Insertion von Antigen und Zytokinen gezielt beeinflusst werden.

Rekombinante	Lokus		Fremdgen-expression
	VEGF	Del2	
D1701-V-Cherry	P _{vegf} : mCherry	-	+++
D1701-V-Cherry-P1GFP	P _{vegf} : mCherry	P1: AcGFP	+++/+
D1701-V-Cherry-P2GFP	P _{vegf} : mCherry	-	+++/>++++
D1701-V2-Cherry	P2: mCherry	-	+++++
D1701-V2-Cherry-P2GFP	P2: mCherry	-	+++++/++++
D1701-V-GFP	P _{vegf} : AcGFP	-	+++
D1701-V-GFP-P2Cherry	P _{vegf} : AcGFP	-	P2: mCherry +++/>++++
D1701-V-GFP-P2CD4	P _{vegf} : AcGFP	-	P2: hCD4 +++/>++++
D1701-V-P1GFP	P _{vegf} : LacZ	P1: AcGFP	- +++/>+
D1701-V-P1GFP-P2Cherry	P _{vegf} : LacZ	P1: AcGFP	P2: mCherry +++/>+/++++
D1701-V-P2GFP	P _{vegf} : LacZ	-	P2: AcGFP +++/>++++
D1701-V-P2Cherry	P _{vegf} : LacZ	-	P2: mCherry +++/>++++
D1701-V-P2Orange	P _{vegf} : LacZ	-	P2: mOrange +++/>++++
D1701-V-CD4-P2Cherry	P _{vegf} : hCD4	-	P2: mCherry +++/>++++
D1701-V-gp70-P1RabG-P2Cherry	P _{vegf} : FelV gp70	P1: RabG	P2: mCherry +++/>+/+++
D1701-V-cdvH-P1RabG-P2Cherry	P _{vegf} : cdv H	P1: RabG	P2: mCherry +++/>+/+++
D1701-V-RabG-P2Cherry	P _{vegf} : RabG	-	P2: mCherry +++/>++++

Abb. 5: Tabellarische Übersicht der neu hergestellten fluoreszierenden ORFV-Vektoren. Die Tabelle gibt einen Überblick über die während der Dissertation hergestellten fluoreszierenden Vektoren. Der Insertionsort (Lokus) und die für die Steuerung der Fremdgenexpression genutzten Promotoren (P_{vegf}, P1, P2) sind für die jeweiligen Rekombinanten in der Tabelle ersichtlich. Zudem ist die Stärke der Fremdgenexpression angegeben (sehr stark = +++++ bis schwach = +). cdvH: H-Gen des Canine Distemper Virus (Hundestaupe), gp70: Glykoproteinform (70 kDa) des Felinen Leukämie Virus.

6.2.2 Neue Selektionsmethoden zur Isolierung rekombinanter ORFV - Einleitung, Ergebnisse und Diskussion

Einleitung

Üblicherweise werden rekombinante Pockenviren in permissiven Zellen mittels homologer Rekombination eines Transferplasmids und dem Genom des replizierenden Virus generiert (Mackett, Smith, and Moss, 1984; Moss, 1996). Um sicherzustellen, dass die Fremd-DNA an die gewünschte Stelle des viralen Genoms integriert wird, enthält das Transferplasmid homologe, virale Sequenzbereiche die die zu inserierende Fremd-DNA flankieren (Moss, 1996). Da Rekombinationsereignisse sich sehr selten ereignen, Rekombinationsfrequenzen liegen zwischen 1:1.000 und 1:10.000 (Piccini A, 1987), stellt die Selektion neuer rekombinanter Viren meist einen relativ mühsamen, teuren und langwierigen Prozess dar, welcher auch ein hohes Maß an technischem Knowhow erfordert (Lorenzo, Galindo, and Blasco, 2004). Infolgedessen wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um die gezielte Selektion rekombinanter Viren zu erleichtern. Häufig wird ein austauschbares Markergen in das Transferplasmid eingebaut und zusammen mit dem Fremdgen („gene of interest“) in das virale Genom integriert. Diese Technik hat den entscheidenden Nachteil, dass neben dem Fremdgen gleichzeitig auch das Markergen im rekombinanten Virus exprimiert wird. Potenzielle Gefahren durch einen unerwünschten Einfluss des Markergens können nicht ausgeschlossen werden und stehen somit einem genehmigungspflichtigen Einsatz entgegen. Daher muss die Herstellung markerfreier Rekombinanten bevorzugt werden. Unterschiedliche Verfahren wie z.B. eine visuelle Selektion mittels Expression der β -Galactosidase (Sutter and Moss, 1992), β -Glucuronidase (Carroll and Moss, 1995) oder von Fluoreszenzproteinen (Dominguez, Lorenzo, and Blasco, 1998; Ning et al., 2011; Wong et al., 2011), sowie eine transiente „host-range“ Selektion (Scheifflinger, Dorner, and Falkner, 1998; Staib et al., 2000; Staib et al., 2003), eine transiente dominante Selektion (Falkner and Moss, 1990), oder entfernbare Markersysteme (Rintoul et al., 2011) sind beschrieben.

Anfangs wurde zur Herstellung rekombinanter ORFV die herkömmliche Blau-Weiß-Selektion verwendet, die auf der Hydrolyse von X-Gal durch die β -Galaktosidase des

LacZ-Gens beruht. Da diese Methode allerdings sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, war die Etablierung einer neuen einfacheren Selektionsmethode sehr wünschenswert.

Deshalb wurde in der Dissertationsarbeit eine fluoreszenzbasierte Selektionsmethode erarbeitet, wobei das LacZ-Gen durch ein Fluoreszenzgen ersetzt wurde. Neue Rekombinanten sollten durch den Austausch des Fluoreszenzgens gegen ein Fremdgen generiert und durch den Verlust an Fluoreszenz (loss of fluorescence) visuell selektioniert werden.

Weiter wurde ein bisher nicht beschriebenes Selektionssystem entwickelt das den Einsatz der MACS (Magnetic cell separation)-Technologie zur Grundlage hat (Miltenyi et al., 1990).

Die MACS-Technologie wird normalerweise dazu verwendet, um Zellen zu isolieren die ein spezifisches Oberflächenmolekül oder -Antigen exprimieren. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass mit magnetischen Partikeln konjugierte Antikörper, sogenannte MACS-Beads, spezifisch an Zellen binden und in einem starken magnetischen Feld zurückgehalten werden, wodurch sie von ungebundenen Zellen getrennt werden können.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rekombinante D1701-V-CD4 entwickelt, welche das humane CD4-Antigen (hCD4) exprimiert und als Ausgangsrekombinante für eine MACS-basierte Selektion dienen sollte. Da für ORFV permissive Vero-Zellen (Affennierenzellen) kein hCD4 exprimieren, lassen sich D1701-V-CD4 infizierte Zellen durch die Oberflächenexpression des hCD4 charakterisieren und mithilfe der MACS-Technologie von nicht-infizierten Zellen separieren. In neu zu generierenden Rekombinanten sollte nun der Austausch des hCD4 durch ein Fremdgen erfolgen. Dadurch sollten sich in infizierten Vero-Zellen die neuen, hCD4-freien Rekombinanten leicht von den parentalen hCD4-exprimierenden Viren trennen lassen (Abb. 6). Dies sollte eine technisch wesentlich einfachere, schnellere und effizientere Selektion der gewünschten neuen ORFV-Rekombinanten ermöglichen.

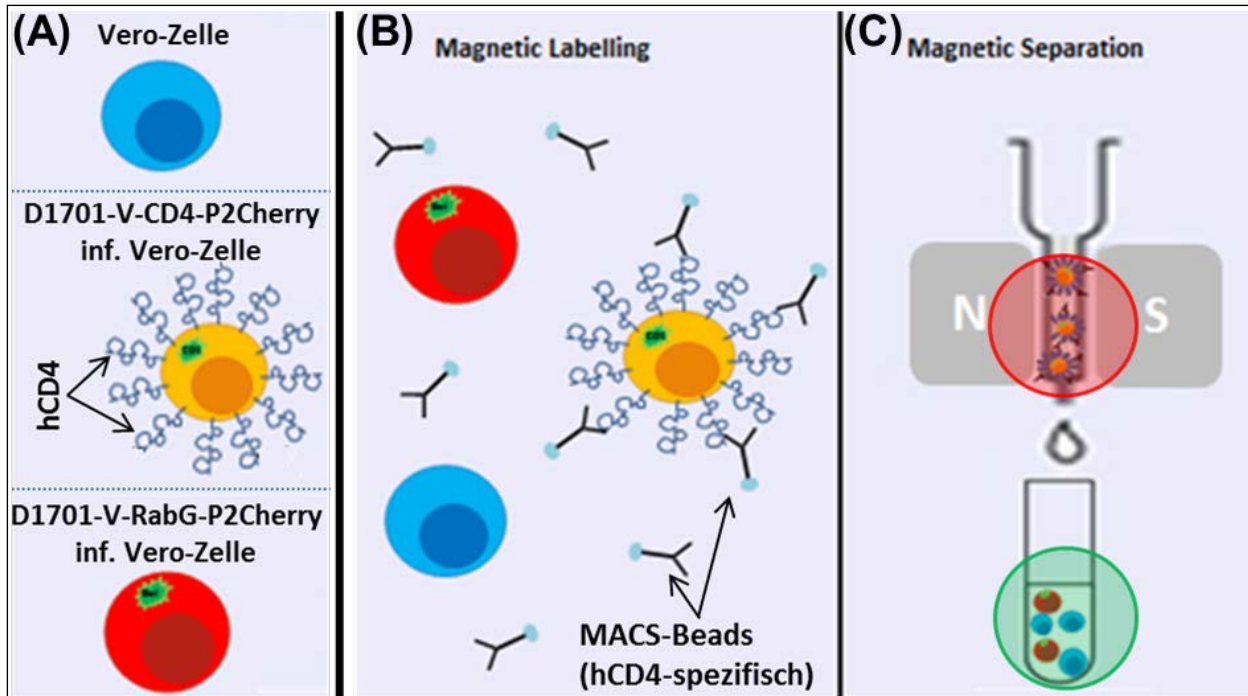


Abb. 6: Schematische Darstellung der MACS-basierten Selektion. **(A)** Ausgangsmaterial zu Beginn der Selektion war ein Transfektionslysat, das nicht-infizierte Vero-Zellen (blau), mit der Ausgangsrekombinante D1701-V-CD4-P2Cherry-infizierte, hCD4-exprimierende Vero-Zellen (orange) und mit der neu entstandenen Rekombinante D1701-V-RabG-P2Cherry-infizierte Vero-Zellen (rot) enthielt. **(B)** Nach Zugabe von mit magnetischen Partikeln konjugierten, hCD4-spezifischen MACS-Beads binden die Antikörper an Zellen die hCD4 an ihrer Oberfläche exprimieren. **(C)** Die Auftrennung erfolgt durch eine Säule in einem magnetischen Feld. MACS-Beads-gekoppelte Zellen werden im Magnetfeld festgehalten, während nicht gebundene Zellen das Magnetfeld passieren. Im Durchfluss befinden sich daher überwiegend nicht-infizierte und D1701-V-RabG-P2Cherry-infizierte Zellen (hCD4-negative Zellpopulation: grün eingekreist), wohingegen in der Säule im Magnetfeld D1701-V-CD4-P2Cherry-infizierte Zellen akkumulieren (hCD4-positive Zellpopulation: rot eingekreist).

Ergebnisse und Diskussion

Herstellung und Charakterisierung der Rekombinante D1701-V-CD4-P2Cherry

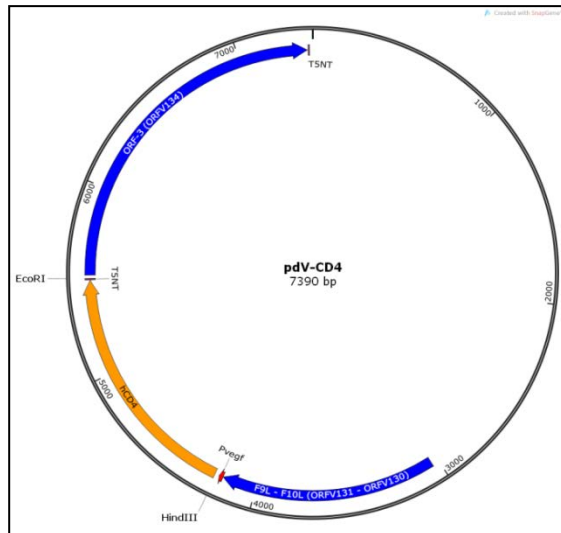


Abb. 7: Schematische Darstellung des Transferplasmids pdV-CD4. Schematische Darstellung des hCD4-Gens (orange), das unter der Kontrolle des originären frühen Promoters P_{vegf} steht (roter Pfeil). Die das hCD4-Gen flankierenden Bereiche (dunkelblau) sind "Downstream" homolog zu dem ORFV-Genombereich ORF-3, "Upstream" homolog zu dem ORFV-Genombereich F9L-F10L und gewährleisten eine zielgerichtete Integration in den VEGF-Lokus des D1701-V-Genoms über homologe Rekombination. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI und das poxspezifische frühe Transkriptionsstopp-Motiv T5NT sind dargestellt.

Die hCD4-Gensequenz (aus pMACS 4.1, Miltenyi) wurde von der Firma Mr.Gene chemisch synthetisiert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII in das Plasmid pdV-Rec1 kloniert (Abb. 7). Das neu entstandene Transferplasmid pdV-CD4 wurde anschließend in D1701-V-GFP-P2Cherry infizierte Vero-Zellen transfiziert (Abb. 8A - 8C). Neue D1701-V-CD4-P2Cherry-Rekombinanten konnten von den GFP/Cherry-exprimierenden parental Viren über den Verlust an GFP-Fluoreszenz unterschieden und selektioniert werden (Abb. 9A). Der Nachweis der korrekten Integration des hCD4-Gens im Austausch mit dem AcGFP-Gen in den VEGF-Lokus konnte über spezifische PCR-Analysen nachgewiesen und die genetische Homogenität von hCD4-positiver und GFP-negativer ORFV-Rekombinanten sichergestellt werden (Abb. 9B). Anschließend wurde das Virus in Vero-Zellen vermehrt und mittels Ultrazentrifugation zu hohen Virustitern angereichert. Die korrekte, frühe Expression von hCD4 in infizierten Vero-Zellen wurde über Western Blot-Analysen, immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen (Abb. 9C). Wachstumskinetiken der neuen Rekombinanten D1701-V-CD4-P2Cherry zeigten, dass die Integration des hCD4-Gens

zu keinen Veränderungen der Wachstumseigenschaften führte. Die Stärke und der zeitliche Verlauf der Oberflächenexpression in Relation zur Zellviabilität wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass bereits früh nach Infektion hCD4 an der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert wurde und die Intensität mit fortlaufender Dauer zunahm. Nach ca. 20-24 Stunden waren erste zytopathische Effekte zu erkennen und die Zellviabilität nahm ab. Da freigesetzte Viruspartikel (Fischer, 2003) mangels CD4-Inkorporation nicht durch MACS-Beads gebunden werden können, wurde eine Infektionsdauer von 18-20 Stunden festgesetzt.

Um eine möglichst effiziente Auftrennung von hCD4-positiven und hCD4-negativen Zellen zu erreichen, wurden zusätzlich in mehreren Vorversuchen unterschiedliche Beadsmengen, Inkubationszeiten, -Temperaturen und MACS-Säulchen ausgetestet und die optimalen Selektionsbedingungen ermittelt.

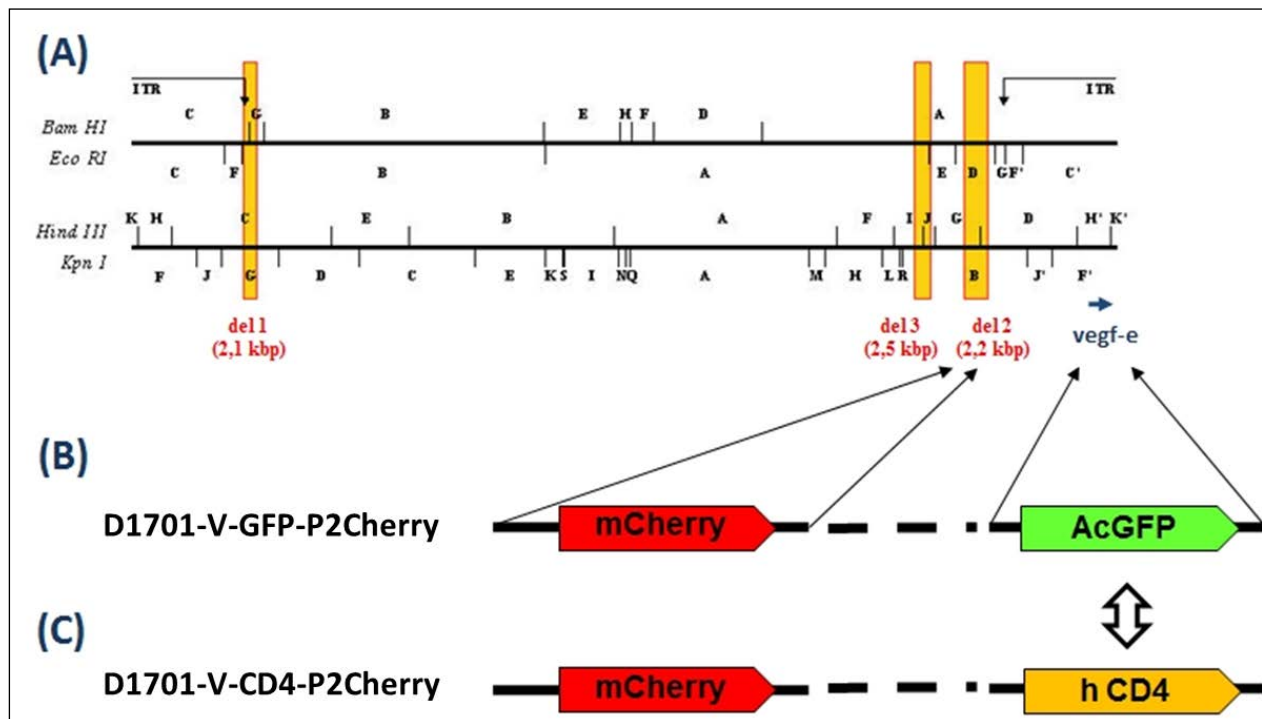


Abb. 8: Herstellung der Rekombinante D1701-V-CD4-P2Cherry. (A) Restriktionskarte des D1701-V-Genoms. Die nach Vero-Zelladaptation entstandenen Deletionen del1, del2 und del3 sind markiert, die Pfeile zeigen die inversen terminalen repetitiven Genombereiche (ITR). (B) Als Ausgangsvirus wurde die doppelt-fluoreszierende Rekombinante D1701-V-GFP-P2Cherry eingesetzt (siehe 6.2.1). Nach Infektion von Vero-Zellen wurde das Transferplasmid pdV-CD4 (Abb. 6) mittels Nukleofektion in die Zellen transfiziert. (C) Die Generierung von D1701-V-CD4-P2Cherry erfolgte durch Integration des hCD4-Gens im Austausch mit dem AcGFP-Gen homologer Rekombination.

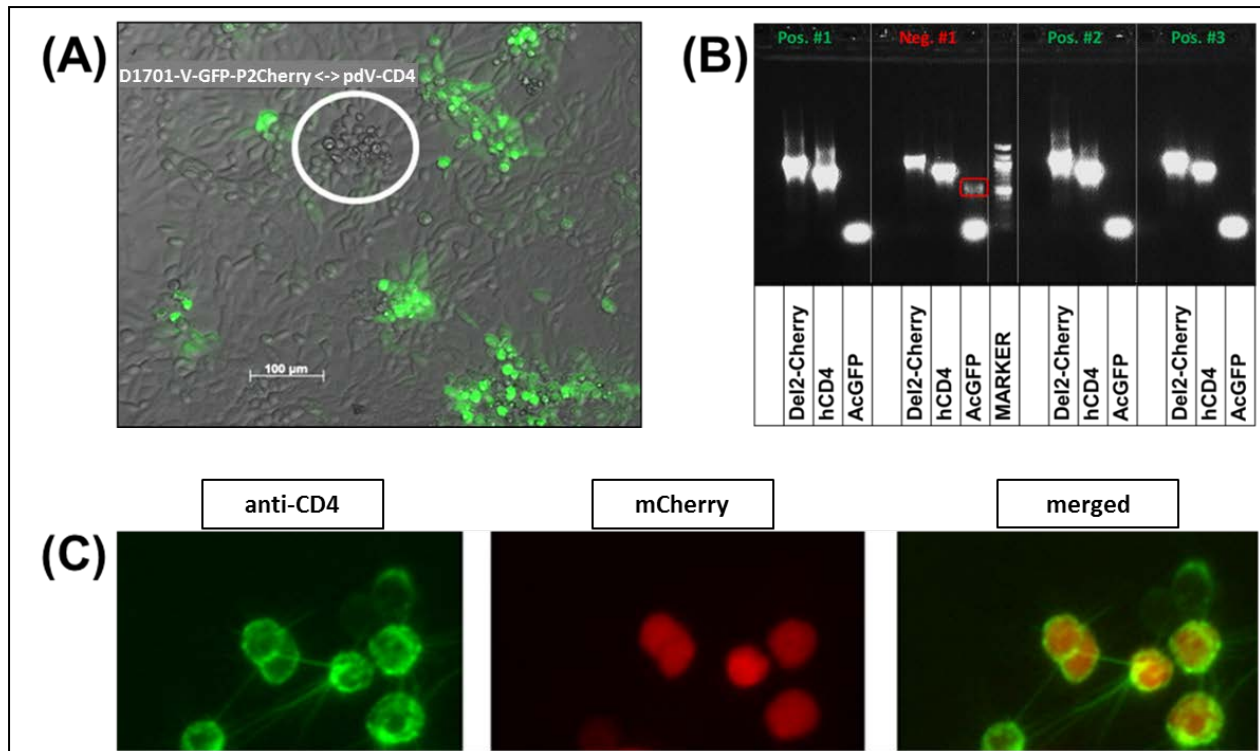
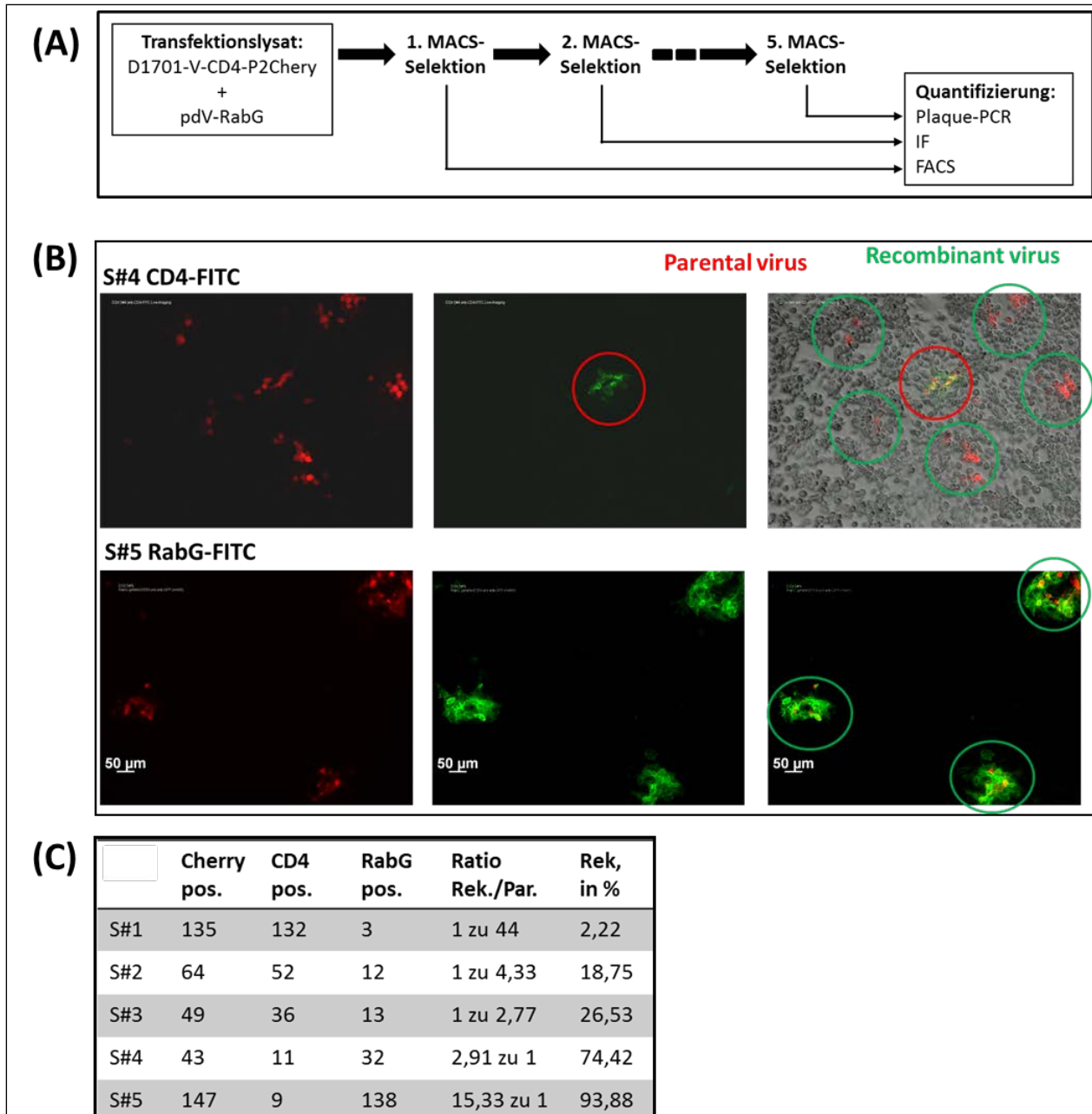


Abb. 9: Selektion der Rekombinante D1701-V-CD4-P2Cherry. (A) „Loss-of-fluorescence“: Selektion von D1701-V-CD4-P2Cherry mittels Fluoreszenzmikroskopie. Nicht-grün fluoreszierende Plaques (weißer Kreis) wurden identifiziert, gepickt und das Virus aus den Plaques angezogen. Nach fünf Plaque-Reinigungen konnte die Homogenität von D1701-V-CD4-P2Cherry über PCR-Analysen sichergestellt werden. (B) Exemplarische PCR-Analysen nach der vierten Plaque-Reinigung. Rekombinantes D1701-V-CD4-P2Cherry ist positiv für das hCD4-Gen und negativ für das in der Ausgangsrekombinante enthaltene AcGFP-Gen. Der Nachweis erfolgte über die angegebenen spezifischen PCRs. Die Proben Pos. #1-3 zeigen homogen rekombinantes Virus mit einem spezifischen hCD4-Signal (Amplikon: 857 bp); Neg. #1 zeigt ein Gemisch aus parentalen GFP-enthaltenden (Amplikon: 575 bp) und rekombinanten CD4-enthaltenden Viren. Die Anwesenheit des mCherry-Fluoreszenzgens im Del2-Lokus wurde über die spezifische Del2-Cherry-PCR nachgewiesen (Amplikon: 1.103 bp). (C) Immunfluoreszenz von D1701-V-CD4-P2Cherry infizierten Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit D1701-V-CD4-P2Cherry infiziert. Zwanzig Stunden nach Infektion wurde das hCD4-Protein mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper (Miltenyi) detektiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubte die Darstellung der hCD4-Oberflächenexpression (grün), die Cherry-Expression (rot), sowie beide Fluoreszenzen in einer Zelle nach Überlagerung (merged).

Generierung der neuen RabG-exprimierenden Rekombinante D1701-V-RabG-P2Cherry mittels MACS-Selektion

D1701-V-CD4-P2Cherry infizierte Vero-Zellen wurden mit dem Transferplasmid pdV-RabG transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Nach Aufschluss der Viren aus dem Zelllysat wurden damit frische Zellen über Nacht infiziert und anschließend mit CD4-

spezifischen MACS-Beads (Miltenyi) inkubiert und über eine magnetische Säule aufgetrennt. Dabei verblieben mit dem Ausgangsvirus D1701-V-CD4-P2Cherry infizierte hCD4-exprimierende Zellen im magnetischen Feld, wohingegen die restlichen Zellen die Säule passierten und sich im Durchfluss sammelten. Anschließend wurde die hCD4-negative Zellpopulation für weitere 20 Stunden bei 37°C inkubiert und die MACS-Selektion wiederholt. Insgesamt wurden fünf solcher MACS-Selektionsrunden durchgeführt, wobei nach jeder Runde ein Teil der negativen Zellpopulation zur Quantifizierung der Anreicherungs-effizienz neuer hCD4-negativer Rekombinanten verwendet wurde (Abb. 10A). Das Verhältnis von parentalen D1701-V-CD4-P2Cherry und neu generierten rekombinanten D1701-V-RabG-P2Cherry wurde über Einzelwell-PCR, Fluoreszenz-Analysen und Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 10A - 10D). Bereits nach der dritten MACS-Selektionsrunde ließen sich Einzelwells finden, in der die Rekombinante homogen vorlag (Abb. 10D). Eine Virusanzucht aus diesen homogenen D1701-V-RabG-P2Cherry-infizierten Einzelwells ermöglicht somit die Herstellung rekombinanter Vektoren bereits innerhalb einer Woche. Nach der vierten Selektionsrunde lag D1701-V-RabG-P2Cherry gegenüber dem Ausgangsvirus erstmals in der Überzahl vor und eine weitere Selektionsrunde führt dazu, dass knapp 95 % aller Viren die neue homogene Rekombinante darstellten, die das RabG- anstelle des hCD4-Gens exprimieren (Abb. 10B + 10C). Diese Ergebnisse konnten durch zwei weitere Rekombinanten, die auf Basis des MACS-Selektionssystems innerhalb von 7-10 Tagen generiert wurden, bestätigt werden.



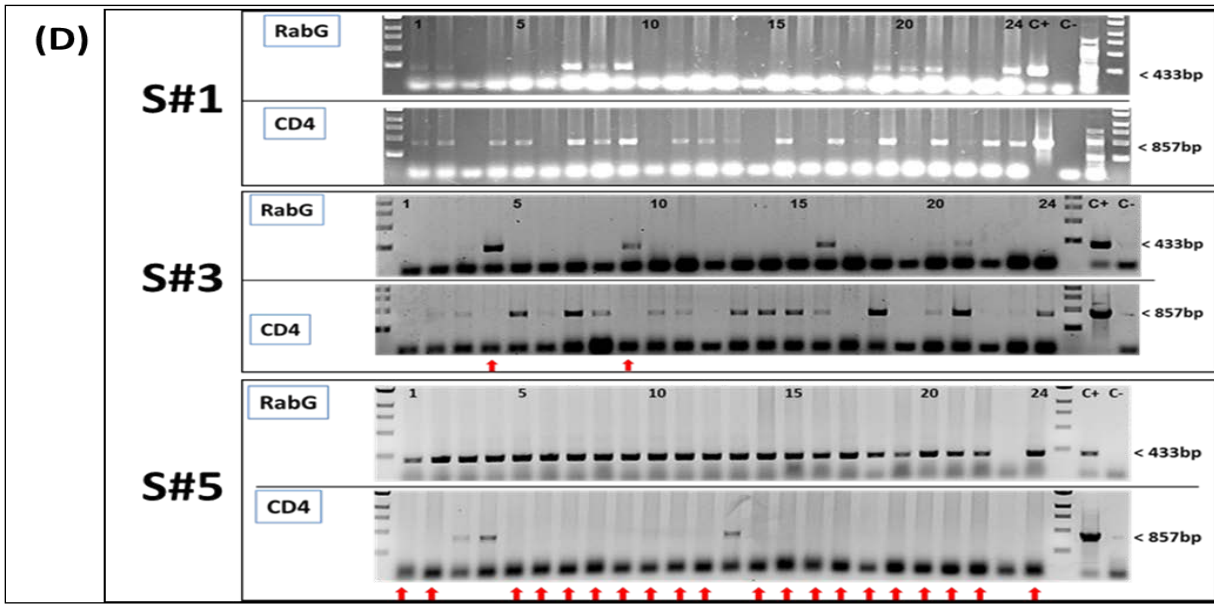


Abb. 10: MACS-basierte Selektion der Rekombinanten D1701-V-RabG-P2Cherry. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach Transfektion von D1701-V-CD4-P2Cherry-infizierten Vero-Zellen mit dem Plasmid pdV-RabG wurden Zellen mit dem Transfektionslysat 20 Stunden inkubiert. CD4-negative Zellen (negative Zellpopulation) wurden über MACS-Selektion isoliert und nach Zugabe von nicht infizierten Vero-Zellen für weitere 20 Stunden inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Teil der negativen Zellpopulation zur Quantifizierung der Selektionseffizienz eingesetzt. Insgesamt wurden 5 MACS-Selektionen durchgeführt. **(B)** Bestimmung der Selektionseffizienz mittels h-CD4- und RabG-spezifischer Immunfluoreszenz-Färbung. Um das Verhältnis von rekombinanten und parentalen Virus zu bestimmen, wurden nach jeder Selektionsrunde Zellen der negativen Population (Abb. 6C) in 6-Wellplatten ausgesät und 48 Stunden später entweder mit hCD4- (exemplarische Abbildung nach der vierten MACS-Selektionsrunde) bzw. RabG-spezifischen (exemplarische Abbildung nach der fünften MACS-Selektionsrunde) FITC-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Da alle Viren das Cherry-Fluoreszenzprotein im Del2-Lokus exprimieren, ist eine einfache Unterscheidung zwischen parentalen und rekombinanten Viren im Fluoreszenzmikroskop möglich. So erscheinen in der oberen Reihe (S#4 CD4-FITC) alle parentalen Viren rot-grün (rot eingekreist), wohingegen die rekombinanten Viren nur rot leuchten (grün eingekreist); in der unteren Reihe (S#5 RabG-FITC) erscheinen dagegen rekombinante Viren rot-grün (grün eingekreist) und parentale Viren rot. **(C)** Tabellarische Übersicht der Selektionseffizienz. Die Tabelle zeigt beispielhaft den jeweiligen Anteil parentaler und rekombinanter Virusplaques nach jeder der fünf durchgeführten MACS-Selektionsrunden (S#1 - S#5). Zusätzlich wurde das Verhältnis von rekombinanten zu parentalen Virusplaques ermittelt (Ratio Rek./Par.) und der daraus resultierende prozentuale Anteil an rekombinanten Viren errechnet (Rek. in %). **(D)** Identifikation neuer, MACS-selektierter Rekombinanten mittels PCR-Analyse. Nach jeder der fünf MACS-Selektionen (S#1 - S#5) wurden Zellen der negativen Population (Abb. 6C) in unterschiedlichen Verhältnissen mit nicht-infizierten Vero-Zellen gemischt und in 384-Well-Platten ausgesät. Zweiundsiebzig Stunden nach Aussaat wurden Wells, in denen 1-5 Einzelplaques identifiziert werden konnten, geerntet und die DNA isoliert. Mittels hCD4- und RabG-spezifischen PCRs wurde analysiert, ob in den untersuchten Einzelwells homogen rekombinantes D1701-V-RabG-P2Cherry (z.B. S#5 Spur 2; mit rotem Pfeil gekennzeichnet), homogen parentales D1701-V-CD4-P2Cherry (z.B. S#3 Spur 15) oder eine Mischung aus beiden Viren (z.B. S#1 Spur 8) vorliegt. Die roten Pfeile repräsentieren Wells, die die neue Rekombinante homogen enthalten. Die Größen der jeweiligen PCR-Amplikons sind rechts in Basenpaaren (bp) angegeben.

Verglichen zu der anfänglich genutzten Blau-Weiß-Selektion, die ca. drei Monate dauerte, konnte der Selektionsprozess zur Herstellung neuer rekombinanter ORFV so um ein Vielfaches beschleunigt werden, was neben der Zeiteinsparung auch mit geringeren Kosten verbunden ist. Aufgrund der beschleunigten Selektion bietet der ORFV-Vektor nun auch exzellente Voraussetzungen zur Generierung von Impfstoffen die eine schnelle Anpassung und/oder Herstellung voraussetzen, wie bspw. saisonale Impfstoffe (z.B. Influenzavirusimpfstoff) oder individualisierter Impfstoffe (z.B. Tumorigenimpfstoff). Ein weiterer Vorteil ist, dass das MACS-System gut etabliert und benutzerfreundlich ist und daher wenig technische Expertise erfordert. Das beschriebene Selektionsprinzip ist nicht nur auf das ORFV beschränkt, sondern könnte auch die Herstellung anderer (viraler) Vektoren erleichtern und beschleunigen. Weiterhin kann das Selektionssystem dazu genutzt werden, um neue Rekombinanten, die ein oberflächenassoziiertes Antigen exprimieren, mittels der Verwendung spezifischer MACS-Beads positiv zu selektieren. Die Möglichkeit negative und positive Selektion je nach Bedarf zu kombinieren, stellt eine weitere erfolgsversprechende Option dar.

7 Literatur

- Abdussalam, M., and Cosslett, V. E. (1957). Contagious pustular dermatitis virus. I. Studies on morphology. *J Comp Pathol* **67**(2), 145-56.
- Amann, R., Rohde, J., Wulle, U., Conlee, D., Raue, R., Martinon, O., and Rziha, H. J. (2013). A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J Virol* **87**(3), 1618-30.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Holzer, G., Langmann, T., Falkner, F. G., and Dorner, F. (1996). Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes. *Gene* **177**(1-2), 43-6.
- Antonis, A. F., van der Most, R. G., Suezer, Y., Stockhofe-Zurwieden, N., Daus, F., Sutter, G., and Schrijver, R. S. (2007). Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge. *Vaccine* **25**(25), 4818-27.
- Ara, M., Zaballos, P., Sanchez, M., Querol, I., Zubiri, M. L., Simal, E., and Horndler, C. (2008). Giant and recurrent orf virus infection in a renal transplant recipient treated with imiquimod. *J Am Acad Dermatol* **58**(2 Suppl), S39-40.
- Aspden, K., van Dijk, A. A., Bingham, J., Cox, D., Passmore, J. A., and Williamson, A. L. (2002). Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle. *Vaccine* **20**(21-22), 2693-701.
- Aubert, M. F., Masson, E., Artois, M., and Barrat, J. (1994). Oral wildlife rabies vaccination field trials in Europe, with recent emphasis on France. *Curr Top Microbiol Immunol* **187**, 219-43.
- Baroudy, B. M., and Moss, B. (1982). Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over. *Nucleic Acids Res* **10**(18), 5673-9.
- Baroudy, B. M., Venkatesan, S., and Moss, B. (1982). Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* **28**(2), 315-24.
- Berthoud, T. K., Hamill, M., Lillie, P. J., Hwenda, L., Collins, K. A., Ewer, K. J., Milicic, A., Poyntz, H. C., Lambe, T., Fletcher, H. A., Hill, A. V., and Gilbert, S. C. (2011). Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1. *Clin Infect Dis* **52**(1), 1-7.
- Bett, A. J., Prevec, L., and Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**(10), 5911-21.
- Bodewes, R., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2010). Targets for the induction of protective immunity against influenza A viruses. *Viruses* **2**(1), 166-88.
- Bommakanti, G., Citron, M. P., Hepler, R. W., Callahan, C., Heidecker, G. J., Najar, T. A., Lu, X., Joyce, J. G., Shiver, J. W., Casimiro, D. R., ter Meulen, J., Liang, X., and Varadarajan, R. (2010). Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(31), 13701-6.
- Bouvier, N. M., and Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26** Suppl 4, D49-53.
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology* **84**, 2293-2303.
- Brun, A., Albina, E., Barret, T., Chapman, D. A., Czub, M., Dixon, L. K., Keil, G. M., Klonjowski, B., Le Potier, M. F., Libeau, G., Ortego, J., Richardson, J., and Takamatsu, H. H. (2008). Antigen delivery

- systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* **26**(51), 6508-28.
- Buller, R. M., and Palumbo, G. J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* **55**(1), 80-122.
- Büttner, M., and Rziha, H. J. (2002). Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**(1), 7-16.
- Carroll, M. W., and Moss, B. (1995). E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques* **19**(3), 352-4, 356.
- Castellino, F., Galli, G., Del Giudice, G., and Rappuoli, R. (2009). Generating memory with vaccination. *Eur J Immunol* **39**(8), 2100-5.
- Cenna, J., Hunter, M., Tan, G. S., Papaneri, A. B., Ribka, E. P., Schnell, M. J., Marx, P. A., and McGettigan, J. P. (2009). Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis* **200**(8), 1251-60.
- Chan, P. K. (2002). Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* **34 Suppl 2**, S58-64.
- Chandrasekaran, A., Srinivasan, A., Raman, R., Viswanathan, K., Raguram, S., Tumpey, T. M., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2008). Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol* **26**(1), 107-13.
- Chen, J. R., Ma, C., and Wong, C. H. (2011). Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza. *Trends Biotechnol* **29**(9), 426-34.
- Condit, R. C., Moussatche, N., and Traktman, P. (2006). In a nutshell: Structure and assembly of the vaccinia virion. *Advances in Virus Research, Vol 66* **66**, 31-+.
- Cottone, R., Buttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E., and Rziha, H. J. (1998). Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res* **56**(1), 53-67.
- Cox, J. H., Dietzschold, B., and Schneider, L. G. (1977). Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun* **16**(3), 754-9.
- Cunningham, C., Barnard, S., Blackbourn, D. J., and Davison, A. J. (2003). Transcription mapping of human herpesvirus 8 genes encoding viral interferon regulatory factors. *J Gen Virol* **84**(Pt 6), 1471-83.
- Davison, A. J., and Moss, B. (1989). Structure of vaccinia virus early promoters. *J Mol Biol* **210**(4), 749-69.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., Piccone, M. E., Kutish, G. F., and Rock, D. L. (2004). Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol* **78**(1), 168-77.
- Dietzschold, B., Schnell, M., and Koprowski, H. (2005). Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol* **292**, 45-56.
- Dietzschold, B., Tollis, M., Rupprecht, C. E., Celis, E., and Koprowski, H. (1987). Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: cross-protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. *J Infect Dis* **156**(5), 815-22.
- Doherty, P. C., Turner, S. J., Webby, R. G., and Thomas, P. G. (2006). Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol* **7**(5), 449-55.
- Dominguez, J., Lorenzo, M. M., and Blasco, R. (1998). Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *J Immunol Methods* **220**(1-2), 115-21.
- Dory, D., Fischer, T., Beven, V., Cariolet, R., Rziha, H. J., and Jestin, A. (2006). Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). *Vaccine* **24**(37-39), 6256-63.
- Dougan, M., and Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* **27**, 83-117.
- Draper, S. J., and Heeney, J. L. (2010). Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol* **8**(1), 62-73.

- Drexler I, S. C., Sutter G (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Current Opinion in Biotechnology* **15(6):506-512**.
- Earl, P. L., Cotter, C., Moss, B., VanCott, T., Currier, J., Eller, L. A., McCutchan, F., Birx, D. L., Michael, N. L., Marovich, M. A., Robb, M., and Cox, J. H. (2009). Design and evaluation of multi-gene, multi-clade HIV-1 MVA vaccines. *Vaccine* **27(42)**, 5885-95.
- Ertl, H. C. (2009). Novel vaccines to human rabies. *PLoS Negl Trop Dis* **3(9)**, e515.
- Esposito, J. J., Knight, J. C., Shaddock, J. H., Novembre, F. J., and Baer, G. M. (1988). Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* **165(1)**, 313-6.
- Faber, M., Li, J., Kean, R. B., Hooper, D. C., Alugupalli, K. R., and Dietzschold, B. (2009). Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(27)**, 11300-5.
- Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N., and Saalmuller, A. (2000). Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol* **74(17)**, 7943-51.
- Falkner, F. G., and Moss, B. (1990). Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* **64(6)**, 3108-11.
- Fischer, T., Planz, O., Stitz, L., and Rziha, H. J. (2003). Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *J Virol* **77(17)**, 9312-23.
- Foley, H. D., McGettigan, J. P., Siler, C. A., Dietzschold, B., and Schnell, M. J. (2000). A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(26)**, 14680-5.
- Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., and Osterhaus, A. D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* **79(5)**, 2814-22.
- Friebe, A., Siegling, A., Friederichs, S., Volk, H. D., and Weber, O. (2004). Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol* **78(17)**, 9400-11.
- Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A., and Klimov, A. (2006). Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* **344(2)**, 432-8.
- Garcia-Arriaza, J., Cepeda, V., Hallengard, D., Sorzano, C. O., Kummerer, B. M., Liljestrom, P., and Esteban, M. (2014). A Novel Poxvirus-based Vaccine (MVA-CHIKV) is Highly Immunogenic and Protects Mice against Chikungunya Infection. *J Virol*.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C. A., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. A., Clark, P. A., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I., and Cox, N. J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325(5937)**, 197-201.
- Gatherer, D. (2009). The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* **45(3)**, 174-8.
- Ge, J., Wang, X., Tao, L., Wen, Z., Feng, N., Yang, S., Xia, X., Yang, C., Chen, H., and Bu, Z. (2011). Newcastle disease virus-vectored rabies vaccine is safe, highly immunogenic, and provides long-lasting protection in dogs and cats. *J Virol* **85(16)**, 8241-52.

- Gherardi, M. M., and Esteban, M. (2005). Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol* **86**(Pt 11), 2925-36.
- Goldman, B., and DeFrancesco, L. (2009). The cancer vaccine roller coaster. *Nat Biotechnol* **27**(2), 129-39.
- Gomez, C. E., Perdiguero, B., Cepeda, M. V., Mingorance, L., Garcia-Arriaza, J., Vandermeeren, A., Sorzano, C. O., and Esteban, M. (2013). High, broad, polyfunctional, and durable T cell immune responses induced in mice by a novel hepatitis C virus (HCV) vaccine candidate (MVA-HCV) based on modified vaccinia virus Ankara expressing the nearly full-length HCV genome. *J Virol* **87**(13), 7282-300.
- Guo, H., Santiago, F., Lambert, K., Takimoto, T., and Topham, D. J. (2011). T cell-mediated protection against lethal 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection in a mouse model. *J Virol* **85**(1), 448-55.
- Hai, R., Krammer, F., Tan, G. S., Pica, N., Eggink, D., Maamary, J., Margine, I., Albrecht, R. A., and Palese, P. (2012). Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes. *J Virol* **86**(10), 5774-81.
- Haig, D. M. (2006). Orf virus infection and host immunity. *Curr Opin Infect Dis* **19**(2), 127-31.
- Haig, D. M., Hutchinson, G., Thomson, J., Yirrell, D., and Reid, H. W. (1996). Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8+ T cells during orf virus reinfection. *J Gen Virol* **77** (Pt 5), 953-61.
- Haig, D. M., and Mercer, A. A. (1998). Ovine diseases. Orf. *Vet Res* **29**(3-4), 311-26.
- Hammond, J. M., Oke, P. G., and Coupar, B. E. (1997). A synthetic vaccinia virus promoter with enhanced early and late activity. *J Virol Methods* **66**(1), 135-8.
- Hausmann, J., Baur, K., Engelhardt, K. R., Fischer, T., Rziha, H. J., and Staeheli, P. (2005). Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *J Gen Virol* **86**(Pt 2), 399-403.
- Heiny, A. T., Miotto, O., Srinivasan, K. N., Khan, A. M., Zhang, G. L., Brusica, V., Tan, T. W., and August, J. T. (2007). Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One* **2**(11), e1190.
- Henkel, M., Planz, O., Fischer, T., Stitz, L., and Rziha, H. J. (2005). Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J Virol* **79**(1), 314-25.
- Herfst, S., Schrauwen, E. J., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V. J., Sorrell, E. M., Bestebroer, T. M., Burke, D. F., Smith, D. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D., and Fouchier, R. A. (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* **336**(6088), 1534-41.
- Hessel, A., Schwendinger, M., Holzer, G. W., Orlinger, K. K., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Zips, M. L., Crowe, B. A., Kreil, T. R., Ehrlich, H. J., Barrett, P. N., and Falkner, F. G. (2011). Vectors based on modified vaccinia Ankara expressing influenza H5N1 hemagglutinin induce substantial cross-clade protective immunity. *PLoS One* **6**(1), e16247.
- Hillaire, M. L., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2011). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 939860.
- Hoft, D. F., Brusica, V., and Sakala, I. G. (2011). Optimizing vaccine development. *Cell Microbiol* **13**(7), 934-42.
- Hu, R., Zhang, S., Fooks, A. R., Yuan, H., Liu, Y., Li, H., Tu, C., Xia, X., and Xiao, Y. (2006). Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microbes Infect* **8**(4), 1090-7.
- Hussain, K. A., and Burger, D. (1989). In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. *Vet Microbiol* **19**(1), 23-36.

- Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E. A., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* **486**(7403), 420-8.
- Jenkinson, D., Mc Ewan, P.E., Hutchison, G., Reid, H.W. (1992). The B and T cell responses to orf virus infection. *Vet.Dermatol.* **2**, 57-64.
- Kanesa-athan, N., Smucny, J. J., Hoke, C. H., Marks, D. H., Konishi, E., Kurane, I., Tang, D. B., Vaughn, D. W., Mason, P. W., and Shope, R. E. (2000). Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus--poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* **19**(4-5), 483-91.
- Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., and Lecocq, J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**(5990), 163-6.
- Kilbourne, E. D. (2006). Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* **12**(1), 9-14.
- Koff, W. C., Burton, D. R., Johnson, P. R., Walker, B. D., King, C. R., Nabel, G. J., Ahmed, R., Bhan, M. K., and Plotkin, S. A. (2013). Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* **340**(6136), 1232910.
- Koopmans, M., and de Jong, M. D. (2013). Avian influenza A H7N9 in Zhejiang, China. *Lancet* **381**(9881), 1882-3.
- Kuiken, T., Holmes, E. C., McCauley, J., Rimmelzwaan, G. F., Williams, C. S., and Grenfell, B. T. (2006). Host species barriers to influenza virus infections. *Science* **312**(5772), 394-7.
- Kundig, T. M., Kalberer, C. P., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). Vaccination with two different vaccinia recombinant viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. *Vaccine* **11**(11), 1154-8.
- Laddy, D. J., Yan, J., Kutzler, M., Kobasa, D., Kobinger, G. P., Khan, A. S., Greenhouse, J., Sardesai, N. Y., Draghia-Akli, R., and Weiner, D. B. (2008). Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS One* **3**(6), e2517.
- Lai, L., Kwa, S., Kozlowski, P. A., Montefiori, D. C., Ferrari, G., Johnson, W. E., Hirsch, V., Villinger, F., Chennareddi, L., Earl, P. L., Moss, B., Amara, R. R., and Robinson, H. L. (2011). Prevention of infection by a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor co-expressing DNA/modified vaccinia Ankara simian immunodeficiency virus vaccine. *J Infect Dis* **204**(1), 164-73.
- Laidlaw, B. J., Decman, V., Ali, M. A., Abt, M. C., Wolf, A. I., Monticelli, L. A., Mozdzanowska, K., Angelosanto, J. M., Artis, D., Erikson, J., and Wherry, E. J. (2013). Cooperativity between CD8+ T cells, non-neutralizing antibodies, and alveolar macrophages is important for heterosubtypic influenza virus immunity. *PLoS Pathog* **9**(3), e1003207.
- Lambert, L. C., and Fauci, A. S. (2010). Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* **363**(21), 2036-44.
- LaMere, M. W., Lam, H. T., Moquin, A., Haynes, L., Lund, F. E., Randall, T. D., and Kaminski, D. A. (2011). Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus. *J Immunol* **186**(7), 4331-9.
- Larocca, C., and Schlom, J. (2011). Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. *Cancer J* **17**(5), 359-71.
- Lear, A., Hutchison, G., Reid, H., Norval, M., Haig, D.M. (1996). Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infection. *Eur.J.Derm.* **6**, 135-140.
- Lembo, T., Hampson, K., Kaare, M. T., Ernest, E., Knobel, D., Kazwala, R. R., Haydon, D. T., and Cleaveland, S. (2010). The feasibility of canine rabies elimination in Africa: dispelling doubts with data. *PLoS Negl Trop Dis* **4**(2), e626.

- Li, J., Faber, M., Papaneri, A., Faber, M. L., McGettigan, J. P., Schnell, M. J., and Dietzschold, B. (2006). A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. *Virology* **356**(1-2), 147-54.
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Estoepangestie, A. T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N. T., Webby, R. J., Poon, L. L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G., and Peiris, J. S. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**(6996), 209-13.
- Li, Q., Sun, X., Li, Z., Liu, Y., Vavricka, C. J., Qi, J., and Gao, G. F. (2012). Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(46), 18897-902.
- Li, Q., Zhou, L., Zhou, M., Chen, Z., Li, F., Wu, H., Xiang, N., Chen, E., Tang, F., Wang, D., Meng, L., Hong, Z., Tu, W., Cao, Y., Li, L., Ding, F., Liu, B., Wang, M., Xie, R., Gao, R., Li, X., Bai, T., Zou, S., He, J., Hu, J., Xu, Y., Chai, C., Wang, S., Gao, Y., Jin, L., Zhang, Y., Luo, H., Yu, H., Gao, L., Pang, X., Liu, G., Shu, Y., Yang, W., Uyeki, T. M., Wang, Y., Wu, F., and Feng, Z. (2013). Preliminary Report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) Outbreak in China. *N Engl J Med*.
- Lillie, P. J., Berthoud, T. K., Powell, T. J., Lambe, T., Mullarkey, C., Spencer, A. J., Hamill, M., Peng, Y., Blais, M. E., Duncan, C. J., Sheehy, S. H., Havelock, T., Faust, S. N., Williams, R. L., Gilbert, A., Oxford, J., Dong, T., Hill, A. V., and Gilbert, S. C. (2012). Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans. *Clin Infect Dis* **55**(1), 19-25.
- Liniger, M., Zuniga, A., and Naim, H. Y. (2007). Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines* **6**(2), 255-66.
- Liu, M. A. (2010). Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity* **33**(4), 504-15.
- Lodmell, D. L., and Ewalt, L. C. (2000). Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. *Vaccine* **18**(22), 2394-8.
- Lorenzo, M. M., Galindo, I., and Blasco, R. (2004). Construction and isolation of recombinant vaccinia virus using genetic markers. *Methods Mol Biol* **269**, 15-30.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A., and Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* **68**(1), 84-92.
- Macfarlan, R. I., Dietzschold, B., and Koprowski, H. (1986). Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol Immunol* **23**(7), 733-41.
- Mackett, M., Smith, G. L., and Moss, B. (1984). General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* **49**(3), 857-64.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13), 4620-4.
- Mayr, A., Büttner, M. (1990). "Milker's node virus." Virus infections in ruminants (Z. D. u. B. Morein, Ed.) Elsevier Science Publishers, Amerstam, The Netherlands.
- Mayr, A., Herlyn, M., Mahnel, H., Danco, A., Zach, A., Bostedt, H. (1981). Bekämpfung der ecthyma contagiosum (Pustuladermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff. *Zentralblatt Veterinärmedizin B*. **28**, 535-552.
- Mayrhofer, J., Coulibaly, S., Hessel, A., Holzer, G. W., Schwendinger, M., Bruhl, P., Gerencer, M., Crowe, B. A., Shuo, S., Hong, W., Tan, Y. J., Dietrich, B., Sabarth, N., Savidis-Dacho, H., Kistner, O., Barrett, P. N., and Falkner, F. G. (2009). Nonreplicating vaccinia virus vectors expressing the H5 influenza virus hemagglutinin produced in modified Vero cells induce robust protection. *J Virol* **83**(10), 5192-203.

- McCoy, K., Tatsis, N., Koriath-Schmitz, B., Lasaro, M. O., Hensley, S. E., Lin, S. W., Li, Y., Giles-Davis, W., Cun, A., Zhou, D., Xiang, Z., Letvin, N. L., and Ertl, H. C. (2007). Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. *J Virol* **81**(12), 6594-604.
- McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**(3), 201-13.
- McGuire, M. J., Johnston, S. A., and Sykes, K. F. (2012). Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. *Proteome Sci* **10**(1), 4.
- McInnes, C. J., Wood, A. R., Nettleton, P. E., and Gilray, J. A. (2001). Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication. *Virus Genes* **22**(2), 141-50.
- McKeever, D. J., Jenkinson, D. M., Hutchison, G., and Reid, H. W. (1988). Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol* **99**(3), 317-28.
- Medina, R. A., and Garcia-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* **9**(8), 590-603.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**(7378), 480-9.
- Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P. A., Mayr, A., and Wyler, R. (1979). Physical characterization of a stomatitis papulosa virus genome: a cleavage map for the restriction endonucleases HindIII and EcoRI. *Arch Virol* **59**(1-2), 145-56.
- Mercer, A., Fleming, S., Robinson, A., Nettleton, P., and Reid, H. (1997). Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans. *Arch Virol Suppl* **13**, 25-34.
- Mercer, A. A., Lyttle, D. J., Whelan, E. M., Fleming, S. B., and Sullivan, J. T. (1995). The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses. *Virology* **212**(2), 698-704.
- Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* **72** (Pt 5), 1031-8.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., and Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**(2), 363-74.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**(2), 231-8.
- Monath, T. P., Soike, K., Levenbook, I., Zhang, Z. X., Arroyo, J., Delagrave, S., Myers, G., Barrett, A. D., Shope, R. E., Ratterree, M., Chambers, T. J., and Guirakhoo, F. (1999). Recombinant, chimaeric live, attenuated vaccine (ChimeriVax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates. *Vaccine* **17**(15-16), 1869-82.
- Moore, S. M., Wilkerson, M. J., Davis, R. D., Wyatt, C. R., and Briggs, D. J. (2006). Detection of cellular immunity to rabies antigens in human vaccinees. *J Clin Immunol* **26**(6), 533-45.
- Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11341-8.
- Moss, B. (2001). Poxviridae: The viruses and their replication. In "Fields Virology" (e. Fourth Edition (D.M. Knipe and P.M. Howley, Ed.), pp. pp 2849-2883. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Moss, B. (2011). Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev* **239**(1), 8-26.
- Nabel, G. J. (2013). Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med* **368**(6), 551-60.

- Nabel, G. J., and Fauci, A. S. (2010). Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nat Med* **16**(12), 1389-91.
- Ning, Z., Peng, Y., Hao, W., Duan, C., Rock, D. L., and Luo, S. (2011). Generation of recombinant Orf virus using an enhanced green fluorescent protein reporter gene as a selectable marker. *BMC Vet Res* **7**, 80.
- Palese, S. M. (2007). "Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication." Fields Virology (H. P. Knipe DM, Griffin DE, et al., eds., Ed.) Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Parvin, J. D., Moscona, A., Pan, W. T., Leider, J. M., and Palese, P. (1986). Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* **59**(2), 377-83.
- Peiris, J. S., de Jong, M. D., and Guan, Y. (2007). Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* **20**(2), 243-67.
- Perry, L. L., and Lodmell, D. L. (1991). Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus. *J Virol* **65**(7), 3429-34.
- Pica, N., and Palese, P. (2013). Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu Rev Med* **64**, 189-202.
- Piccini A, P. M., Paoletti E (1987). Vaccinia virus as an expression vector. *Methods Enzymol* **153**:545–563.
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat Med* **11**(4 Suppl), S5-11.
- Plotkin, S. A., and Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol* **9**(12), 889-93.
- Poon, L. L., Leung, Y. H., Nicholls, J. M., Perera, P. Y., Lichy, J. H., Yamamoto, M., Waldmann, T. A., Peiris, J. S., and Perera, L. P. (2009). Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice. *J Immunol* **182**(5), 3063-71.
- Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A., and Bishop, D. H. (1989). Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology* **173**(2), 390-9.
- Pulendran, B., and Ahmed, R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**(4), 849-63.
- Pulendran, B., and Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* **12**(6), 509-17.
- Rappuoli, R., and Aderem, A. (2011). A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature* **473**(7348), 463-9.
- Rimmelzwaan, G. F., Kreijtz, J. H., Bodewes, R., Fouchier, R. A., and Osterhaus, A. D. (2009). Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine* **27**(45), 6363-5.
- Rintoul, J. L., Wang, J., Gammon, D. B., van Buuren, N. J., Garson, K., Jardine, K., Barry, M., Evans, D. H., and Bell, J. C. (2011). A selectable and excisable marker system for the rapid creation of recombinant poxviruses. *PLoS One* **6**(9), e24643.
- Robinson, A. J., Ellis, G., and Balassu, T. (1982). The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch Virol* **71**(1), 43-55.
- Rohde, J., Amann, R., and Rziha, H. J. (2013). New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus. *PLoS One* **8**(12), e83802.
- Rohde, J., Schirrmeier, H., Granzow, H., and Rziha, H. J. (2011). A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Vaccine* **29**(49), 9256-64.
- Rollier, C. S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M. G., Ewer, K., and Hill, A. V. (2011). Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol* **23**(3), 377-82.
- Rueckert, C., and Guzman, C. A. (2012). Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog* **8**(11), e1003001.

- Rupprecht, C. E., Blass, L., Smith, K., Orciari, L. A., Niezgoda, M., Whitfield, S. G., Gibbons, R. V., Guerra, M., and Hanlon, C. A. (2001). Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* **345**(8), 582-6.
- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., Blanton, J., Manangan, J., Morrill, P., Murphy, S., Niezgoda, M., Orciari, L. A., Schumacher, C. L., and Dietzschold, B. (2005). Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. *Virus Res* **111**(1), 101-5.
- Rupprecht, C. E., Wiktor, T. J., Johnston, D. H., Hamir, A. N., Dietzschold, B., Wunner, W. H., Glickman, L. T., and Koprowski, H. (1986). Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(20), 7947-50.
- Russell, C. A., Fonville, J. M., Brown, A. E., Burke, D. F., Smith, D. L., James, S. L., Herfst, S., van Boheemen, S., Linster, M., Schrauwen, E. J., Katzelnick, L., Mosterin, A., Kuiken, T., Maher, E., Neumann, G., Osterhaus, A. D., Kawaoka, Y., Fouchier, R. A., and Smith, D. J. (2012). The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science* **336**(6088), 1541-7.
- Rziha, B. (unpublished data).
- Rziha, H., Henkel, M., Cottone, R., Bauer, B., Auge, U., Gotz, F., Pfaff, E., Rottgen, M., Dehio, C., and Büttner, M. (2000). Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J Biotechnol* **83**(1-2), 137-45.
- Rziha, H. J., Henkel, M., Cottone, R., Meyer, M., Dehio, C., and Büttner, M. (1999). Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *J Biotechnol* **73**(2-3), 235-42.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., and Ahmed, R. (2010). From vaccines to memory and back. *Immunity* **33**(4), 451-63.
- Savory, L. J., Stacker, S. A., Fleming, S. B., Niven, B. E., and Mercer, A. A. (2000). Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J Virol* **74**(22), 10699-706.
- Saxena, S., Dahiya, S. S., Sonwane, A. A., Patel, C. L., Saini, M., Rai, A., and Gupta, P. K. (2008). A sindbis virus replicon-based DNA vaccine encoding the rabies virus glycoprotein elicits immune responses and complete protection in mice from lethal challenge. *Vaccine* **26**(51), 6592-601.
- Scheiflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F. G. (1998). Transient marker stabilisation: a general procedure to construct marker-free recombinant vaccinia virus. *Arch Virol* **143**(3), 467-74.
- Scheiflinger, F., Falkner, F. G., and Dorner, F. (1996). Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain. *Arch Virol* **141**(3-4), 663-9.
- Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C., and Papaneri, A. (2010). The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol* **8**(1), 51-61.
- Schutze, N., Raue, R., Büttner, M., Kohler, G., McInnes, C. J., and Alber, G. (2010). Specific antibodies induced by inactivated parapoxvirus ovis potentially enhance oxidative burst in canine blood polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Microbiol* **140**(1-2), 81-91.
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., and McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**, 377-423.
- Sette, A., and Rappuoli, R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* **33**(4), 530-41.
- Sharpe, S., Polyanskaya, N., Dennis, M., Sutter, G., Hanke, T., Erfle, V., Hirsch, V., and Cranage, M. (2001). Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of pre-existing anti-vector immunity. *J Gen Virol* **82**(Pt 9), 2215-23.

- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-69.
- Spehner, D., De Carlo, S., Drillien, R., Weiland, F., Mildner, K., Hanau, D., and Rziha, H. J. (2004). Appearance of the bona fide spiral tubule of ORF virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein. *J Virol* **78**(15), 8085-93.
- Srinivasan, A., Viswanathan, K., Raman, R., Chandrasekaran, A., Raguram, S., Tumpey, T. M., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2008). Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8), 2800-5.
- Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V., and Sutter, G. (2000). Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* **28**(6), 1137-42, 1144-6, 1148.
- Staib, C., Lowel, M., Erfle, V., and Sutter, G. (2003). Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* **34**(4), 694-6, 698, 700.
- Stittelaar, K. J., Lacombe, V., van Lavieren, R., van Amerongen, G., Simon, J., Cozette, V., Swayne, D. E., Poulet, H., and Osterhaus, A. D. (2010). Cross-clade immunity in cats vaccinated with a canarypox-vectored avian influenza vaccine. *Vaccine* **28**(31), 4970-6.
- Sutter, G., and Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22), 10847-51.
- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., Jones, S. C., Kamperschroer, C., Lee, W. H., McKinstry, K. K., Roman, E., Strutt, T., and Weng, N. P. (2006). CD4+ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4+ T cells in protective immunity to influenza. *Immunol Rev* **211**, 8-22.
- Swain, S. L., McKinstry, K. K., and Strutt, T. M. (2012). Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**(2), 136-48.
- Taubenberger, J. K., and Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* **12**(1), 15-22.
- Taylor, J., Trimarchi, C., Weinberg, R., Languet, B., Guillemin, F., Desmettre, P., and Paoletti, E. (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* **9**(3), 190-3.
- Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P., and Paoletti, E. (1988). Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**(6), 497-503.
- Teijaro, J. R., Verhoeven, D., Page, C. A., Turner, D., and Farber, D. L. (2010). Memory CD4 T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent mechanisms. *J Virol* **84**(18), 9217-26.
- To, K. K., Tsang, A. K., Chan, J. F., Cheng, V. C., Chen, H., and Yuen, K. Y. (2014). Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8) - Cause for concern? *J Infect*.
- Tong, S., Li, Y., Rivailier, P., Conrardy, C., Castillo, D. A., Chen, L. M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K. A., Cox, N. J., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E., and Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11), 4269-74.
- Tumpey, T. M., and Belser, J. A. (2009). Resurrected pandemic influenza viruses. *Annu Rev Microbiol* **63**, 79-98.
- Turner, P. C., and Moyer, R. W. (1990). The molecular pathogenesis of poxviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **163**, 125-51.
- Ullas, P. (2012). Rabies DNA vaccines: current status and future. *World J. Vaccines* **2**:36-45.
- Ulmer, J. B., Fu, T. M., Deck, R. R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., Liu, X., Wang, S., Liu, M. A., Donnelly, J. J., and Caulfield, M. J. (1998). Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol* **72**(7), 5648-53.

- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., and Kuiken, T. (2006). H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* **312**(5772), 399.
- van Rooij, E. M., Rijsewijk, F. A., Moonen-Leusen, H. W., Bianchi, A. T., and Rziha, H. J. (2010). Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *Vaccine* **28**(7), 1808-13.
- Voigt, H., Merant, C., Wienhold, D., Braun, A., Hutet, E., Le Potier, M. F., Saalmuller, A., Pfaff, E., and Buttner, M. (2007). Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* **25**(31), 5915-26.
- Wang, H. J., Li, X. F., Ye, Q., Li, S. H., Deng, Y. Q., Zhao, H., Xu, Y. P., Ma, J., Qin, E. D., and Qin, C. F. (2014). Recombinant chimeric Japanese encephalitis virus/tick-borne encephalitis virus is attenuated and protective in mice. *Vaccine*.
- Wang, Z., La Rosa, C., Lacey, S. F., Maas, R., Mekhoubad, S., Britt, W. J., and Diamond, D. J. (2006). Attenuated poxvirus expressing three immunodominant CMV antigens as a vaccine strategy for CMV infection. *J Clin Virol* **35**(3), 324-31.
- Wen, Y., Wang, H., Wu, H., Yang, F., Tripp, R. A., Hogan, R. J., and Fu, Z. F. (2011). Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J Virol* **85**(4), 1634-44.
- Weyer, J., Rupprecht, C. E., Mans, J., Viljoen, G. J., and Nel, L. H. (2007). Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* **25**(21), 4213-22.
- Weyer, J., Rupprecht, C. E., and Nel, L. H. (2009). Poxvirus-vectored vaccines for rabies--a review. *Vaccine* **27**(51), 7198-201.
- Whitmire, J. K. (2011). Induction and function of virus-specific CD4+ T cell responses. *Virology* **411**(2), 216-28.
- (2004). Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. WHO, W. H. O.
- WHO, W. H. O. (2009). Influenza (Seasonal). *Fact sheet N°211*.
- WHO, W. H. O. (2013). RABIES Factsheet No.99
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>.
- WHO, W. H. O. (2014a). Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2014.
http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20140124CumulativeNumberH5N1cases.pdf?ua=1.
- WHO, W. H. O. (2014b). Epidemiologie. Canine rabies. *Rabies - Bulletin - Europe*.
- Wiktor, T. J., Gyorgy, E., Schlumberger, D., Sokol, F., and Koprowski, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol* **110**(1), 269-76.
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., Mackett, M., and et al. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(22), 7194-8.
- Wise, L. M., Veikkola, T., Mercer, A. A., Savory, L. J., Fleming, S. B., Caesar, C., Vitali, A., Makinen, T., Alitalo, K., and Stacker, S. A. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6), 3071-6.
- Wong, Y. C., Lin, L. C., Melo-Silva, C. R., Smith, S. A., and Tschärke, D. C. (2011). Engineering recombinant poxviruses using a compact GFP-blasticidin resistance fusion gene for selection. *J Virol Methods* **171**(1), 295-8.
- Wright PF, N. G., Kawaoka Y (2007). "Orthomyxoviruses." *Fields Virology* (H. P. Knipe DM, Griffin DE, et al., eds. , Ed.) Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Wyatt, L. S., Earl, P. L., Xiao, W., Americo, J. L., Cotter, C. A., Vogt, J., and Moss, B. (2009). Elucidating and minimizing the loss by recombinant vaccinia virus of human immunodeficiency virus gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection. *J Virol* **83**(14), 7176-84.
- Xu, K., Ling, Z. Y., Sun, L., Xu, Y., Bian, C., He, Y., Lu, W., Chen, Z., and Sun, B. (2011). Broad humoral and cellular immunity elicited by a bivalent DNA vaccine encoding HA and NP genes from an H5N1 virus. *Viral Immunol* **24**(1), 45-56.
- Yuan, Z., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, F., Fooks, A. R., Li, Q., and Hu, R. (2008). A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* **26**(10), 1314-21.
- Zhao, L., Toriumi, H., Wang, H., Kuang, Y., Guo, X., Morimoto, K., and Fu, Z. F. (2010). Expression of MIP-1alpha (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J Virol* **84**(18), 9642-8.
- Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B., and Chen, P. (2007). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* **35**(3), 585-95.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ralf Ernst Amann

Geburtstag: 19.12.1982

Staatsangehörigkeit: deutsch

Email-Adresse: Ralf.Amann@fli.bund.de
Ralf.Amann@gmx.de

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit Juni 2012: Projektleiter „Individualisierte Tumorigenität mittels eines viralen Vektors“ (Förderung durch BMBF, GO-Bio Innovationsakademie)

seit 2012: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) an der Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie in Kooperation mit dem Friedrich-Loeffler-Institut

2008-2011: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) bei Dr. Rziha am Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Immunologie, Tübingen

Hochschulausbildung

- 2002-2008: Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen, und der Universität Oslo (Universitet i Oslo) Abschluss Diplom Biologe
Schwerpunkte: Humangenetik, Immunologie, organische Chemie
- 2007-2008: Diplomarbeit bei Prof. Dr. Stitz am Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Immunologie, Tübingen

Schulische Ausbildung

- 1993-2002: Martin Heidegger Gymnasium in Meßkirch, Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Förderungen, Preise und Ehrungen:

- Sieger Sondierungsphase Innovationsakademie Biotechnologie, GO-Bio (Feb. 2012)
- Sieger Machbarkeitsphase Innovationsakademie Biotechnologie, GO-Bio (März 2013)
- Preisträger Science2Start-Wettbewerb (BioRegio STERN, Jul. 2013)
- Sieger Innovation Grants im Rahmen der Exzellenzinitiative (Universität Tübingen, Dez. 2013)

Wissenschaftliche Fachvorträge

21st Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology); Freiburg, Deutschland (März 2011): „A new ORFV-based highly efficient Rabies vaccine for Pre- and Post-Exposure Propylaxis“

Modern veterinary Vaccines & Adjuvants (MVVA); Budapest, Ungarn (Nov. 2010): „A new ORFV-based Rabies Vaccine: Characterization of the protective immune response in mice“

Innovationsakademie Biotechnologie (GO-Bio); Berlin, Deutschland (Nov. 2011, Okt. 2012): „Maßgeschneiderte präventive und therapeutische Impfstoffe“

XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference; Salamanca, Spain (Juni 2012): “A new Rabies vaccine based on a recombinant ORF Virus expressing the Rabies virus Glycoprotein”

Wissenschaftliche Publikationen

Amann R. et al., A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein. *J. Virol.* 2013, 87(3):1618-1630.

Rohde J., **Amann R.**, H.J.Rziha, New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 HA Protects Mice Against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus, *Plos One* 2013, 8(12): e83802

9 Danksagung

Da dieses Werk nicht ohne die Hilfe und Unterstützung einer ganzen Reihe Personen zustande gekommen wäre, will ich hier die Gelegenheit nutzen, um mich bei einigen von ihnen aufrichtig zu bedanken.

Dabei gilt mein größter Dank meinem Doktorvater Hanns-Joachim Rziha. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die Möglichkeit auch meine eigenen Ideen und Gedanken in diese Arbeit miteinzubringen und hinterherzujagen, die zahlreichen Tipps, Hilfestellungen, Ratschläge und exzellente Betreuung, aber auch ganz besonders für das weniger Selbstverständliche, wie die intensive Unterstützung bei meinen Förderanträgen oder das du mir auch gerade in schwierigen Phasen immer den Rücken gestärkt hast.

Auch bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre bedanken. Ganz besonderen Dank gilt hierbei Jörg Rohde der mich in die Welt der ORFV-Arbeiten eingeführt hat und an Berthilde Bauer und Karin Kegreiß für die exzellente technische Assistenz.

Herzlichen Dank auch an Hans-Georg Rammensee der sich bereit erklärt hat uns hier am Institut aufzunehmen und die Arbeit zu begutachten. Es macht einfach Spaß, von einem solch hervorragenden Vollblut-Wissenschaftler lernen zu können.

Auch bei Stefan Stevanovic möchte ich mich für die Begutachtung der Dissertation ganz herzlich bedanken.

Vielen lieben Dank auch an die zahlreichen anderen netten Kolleginnen und Kollegen des FLIs und allen Elchen für die tolle Zusammenarbeit, die Unterstützung und Hilfe, den Spaß an der Arbeit; einfach für Alles!

10 Publikationen

„ A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein“

Ralf Amann, Jörg Rohde, Ulrich Wulle, Douglas Conlee, Rudiger Raue, Olivier Martinon, and Hanns-Joachim Rziha, 2013, Journal of Virology 87(3): 1618-30

„ New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus“

Jörg Rohde, Ralf Amann, Hanns-Joachim Rziha, 2013, PLoS One 8(12): e83802

A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein

Ralf Amann,^{a*} Jörg Rohde,^{a*} Ulrich Wulle,^{a*} Douglas Conlee,^b Rudiger Raue,^c Olivier Martinon,^b Hanns-Joachim Rziha^{a*}

Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Immunology, Greifswald-Insel Riems, Germany^a; Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Michigan, USA^b; Pfizer Animal Health, Zaventem, Belgium^c

The present study describes the generation of a new Orf virus (ORFV) recombinant, D1701-V-RabG, expressing the rabies virus (RABV) glycoprotein that is correctly presented on the surface of infected cells without the need of replication or production of infectious recombinant virus. One single immunization with recombinant ORFV can stimulate high RABV-specific virus-neutralizing antibody (VNA) titers in mice, cats, and dogs, representing all nonpermissive hosts for the ORFV vector. The protective immune response against severe lethal challenge infection was analyzed in detail in mice using different dosages, numbers, and routes for immunization with the ORFV recombinant. Long-term levels of VNA could be elicited that remained greater than 0.5 IU per ml serum, indicative for the protective status. Single applications of higher doses (10⁷ PFU) can be sufficient to confer complete protection against intracranial (i.c.) challenge, whereas booster immunization was needed for protection by the application of lower dosages. Anamnestic immune responses were achieved by each of the seven tested routes of inoculation, including oral application. Finally, *in vivo* antibody-mediated depletion of CD4-positive and/or CD8-positive T cell subpopulations during immunization and/or challenge infection attested the importance of CD4 T cells for the induction of protective immunity by D1701-V-RabG. This report demonstrates another example of the potential of the ORFV vector and also indicates the capability of the new recombinant for vaccination of animals.

Rabies is a highly prevalent zoonotic disease and a public health threat worldwide, leading to 55,000 human deaths annually. Most of them occur in Asia and Africa and are primarily elicited by rabid domestic dogs or other canids (1). The majority of rabies cases is found in wild animals, like raccoons, skunks, bats, and foxes. The causative agent of rabies is the neurotropic *Rabies virus* (RABV) belonging to the genus *Lyssavirus* of *Rhabdoviridae*. After peripheral infection, RABV invades the central nervous system, resulting in progressive fatal encephalomyelitis in almost all cases (2). The single-stranded, negative-sense RNA genome of RABV encodes five structural proteins designated N (nucleoprotein), P (phosphoprotein), M (matrix protein), G (glycoprotein), and L (RNA-dependent RNA polymerase) (reviewed in reference 3). The glycoprotein, here referred to as RabG, represents the major antigen of RABV and is responsible mainly for the induction of protective immunity (4–7). RabG is expressed as a trimer transmembrane protein forming projections on the surface of RABV or of the infected cells and is the target for binding virus-neutralizing antibodies (VNA). Protection against rabies correlates with the presence of VNA, which persists for many years, and VNA titers greater than 0.5 IU per ml serum are accepted for protection. Accordingly, rabies can be considered a T-helper type 2 cell responsive disease, and the help of CD4-positive T cells to activate B cells is crucial for protection (8).

Controlling rabies mass vaccination of wildlife, and especially of dogs and cats, is considered to be the most effective strategy (1). To achieve that goal, various vaccines have been developed during the last years. However, there is still a need for the improvement of rabies vaccines, which ideally should combine attributes such as (i) effectiveness in all important target animals transmitting RABV, (ii) induction of long-lasting immunity after single administration, (iii) efficacy after oral application, (iv) innocuousness in all RABV-susceptible animals, (v) stability and convenient handling of the vaccine, and (vi) low costs. Available vaccines do not

comprise all those properties and, therefore, fail to successfully control rabies. For instance, vaccination with avirulent RABV strains almost completely eradicated vulpine rabies in Europe (9) or coyote and raccoon rabies in North America (10) but failed to protect dogs, skunks, and other animals by a single oral immunization (11). In addition, the risk of possible reversion to virulence cannot be completely excluded with these vaccines.

Since the recent introduction of “reverse genetics” technology (12, 13), new live attenuated RABV can be designed, for instance, by gene mutations (see reference 14), duplication or triplication of the RabG gene (15, 16), or simultaneous expression of inserted cytokine genes to stimulate the innate immune response (17, 18). Some of them are promising candidates of rabies vaccines due to their apathogenicity and improved immunogenicity in animal models. DNA vaccines have several advantages, such as stability, low production costs, and ease of construction (reviewed in reference 19). DNA-based rabies vaccines can induce adequate RABV-specific immune responses in small rodents when optimally formulated (20). However, multiple immunizations using high DNA doses are required to achieve modest immunity against RABV in mammals, which is accompanied by the risk of tolerance. In addition, most DNA vaccines need adjuvants to improve efficacy, which raises several safety concerns (21).

Received 11 September 2012 Accepted 12 November 2012

Published ahead of print 21 November 2012

Address correspondence to Hanns-Joachim Rziha, achim.rziha@fli.bund.de.

*Present address: Ralf Amann, Jörg Rohde, Ulrich Wulle, Hanns-Joachim Rziha, University Tübingen, Interfaculty Institute of Cell Biology, Department of Immunology, Tübingen, Germany.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.02470-12

Live recombinant vectors represent the most promising vaccine candidates, not only as rabies vaccines for companion animals. Various recombinant rabies vaccines have been generated using different viral vector systems, such as Newcastle disease virus (22), Sindbis virus (23), herpesvirus (24), adenovirus (for a review, see reference 14), or baculovirus (25). Moreover, numerous poxvirus-vectored vaccines expressing RabG have been constructed, as reviewed recently (26). Despite inducing excellent humoral and cellular immunity, tolerating the insertion of large foreign genes, and having a stable genome and technologies for the construction of recombinants that are well established, these vaccines also have certain weaknesses. The first licensed recombinant vaccinia virus (VACV) V-RG expressing RabG (27, 28) was successfully used for oral immunization of raccoons, red and gray foxes, and coyotes in North America and Western Europe (10, 29), but V-RG failed to induce complete protection in skunks (30) and dogs (11) by single oral administration. Moreover, V-RG has been associated with severe skin inflammation, at least in one case, and the possibility to cause systemic VACV infection in human has been reported (31). Another drawback of VACV-vectored vaccines, similar to adenovirus-vectored vaccines, represents preexisting or vaccination-induced vector immunity, which can inhibit uptake of the recombinant and prevent the generation of sufficient anti-RABV immunity or boosting anamnestic response (32). A safer, attenuated, and replication-deficient variant of VACV vector is represented by the modified vaccinia virus Ankara (MVA) strain. The RabG-expressing MVA recombinant, however, was found to be less immunogenic than V-RG and did not mediate complete protection against RABV, and dogs were not protected by oral administration (14, 33). Other poxviral vectors have been used to generate host-restricted recombinant live vaccines against rabies, such as raccoon poxvirus (34), canary poxvirus (35), fowl poxvirus (36), or capripoxvirus (37). Still, these vaccines have their limitations, particularly regarding efficacy restricted to certain species, safety concerns, and utility for pre- and postexposure vaccination.

Recently, we reported the successful use of the *Parapoxvirus* Orf virus (ORFV) as a novel virus vector system for expressing different foreign antigens. Its key benefits are the very restricted host range (sheep and goats), the skin tropism, and the absence of systemic virus spread even in immunocompromised individuals or after intravenous injection of high virus dose (38, 39). The short-term vector-specific immunity and the lack of serum antibodies efficiently neutralizing ORFV (38, 40) enable repeated immunizations with the same or with different ORFV recombinants. Unique immune-modulating properties of ORFV strongly stimulate the innate immunity (40–43) and rapidly generate foreign antigen-specific immune responses (44–47). The apathogenic, Vero cell culture-adapted ORFV strain D1701-V is used to generate recombinants by substituting the viral *vegf-e* gene with a foreign gene, which thereby removes an ORFV virulence gene and leads to further attenuation (38, 44, 48). D1701-V recombinants have been reported to mediate protective immunity against a number of different viral infections, such as rabbit hemorrhagic disease virus (49), classical swine fever (50), Borna disease virus (51), or pseudorabies virus (44, 52, 53).

The present study describes the generation of the ORFV recombinant D1701-V-RabG expressing the RABV glycoprotein and its successful use for mounting protective immunity against lethal RABV challenge infection of mice. Notably, even a single

immunization was sufficient to induce high RABV-specific VNA titers in mice, cats, and dogs by different routes of application. Finally, *in vivo* antibody-mediated depletion of CD4-positive and/or CD8-positive T cells of mice during immunization and challenge infection attested the importance of CD4-positive T cells for the induction of protective immunity by D1701-V-RabG. This report demonstrates the potential use of this new ORFV recombinant to vaccinate companion animals against rabies.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The ORFV recombinants were propagated, plaque purified, and titrated in Vero cells as described recently (44, 49). Rabies challenge virus standard strain CVS-11 (Friedrich-Loeffler-Institut, Germany) was titrated by fluorescence focus assay. ORFV gene expression was arrested in the early phase by cytosine arabinoside treatment (AraC; 40 µg/ml; Sigma, Germany).

Generation of D1701-V-RabG recombinant. The RabG gene of strain PV11 (accession no. AF233275) exhibiting 97 to 98% identity to various other RABV strains, including CVS, was chemically synthesized and provided as pUC plasmid (Blue Heron Biotech). The complete G gene was isolated as an EcoRI-BamHI DNA fragment (1,582 bp) by agarose gel electrophoresis and Qiaex II gel extraction (Qiagen, Germany) followed by ligation (fast ligation kit, Promega, Germany) into EcoRI-BamHI-digested plasmid pdV-Rec1 (44). The resulting transfer plasmid pdV-RabG was DNA sequenced to verify correct insertion of the RabG gene (data not shown). Using plasmid pdV-RabG (2 µg) for nucleofection (Nucleofector kit V; Lonza, Germany) of Vero cells infected with the LacZ gene-positive recombinant D1701-VrV with a multiplicity of infection (MOI) of 0.2, the new ORFV recombinant D1701-V-RabG was selected by plaque PCR screening and produced as described previously (49). The PCR primers were purchased from Metabion (Martinsried, Germany) with the nucleotide sequences for the LacZ gene as 5'-CGA TAC TGT CGT CGT CCC CTC AA-3' (forward) and 3'-TCA AGTCATCAC GCC GCTCAA C-5' (reverse), resulting in a 433-bp-sized amplicon, and for the RabG gene as 5'-GGA GTC TCT CGT TAT CAT ATC TC-3' (forward) and 3'-GCT TTA ACT CGT GGA ACA ACA TC-5' (reverse) to amplify a 508-bp fragment.

Antibodies. RabG-specific antibodies, polyclonal rabbit antiserum G154-3, G-specific antipeptide antiserum, and monoclonal antibody E559 were generously provided by K. K. Conzelmann (Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany) and by Stefan Finke (Friedrich-Loeffler-Institut, Germany).

IPMA. Successful expression of the inserted foreign gene was first assayed by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), an immunohistochemical staining of recombinant virus plaques titrated in Vero cells. After the appearance of virus plaques, the medium was aspirated and the cells were dried at room temperature (RT) for 10 min. Thereafter, cells were fixed with abs. methanol at 20°C for 15 min, washed twice with ice-cold 1% (vol/vol) fetal calf serum (FCS) in phosphate-buffered saline (PBS), blocked with PBS containing 10% (vol/vol) FCS for 90 min, and incubated for 60 min at RT with the RabG-specific monoclonal antibody E559 (diluted 1:200 in 1% FCS in PBS). After being washed 3 times with PBS-T (PBS containing 0.05% [vol/vol] Tween 20), a peroxidase-coupled anti-mouse secondary antibody (1:2,000; DIANOVA, Germany) was added and slowly agitated for 60 min at RT. After being thoroughly washed with PBS-T and PBS, substrate (Vector Nova Red; Vector Laboratories, Axxora, Germany) was added as recommended by the manufacturer until red-brown positive staining became visible.

Western blot analysis was performed as described previously (49). The RabG-specific rabbit antiserum G154-3 was used diluted 1:50,000, and the peroxidase-coupled anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Germany) was used in a 1:20,000 dilution. Detection by enhanced chemiluminescence (ECL) was accomplished with the substrate Immobilon Western horseradish peroxidase (HRP) (Millipore, Germany) and ECL X-ray films (Pierce, Fisher Scientific, Germany).

Immunofluorescence was performed as published recently (49). Intracellular staining was achieved by permeabilization with 0.2% (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 5 min at RT. The E559 monoclonal antibody (54) was diluted 1:1,000 and incubated for 1 h at 37°C followed by extensive washing in PBS. Secondary Alexa-555-coupled anti-mouse antibody (Fisher Scientific, Invitrogen, Germany) was diluted 1:1,000, and after 30 min at 37°C the slides were washed with PBS.

Actin staining was achieved with phalloidin CF-647 according to the instructions of the manufacturer (Biotium, Germany) followed by staining of the nucleus with 1 g/ml DAPI (4=,6-diamidin-2=-phenylindol-dihydrochlorid; Sigma-Aldrich, Germany) for 20 to 30 min at RT in the dark. Finally, slides were thoroughly washed and embedded in Mowiol-DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan; Carl Roth, Germany). Fluorescence images were recorded with an Axiovert 200 microscope using Axiovision software (Zeiss, Germany).

RABV-neutralizing antibody assay. VNA titers were determined using the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) as described previously (4) and modified for 96-well cell culture plates. The obtained VNA titers were transformed to IU using a standard human anti-rabies immunoglobulin containing known IU per ml (NIBSC, United Kingdom). The fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled rabies conjugate was purchased from Fujire Diagnostics (IBL, Germany). The VNA titers are represented as geometric mean titers (GMT), and mouse preimmune serum was used as a negative control.

Mouse immunization and challenge infection experiments. C57BL/6 and BALB/c mice were bred at Friedrich-Loeffler-Institut, Institute of Immunology, Tuebingen, Germany. B-cell-deficient mice, B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J, were purchased from Charles River Laboratories and kept in the specific pathogen-free facility at the FLI.

The indicated amounts of D1701-V-RabG were administered in 50-1 volumes intramuscularly (i.m.) into the quadriceps muscle, intravenously (i.v.), intraperitoneally (i.p.), subcutaneously (s.c.); in 20-1 volumes intranasally (i.n.) or intradermally (i.d.), or orally by instillation of 0.1 ml with an intragastric gavage. Multiple immunizations were done in 2- or 3-week intervals, and challenge infection was performed 2 to 3 weeks after the last immunization. In addition, groups of mice were i.m. immunized with 0.1 ml of the commercial human rabies vaccine Rabipur (Novartis Vaccines, Germany) or animal rabies vaccine Nobivac (Intervet, Germany) as reported (23).

Sex-matched 6- to 8-week-old mice (before immunization) were challenge infected under anesthesia intracerebrally (i.c.) into the left hemisphere with the indicated 50% lethal dose (LD₅₀) in a 20-1 volume. Intracerebral challenge infection was chosen to test the protective potency under very stringent conditions basically according to the NIH potency test (20, 23). The animals were inspected three times daily and scored for the appearance of slight neurological signs as beginning ataxia and slightly reduced motility (level 1); for increased neurological signs, such as trembling and/or disorientation after tail spinning (level 2); and for severe signs of disease (level 3) showing ruffled fur, hunched position, and complete paralysis. Animals scored twice at level 3 were immediately sacrificed. The experiment was terminated 28 days after virus challenge. All mice experiments were approved by the local authorities according to the German Animal Protection law.

In vivo depletion of T cell subpopulations. Monoclonal antibodies used for depletion analysis directed against murine CD4 (monoclonal antibody [mAb] YTS 191.1) or CD8 (mAb YTS 169.4) (55) were kindly provided by L. Stitz, (Friedrich-Loeffler-Institut, Germany). The antibodies were diluted 1:25 in PBS, and 0.2 ml was administered i.p. per mouse at the indicated times as described in the legend to Fig. 7. For simultaneous depletion of CD4- and CD8-positive T cells, the 1:25 diluted antibodies were combined in 0.2 ml. Absence of the T cell subsets and their reconstitution after 10 to 14 days has been reported earlier (56) and was controlled by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (data not shown).

Vaccination of dogs. Beagles (6 months of age) were randomized into three groups: group 1 (*n* = 5 dogs) received D1701-V-RabG s.c. between

the shoulder blades, group 2 (*n* = 5 dogs) received D1701-V-RabG i.m. into semimembranous muscle, and group 3 (*n* = 2 dogs) was the PBS-vaccinated control group (1 animal s.c. and 1 animal i.m. immunized). Booster immunization was performed 4 weeks after prime immunization. The administered amount of D1701-V-RabG was 10^{7.57} 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀). Blood samples for rabies serology were collected on day 0 prevaccination and thereafter weekly over a period of 7 weeks post-prime immunization. Serum samples were tested for RABV-specific VNA by RIFFT (Biobest Laboratories Ltd., Edinburgh, United Kingdom). The general health of the animals was observed daily, focused on the injection site for visible, palpable, or painful reactions and on rectal temperatures.

Immunization of cats. Forty-five domestic short-hair, specific pathogen-free cats (11 weeks of age at day 0) were randomized into six groups and were immunized s.c. either with serial 10-fold dilutions of D1701-V-RabG (10⁸ to 10⁵ TCID₅₀), with the commercial live canarypox vector PureVax feline rabies (Merial Animal Health Inc., Duluth, MN) according to the manufacturer's recommendation, which corresponds to 10^{6.8} 50% fluorescent assay infectious dose (FAID₅₀), or with PBS as the control. Blood samples for rabies serology were collected on day 1 (prevaccination) and thereafter weekly over a period of 7 weeks postimmunization. Serum samples were tested for RABV-specific VNA by RFFIT and by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Platelia Rabies II; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Nasal swab samples were collected on days 1 to 7 postvaccination and analyzed for the presence of infectious D1701-V-RabG by virus isolation. The general health of the animals was observed daily, focusing on the injection site for hair loss, swelling, pain, self-trauma (licking, biting, rubbing), hyperthermia, and depression.

RESULTS

In vitro characterization of D1701-V-RabG. Recombinant viruses were selected, plaque purified, and propagated as described in Materials and Methods and published recently (44, 49). Virus plaque isolates negative for the LacZ gene were subjected to 4 additional rounds of plaque purification to receive genetically homogenous RabG-containing recombinant D1701-V-RabG.

Expression of RabG protein in individual recombinant virus plaques was confirmed using immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) as described in Materials and Methods. A representative result is shown in Fig. 1A and B, demonstrating the specific brownish staining of individual virus plaques positive for the RABV glycoprotein. Control staining of parental virus-infected or noninfected cells remained negative (not shown). *In vitro* expression of the RABV glycoprotein was demonstrated by Western blot analysis (Fig. 1C). Protein lysates were prepared 6, 12, 24, and 48 h after infection (hpi) of Vero cells with the parental D1701-V or with the recombinant D1701-V-RabG. The RabG with an apparent molecular weight of approximately 62 kDa could be detected already 6 hpi, with increasing amounts at later time points, but not in parental D1701-V-infected or noninfected cell lysates (Fig. 1C). The major virion protein of ORFV was detectable in all infected cells, whereas noninfected (NI) cells remained negative at the same time points. Comparison of *in vitro* single-step growth curves showed no significant differences in burst size or growth kinetics between D1701-V and the recombinant D1701-V-RabG (data not shown). Correct insertion of the RabG gene into the vegf-e gene locus of ORFV was verified by Southern blot hybridization (not shown). Specific RabG gene transcription controlled by the strong early vegf-e promoter of ORFV (P_{VEGF}) was also ascertained by Northern blot hybridization (data not shown). Finally, RabG expression was studied by immunofluorescence in D1701-V-RabG-infected cells by the use of the G-specific

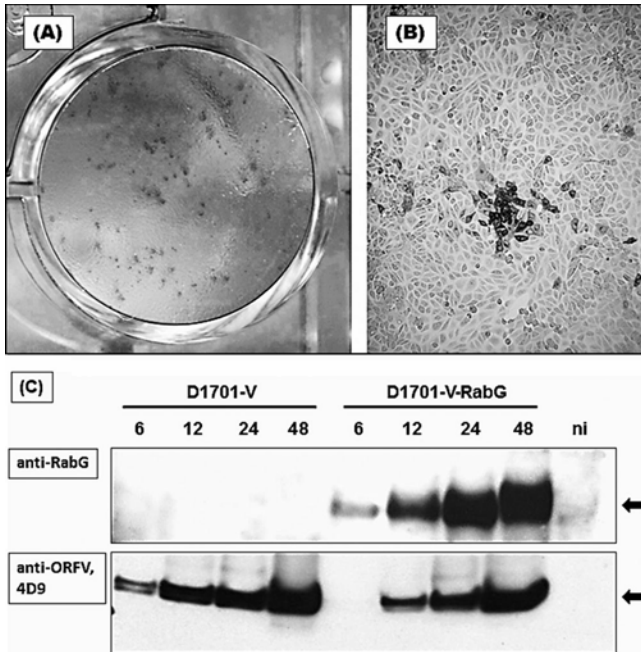


FIG 1 Expression of RABV G protein in D1701-V-RabG-infected Vero cells. Panels A and B demonstrate IPMA staining of recombinant ORFV plaques expressing RABV glycoprotein. Two days after infection, IPMA shows dark (brownish)-stained positive virus plaques expressing RabG (A). Cells expressing RabG can be easily discriminated from negative cells (panel B, 40-fold microscopic magnification). (C) Western blot analysis to detect the expressed RabG. Protein lysates were prepared at the indicated time points after infection with D1701-V as negative controls, with D1701-V-RabG (MOI of 1.0), or from noninfected cells (ni). The RabG protein 62 kDa in size (arrow) was specifically detected with the polyclonal antiserum G154-3 (1:10,000 diluted).

monoclonal antibody E559. Already at 4 hpi, specific intracellular (Fig. 2A) and surface expression (Fig. 2B and C) of RabG was detectable, prolonging until at least 24 h after infection (Fig. 2D). Noninfected (Fig. 2E) or D1701-V-infected (data not shown) control cells remained negative. Strong early expression of RabG was also found in the presence of AraC, which inhibits the replication of ORFV (Fig. 2F). The RabG expression in ORFV recombinant-infected cells was very similar to that seen in RABV-infected cells (54), constituting RabG spikes that project from the cell surface (Fig. 2C, arrows) and are responsible for *in vivo* binding of VNA. Collectively, these results show the successful generation of a new ORFV recombinant expressing the RABV glycoprotein correctly on the surface of infected cells without the need of replication or production of infectious recombinant ORFV.

Protection mediated by immunization with D1701-V-RabG. The capacity of the new ORFV recombinant to mediate a protective immune response was first evaluated in mice. In a pilot experiment (data not shown), groups ($n = 5$ mice) were i.m. immunized once, twice, or thrice with 10^7 PFU of D1701-V-RabG in 2-week intervals. Two other groups were vaccinated three times with 10^6 PFU either i.m. or s.c. Two weeks after the last immunization, all mice were i.c. challenged with 3,000 mouse i.c. LD₅₀ of the highly pathogenic RABV CVS-11 strain. The challenged mock-immunized animals suffered from RABV-specific clinical symptoms and had to be sacrificed between day 6 and day 8 post-challenge. All i.m. immunized animals, receiving one, two, or three inoculations of 10^7 PFU or three doses of 10^6 PFU, were

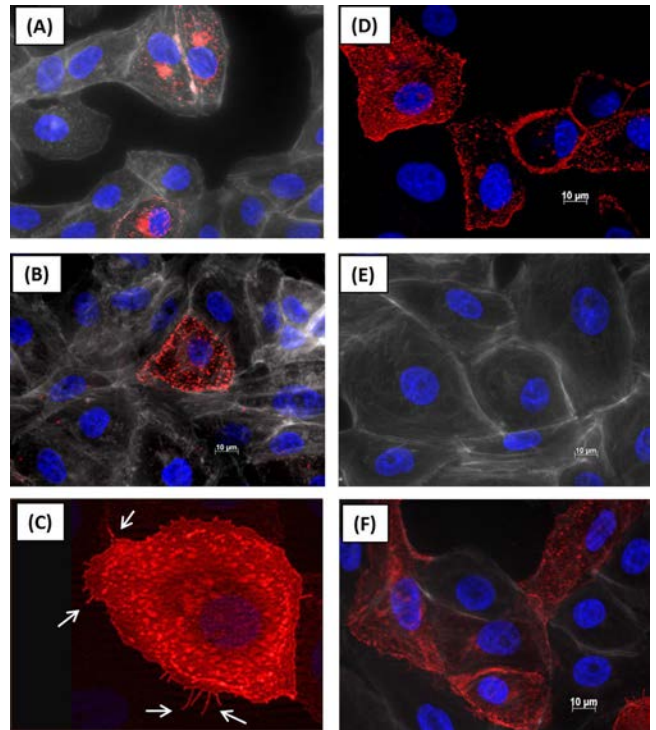


FIG 2 Detection of the RABV G protein by immunofluorescence. Vero cells were infected with D1701-V-RabG (MOI of 0.5) in chamber slides and processed for immunofluorescence as described in Materials and Methods. RabG (red staining) was detectable with the monoclonal antibody E559 (diluted 1:1,000) already 4 h after infection within permeabilized cells (A) or on the cell surface of nonpermeabilized infected cells (B, C) and 24 h after infection (D). Control staining of noninfected cells is shown in panel E. RabG expression was also found in AraC-treated cells blocked for early ORFV gene expression and inhibiting ORFV DNA replication (F).

completely protected, whereas 4 out of the 5 s.c. immunized animals survived the challenge. The D1701-V-RabG-immunized and protected mice did not reveal any harmful reaction, loss of body weight, or RABV-specific clinical signs.

Next we asked the question, which dose of D1701-V-RabG was needed to protect mice after only a single vaccination (Fig. 3). Groups of mice (A to D; $n = 11$ or 12) received one i.m. dose of serial 10-fold dilutions of D1701-V-RabG ranging from 10^7 PFU to 10^4 PFU, and control animals (group E) were mock immunized with PBS. Challenge was performed 17 days later with 1,000 LD₅₀ of RABV strain CVS-11. The results demonstrated that the protection rate was dependent on the immunization dose (Fig. 3A). All mice of group A were completely protected against the challenge, 8 out of 11 mice (73%) of group B survived, whereas 7 out of 12 mice (58%) of group C and only 3 out of 11 (27%) animals of group D survived the challenge. All PBS-immunized animals suffering from serious clinical symptoms had to be sacrificed between days 6 and 8 (Fig. 3A). The mean time to death (MTD) was extended in all immunized groups (Fig. 3A). The level of the induced serum VNA titers correlated with the dosage of the administered D1701-V-RabG. As seen in Fig. 3B, increasing amounts of the recombinant stimulated gradually rising serum antibody titers; however, a distinct correlation between the magnitude of the VNA titer and protection against challenge could not be found. Conclusively, solid protection against i.c. RABV challenge could be

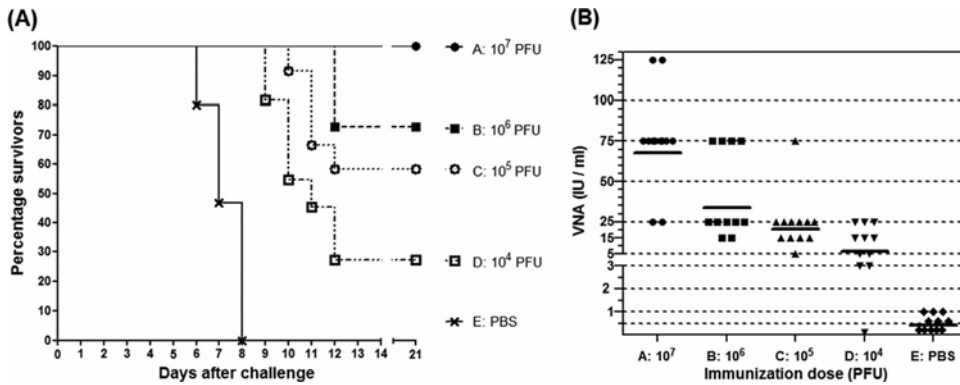


FIG 3 Immunogenicity induced by a single application of different amounts of D1701-V-RabG. (A) Groups of mice ($n = 11/12$) were i.m. immunized once with the indicated amounts (PFU) of D1701-V-RabG or control immunized (PBS) and i.c. challenge infected with 1,000 MICLD₅₀ of RABV CVS strain at day 17. The Kaplan-Meier survival curves demonstrate that a single i.m. vaccination with 10^7 PFU of the RabG recombinant was sufficient to protect all mice from challenge. In addition, the mean time to death was prolonged in comparison to that of the control-vaccinated animals. (B) The serum VNA levels of the individual animals of the indicated immunization groups induced 10 days after vaccination are depicted, and lines mark the GMT of VNA. The results imply that the VNA titer levels correlate with the applied amount of D1701-V-RabG.

achieved by a single i.m. administration of 10^7 PFU of D1701-V-RabG.

Humoral immune response induced by the ORFV recombinant. In order to determine the dose dependency of D1701-V-RabG on the development of RABV-neutralizing serum antibodies, groups of mice were i.m. immunized with 10-fold dilutions of the recombinant from 10^7 PFU up to 10^4 PFU (groups A to D). Mice were immunized three times in 2-week intervals, and sera were collected weekly over a period of 42 days for comparison of the induced VNA titers. In groups A and B, seroconversion could be detected in all animals 7 days after prime immunization with VNA mean titers of 118 IU and 75 IU, respectively. In groups C and D that received 10^5 PFU and 10^4 PFU, respectively, only 4 out of 7 or 3 out of 8 animals seroconverted within the first 14 days and displayed low VNA mean titers of 4 or 0.75 IU (Fig. 4).

Booster immunization (B1) increased the VNA titers in all cases, demonstrating in group A VNA mean titers of 146 IU and in group B of 132 IU at day 21 and of 225 IU (group A) and 154 IU (group B) at day 28. Also all animals of group C and group D seroconverted to adequate VNA titers 2 weeks after the second immunization (Fig. 4). A second boost (B2) did no more stimulate the VNA titers, except of group D. Collectively, these results show a correlation between the immunization dose of D1701-V-RabG and the level of circulating VNA. The normal antibody decline was seen after prime and booster immunization, leaving the VNA titers beyond the protective threshold of 0.5 IU/ml after booster.

Additionally, we compared the immunogenicity of D1701-V-RabG with that of the commercial inactivated vaccines Rabipur and Nobivac, respectively. After 3 i.m. inoculations (0.1 ml each), the induced VNA titers were determined. Mice primed with Nobivac developed the highest VNA mean titers of 254 IU and 268 IU at days 7 and 14, which, however, after a booster vaccination, decreased continuously to 104 IU at day 21 and to 92 IU at day 28 and were comparable to the titer levels induced by 10^5 PFU of D1701-V-RabG. The lowest VNA titers among all groups were stimulated by Rabipur not only after prime but also after booster immunization (Fig. 4) and resembled the response induced by 10^4 PFU of the ORFV recombinant (Fig. 4). Comparing the protective effect, the D1701-V-RabG-immunized mice showed better survival rates than the animals vac-

inated with Rabipur or Nobivac. All animals were protected by immunization with 10^6 PFU of D1701-V-RabG, but only 1 of 7 mice survived, or with Nobivac, protecting only 3 out of 5 animals. The application of Nobivac seemed to prime a pronounced but short-lived humoral response in mice, which could not be boosted by an additional application of the inactivated vaccine. Although only a limited number of animals per group were available for this experi-

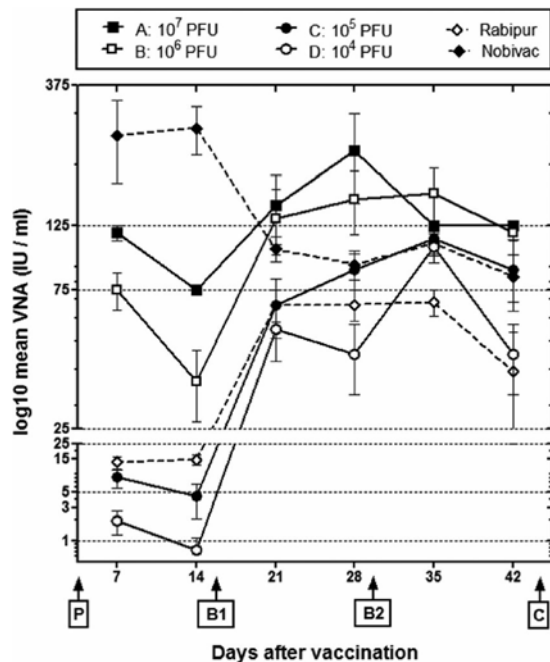


FIG 4 VNA response elicited by 3 i.m. immunizations with different dosages. Groups of mice ($n = 7$) were three times i.m. immunized with the indicated amounts (PFU) of D1701-V-RabG or the inactivated commercial vaccines Nobivac and Rabipur in 2-week intervals (P, prime; B1, boost 1; B2, boost 2; C, challenge infection). The course of the VNA mean titers calculated as IU per ml serum is depicted. The bars indicate standard errors of the mean (SEM). It can be seen that the boost (B1) 14 days after prime immunization (P) stimulated the titer levels, whereas a second boost (B2) did not substantially increase the VNA titers.

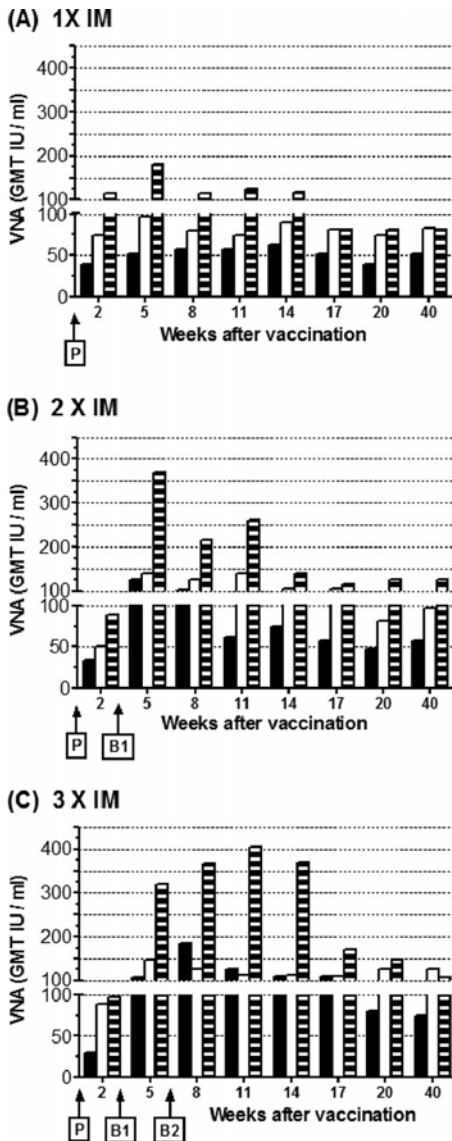


FIG 5 Duration of immunity mediated by D1701-V-RabG. Mice were i.m. immunized once (A), twice (B), or (C) thrice in 3-week intervals (P, prime; B1, boost 1; B2, boost 2) with the indicated amounts (PFU) of D1701-V-RabG. At the indicated weeks after vaccination, the serum VNA titers were determined and are depicted as GMT IU per ml serum. Results after immunization with 10^5 PFU (black columns), 10^6 PFU (white columns), and 10^7 PFU (striped columns) are depicted.

ment, the results indicate good potency of the live ORFV recombinant compared to the two inactivated vaccines.

Duration of VNA response. To evaluate the persistence of the serum VNA response and also the long-term protective immunity, mice ($n = 7$ or 8) received up to 3 i.m. immunizations of 10^5 PFU, 10^6 PFU, or 10^7 PFU of D1701-V-RabG. Sera were collected at 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, and 40 weeks after prime immunization, and mice were i.c. challenged with 100 LD_{50} at week 43 and observed for an additional 28 days. The development of the antibody response monitored during 40 weeks is depicted as GMT of VNA per ml serum in Fig. 5. Two weeks after prime immunization with 10^5 PFU, the VNA titers ranged between 30 to 39 IU, increasing to 50 to 89 IU and 89 to 115 IU after immunization with 10^6 PFU and

10^7 PFU, respectively (Fig. 5A). A second immunization 3 weeks later enhanced the antibody response to VNA titers of 108 to 125 IU (10^5 PFU), 138 to 146 IU (10^6 PFU), or 321 to 370 IU (10^7 PFU). Highest VNA titers were obtained by administration of the highest dose (10^7 PFU) of the recombinant ORFV; however, the most pronounced boosting effect was achieved with the lowest dose (10^5 PFU) of D1701-V-RabG (Fig. 5B). Furthermore, previous results claiming the negligibility of a third vaccination with the same doses of D1701-V-RabG were confirmed, because the VNA response was not substantially enhanced, except for the animals that received the low dose of D1701-V-RabG (10^5 PFU), which displayed VNA titers increasing short-term from 108 IU to 184 IU (Fig. 5C). Inspecting the development of the VNA response, it became obvious that the VNA titers of mice immunized with 10^6 PFU or 10^7 PFU declined and similar titers of approximately 100 IU per ml persisted at later times (weeks 17 to 40) regardless of the number of immunizations. Interestingly, 8 to 11 weeks after second vaccination (Fig. 5B, B1) as well as after third vaccination (Fig. 5C, B2), a similar decrease of VNA titers was observed. Although a second booster immunization (B2) with the higher dose of D1701-V-RabG (10^7 PFU) was not needed to enhance the VNA titers substantially, the VNA response seemed to sustain at higher titers. Notably, this effect was not obtained when using the lower immunization doses, which also did not boost the VNA response to high titers comparable to those seen after the high immunization dose.

All three immunization doses mediated long-lasting protection against a comparably stringent i.c. challenge infection almost 11 months after the prime vaccination. As detailed in Table 1, the survival rate was primarily dependent on the injection dose of D1701-V-RabG, but also the number of immunizations contributed to the protective immunity. Best protection resulted for the groups immunized with the highest dose of D1701-V-RabG, wherein all mice receiving at least one booster immunization survived and only two of six mice (67%) had to be sacrificed in the group immunized only once.

Quality of the immune response stimulated by different routes of application. After demonstrating the potency of i.m. application, we tested the efficacy of the new recombinant after different routes of immunization. A first pilot experiment showed that a single dose of 10^6 PFU of D1701-V-RabG given to mice i.n., i.v., i.p., i.d., s.c., or orally induced only moderate serum VNA titers and partial protection against i.c. challenge (100 LD_{50}) 2 weeks later (data not shown). Therefore, we investigated whether

TABLE 1 Long-lasting protective immunity

i.m. immunization (PFU)	IU/ml (at wk 40)		No. of survivors/total no.	Survival rate (%)
	Mean	Range		
1 10^5	51.3	25 - 125	1/6	17
2 10^5	56.6	25 - 125	2/6	33
3 10^5	74.0	25 - 125	3/6	50
1 10^6	83.1	75 - 125	3/5	60
2 10^6	96.8	75 - 125	4/6	67
3 10^6	125.0	125	4/4	100
1 10^7	80.6	25 - 125	4/6	67
2 10^7	125.0	125	6/6	100
3 10^7	108.0	75 - 125	7/7	100

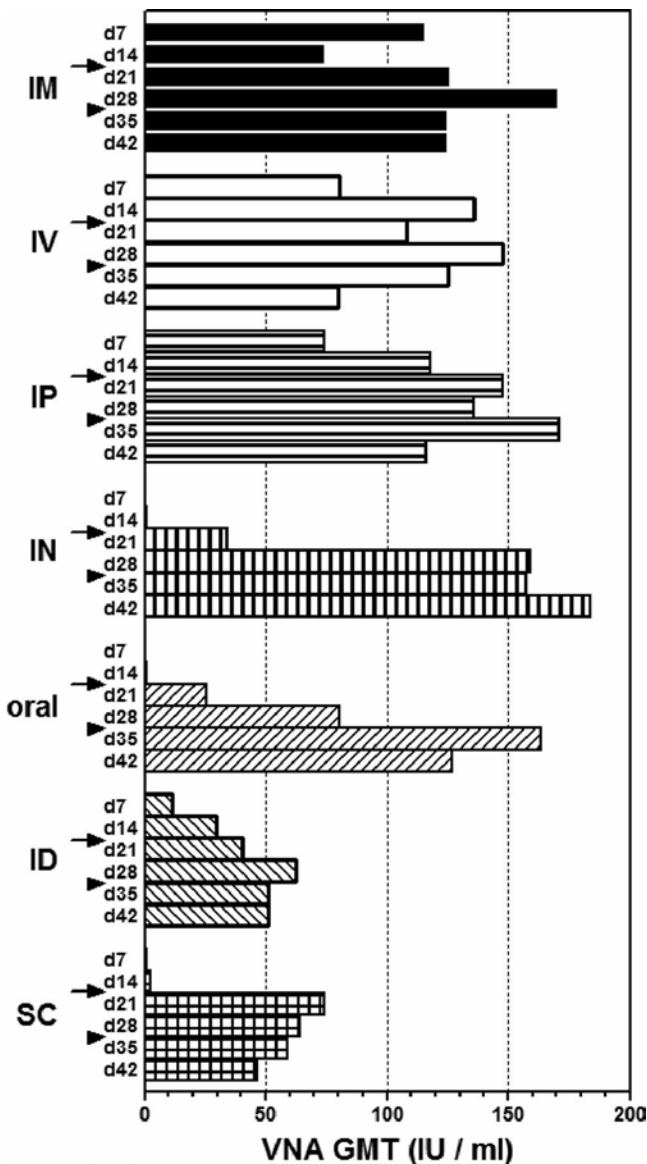


FIG 6 VNA response stimulated by different application routes of D1701-V-RabG. The GMT of VNA are depicted at the indicated days, 7 (d7) to 42 (d42), after the different routes of D1701-V-RabG immunization. Prime immunization was done at day 0, first boost (d15) is indicated by the arrows, and second boost (d29) by the arrowheads.

the quality and efficacy of the induced immune response could be improved by 3 injections with a higher dosage of D1701-V-RabG (10^7 PFU). Sera from all animals ($n = 7$ per group) were collected weekly for 6 weeks to monitor the development of the serum VNA titers after the different routes of immunization (Fig. 6).

The 10-fold increased immunization dose resulted 1 week after prime vaccination in seroconversion of all i.m., i.v., and i.p. immunized animals and elicited very good VNA titers (Fig. 6). Notably, the i.d. prime injection induced lower VNA GMT than the i.m., i.v., and i.p. immunization (Fig. 6 and Table 2, d14). The weakest humoral immunity was found after prime immunization via the s.c., i.n., and oral routes (Fig. 6 and Table 2, d7). Also, only 2 (group s.c.) or 1 (groups i.n. and oral) out of 7 animals seroconverted; however, after booster immunization, all animals had seroconverted. In addition, the VNA titers of the mice of these groups were clearly elevated during 2 weeks after the second injection, mounting to GMT of 186 (i.n.), 68 (s.c.), and 116 (oral) IU per ml. Also the i.d. immunized mice now exhibited increased VNA titers (Fig. 6 and Table 2, d28). An additional slight rise in VNA GMT was also achieved by a booster immunization using i.m., i.v., and i.p. routes (Fig. 6 and Table 2, d28). Again, a third immunization did not significantly boost the VNA titers, but rather slightly reduced VNA titers were found (Fig. 6 and Table 2, d42).

Finally, we tested the protection mediated by the different administration routes of 10^7 PFU of D1701-V-RabG using 100 LD₅₀ i.c. challenge 3 weeks after the last immunization. All together, the protection rate for the different vaccination routes varied between 43% and 100% of the animals (Table 2). Remarkably, all mice receiving the 3-fold i.n. vaccination were completely protected. Due to the lack of high levels of serum VNA after priming with 10^6 (data not shown) or with 10^7 (Fig. 6) PFU, we assume that the i.n. booster vaccination was needed for protection rather than the higher vaccination dose. The finding of a weaker protective response after i.v. administration of D1701-V-RabG was in line with earlier pilot experiments, which also showed lesser protection than i.m. application. Considering MTD, our results indicate that in all cases, the vaccination led to a significant prolongation of the life span of the challenged mice, although complete protection could not be achieved in all cases (Table 2). In addition, the beginning of the clinical symptoms of the immunized but not protected mice was delayed by at least 4 to 6 days compared to the not immunized mice. Taken together, we could demonstrate that pro-

TABLE 2 Immunogenicity of D1701-V-RabG application by different routes

Route	Days after prime immunization ^a						No. of seroconverted/ total no. of mice			No. of survivors/total no. (%)	MTD (days)
	d7	d14	d21	d28	d35	d42	d7	d14	d21		
i.m.	116 (75 - 125) ^b	75	126 (75 - 375)	171 (75 - 625)	125	125	7/7	7/7	7/7	6/7 (86)	14.0
i.n.	1 (0.1 - 15)	1 (0.1 - 15)	34 (15 - 125)	159 (75 - 375)	157 (125 - 625)	184 (125 - 625)	1/7	1/7	7/7	7/7 (100)	
i.v.	81 (75 - 125)	136 (75 - 375)	108 (75 - 125)	148 (75 - 375)	125	80 (25 - 125)	7/7	7/7	7/7	5/7 (71)	15.0
i.p.	74 (25 - 125)	117 (75 - 375)	148 (75 - 625)	136 (75 - 375)	171 (125 - 375)	116 (75 - 125)	7/7	7/7	7/7	5/7 (71)	13.5
i.d.	12 (1 - 75)	30 (5 - 75)	41 (15 - 75)	62 (15 - 375)	51 (25 - 125)	51 (25 - 125)	5/6	6/6	6/6	3/6 (50)	11.7
s.c.	1 (0.1 - 15)	3 (0.1 - 25)	74 (25 - 125)	64 (25 - 75)	59 (25 - 125)	47 (25 - 75)	2/7	5/7	7/7	3/7 (43)	12.5
Oral	0 (0.1 - 25)	1 (0.1 - 75)	26 (3 - 75)	81 (15 - 375)	164 (125 - 625)	127 (75 - 375)	1/7	2/7	7/7	5/7 (71)	14.0
PBS	1	1	1	1	1	1	0/7	0/7	0/7	0/7 (0)	8.3

^a Prime immunization at day 0, first boost at day 15, second boost at day 28, and challenge at day 49.

^b VNA titer in IU/ml: GMT (range).

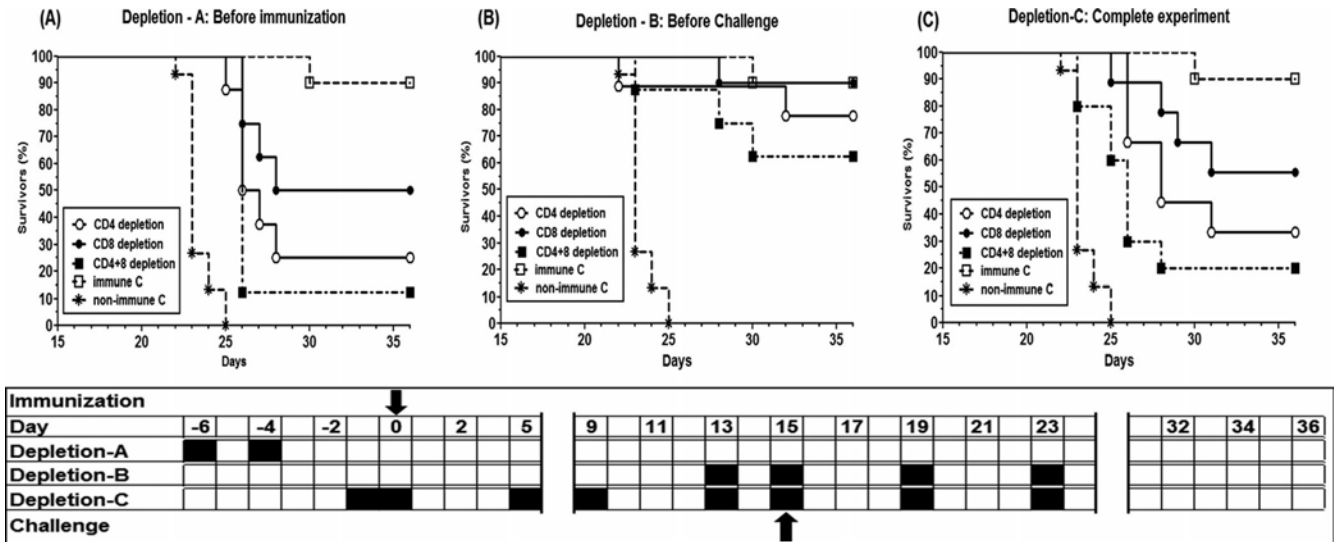


FIG 7 Relevance of T cells for D1701-V-RabG-induced protective immunity. CD4-, CD8-, or CD4- and CD8-positive T cell subsets were selectively eliminated *in vivo* by antibody-mediated depletion as described in Materials and Methods. At the bottom of the figure, the treatment protocol is schematically depicted, indicating the days of antibody i.p. injection as black boxes. Immunization with 10^7 PFU of D1701-V-RabG was performed at day 0 (arrow), and all animals were i.c. challenge infected at day 15 (arrow). The most pronounced effects on the survival rate were found by T cell depletion before prime immunization (A) or depleting the T cell subsets during the entire experiment (C), whereas removal of the T cell populations before the time point of challenge infection had the least effect on the survival rate (B).

tection can be accomplished with D1701-V-RabG via different routes of application and, therefore, might be qualified for more practicable immunization routes of target animals in the field.

Contribution of T cells to the protective immunity mediated by D1701-V-RabG. To scrutinize the contribution of CD4- and CD8-positive T cells to the protective immunity of D1701-V-RabG-vaccinated mice, both T cell subsets were selectively removed on their own or in combination by antibody-mediated depletion during different stages of immunization. The three different experimental settings outlined in the bottom part of Fig. 7 were chosen to examine (i) the importance of the T cell subsets for priming the protective anti-RABV response (Depletion-A), (ii) the necessity of their presence during RABV challenge infection (Depletion-B), and (iii) the implication of the absence of these T cell populations during immunization and challenge infection. As controls, the experiments included groups of nondepleted mice immunized (immune C) or not immunized (nonimmune C).

The impact of CD4- and/or CD8-positive T cells on the development of protective immunity after i.m. vaccination with 10^7 PFU D1701-V-RabG was analyzed by depleting the T cell subsets prior to immunization at days 6 and 4 (Fig. 7, Depletion-A). FACS analyses demonstrated (data not shown) that the depleted T cell populations remain absent for approximately 14 days after antibody treatment, before they become recovered, as reported earlier (55, 56). Accordingly, the mice should have regained their original immune status before challenge infection at day 15. T cell depletions prior to the immunization strongly affected the development of an adequate immunity against RABV, as demonstrated in Fig. 7A. Removal of CD4-positive T cells reduced the survival rate of the immunized mice to only 25% (2 survivors out of 8 animals), whereas the most pronounced effect was found after simultaneous depletion of CD4- and CD8-positive T cells resulting in protection of only 1 out of 8 animals (12.5%). Despite depletion of CD8-positive T cells, still 50% of the mice were pro-

tected against the lethal RABV challenge. As expected, all animals of the nonimmunized controls died between days 7 and 10 post-challenge, and 9 out of 10 immunized control animals were protected (90%).

Using the approach Depletion-B (Fig. 7), the direct contribution of the T cell subsets in protection of previously immunized animals was assessed. Mice were i.m. inoculated with the ORFV recombinant (10^7 PFU), and 13 days later, i.e., 2 days before RABV challenge infection (day 13), CD4-positive and/or CD8-positive T cells were depleted. Hence, the D1701-V-RabG-mediated formation of the RABV-specific immune response was not affected by the antibody treatment. To prevent restoration of the T cells during challenge infection, the antibody treatment was continued at days 15, 19, and 23 as shown in the bottom part of Fig. 7. Two days before challenge CD4-positive and/or CD8-positive T cells were selectively removed. As can be seen in Fig. 7B, the depletion of only CD8-positive T cells had virtually no influence on the protection against RABV infection. Elimination of the CD4-positive T cell subset or of both CD4- and CD8-positive T cells reduced the survival rate to 78% and 63%, respectively. The data show that *in vivo* depletion of the T cell subsets shortly before challenge infection only marginally influenced the previously established protective immune response.

To examine the protective efficiency of D1701-V-RabG in mice deficient for CD4-positive and/or CD8-positive T cells, animals were antibody treated at the time of vaccination and during challenge infection for a period of 24 days (Fig. 7, Depletion-C), in order to avoid the reconstitution of the T cell subsets and to ensure their absence during the complete experiment. The survival rate of immunized mice missing CD8-positive T cells was diminished to 56% (5 out of 9), whereas only 33% (3 out of 9) of the immunized mice depleted for CD4-positive T cells survived the challenge (Fig. 7C). Depletion of both T cell subsets resulted in a more pronounced decline of protection, and only 20% (2 out of 10) of the

immunized animals endured the challenge (Fig. 7C). In summary, the presence of CD4-positive T cells at the time of vaccination with the recombinant D1701-V-RabG was most crucial for eliciting a solid protective immunity against RABV. Although to a lesser extent, CD8-positive T cells also contribute to protection against lethal challenge infection. In the three experimental layouts, the lack of both T cell populations impaired the survival rates most.

Finally, we demonstrated the importance of B cells for protection of D1701-V-RabG-immunized mice to RABV challenge infection. Mice genetically immune deficient for B cells, MT mice (B6.129S2-*Ighm*^{tm1Cgn}/J), were immunized three times in 2-week intervals with 10^7 PFU of D1701-V-RabG before i.c. challenge infection with 500 LD₅₀ of the RABV CVS strain. None of the animals either immunized or nonimmunized resisted the challenge infection, so that all had to be sacrificed 9 days after infection due to RABV-specific clinical symptoms (data not shown). This supports the need of B cells for protection against RABV also after D1701-V-RabG immunization.

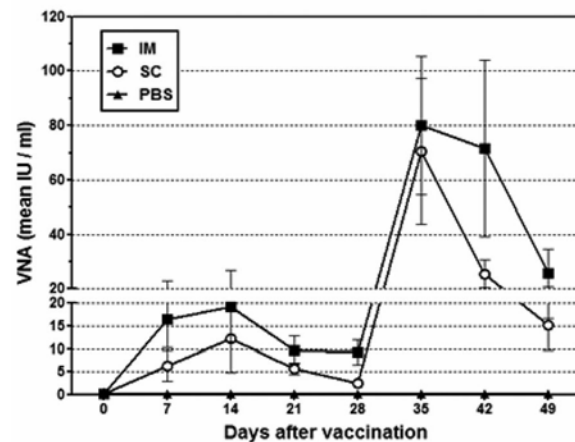
Antibody response in dogs. Dogs are the main reservoir for human RABV infections and have to be vaccinated for controlling rabies. Therefore, we examined the immunogenic potential of D1701-V-RabG in dogs after s.c. or i.m. immunization. Dogs ($n = 5$) were immunized twice with $10^{7.57}$ TCID₅₀ of the recombinant ORFV in 28-day intervals. For detection of VNA, sera were collected weekly from day 0 (prevaccination) until day 49. As controls, one dog was immunized s.c. and another one i.m. with PBS. Figure 8A shows that all animals of the s.c. immunized group seroconverted within 7 days, exhibiting VNA titers from 1.6 IU to 19.5 IU (mean, 6.3 IU). After prime immunization, the VNA response peaked at day 14, ranging from 2.8 IU to 41.6 IU (mean, 12.1 IU). Subsequently, the mean titer slightly decreased to 5.7 IU at day 21 and to 2.5 IU at day 28, whereby the minimal VNA titer of 1.6 IU of the animals still exceeded the protective titer of 0.5 IU per ml serum. Booster immunization at day 28 markedly increased the VNA titers, ranging 1 week later between 10.9 IU to 169.4 IU (mean, 70.5 IU). At day 42 and 49 postimmunization, the VNA titers slightly declined to a mean titer of 25.5 IU (6.3 to 32.3 IU) and 15.2 IU (4.8 to 32.3 IU), respectively (Fig. 8A).

Intramuscular injection of D1701-V-RabG elicited approximately 2- to 3-fold higher VNA GMT titers in the dogs compared to s.c. application. Seven days after immunization, all animals had seroconverted, and a VNA mean titer of 16.5 IU was found (Fig. 8A). The VNA response after i.m. application also peaked at day 14, with a mean titer of 19.1 IU, and decreased thereafter to 9.8 IU and 9.3 IU at day 21 and day 28, respectively. The second i.m. immunization boosted the VNA titers to 80.3 IU at day 35, and similar to the s.c. immunized animals, a slight reduction was observed at day 42 (mean 71.5 IU) and at day 49 (mean 25.7 IU).

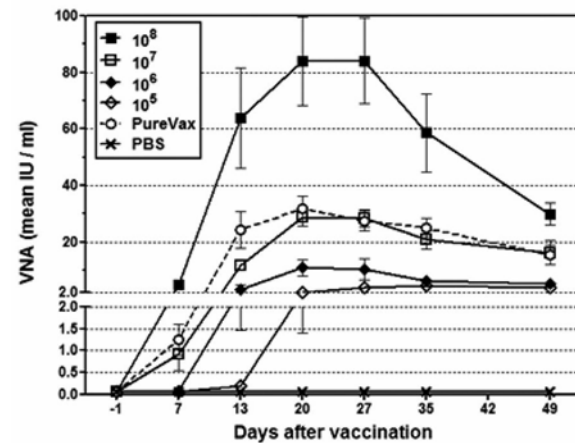
Collectively, the results demonstrate that all immunized dogs seroconverted during the first week after prime vaccination and displayed VNA titers, which remained beyond the OIE recommendation for a protective response (0.5 IU/ml serum) during the complete observation period. Additionally, no signs of illness, inflammation, increased rectal temperature, or pain were observed, except of one i.m. immunized dog showing mild pain on palpation for the duration of 1 day.

Immunogenicity in cats. Vaccination of cats is also important for controlling spread of RABV. Therefore, we were interested in testing the immunogenicity of D1701-V-RabG after a single s.c.

(A) Dogs, VNA titres



(B) Cats, VNA titres



(C) Cats, ELISA antibody titres

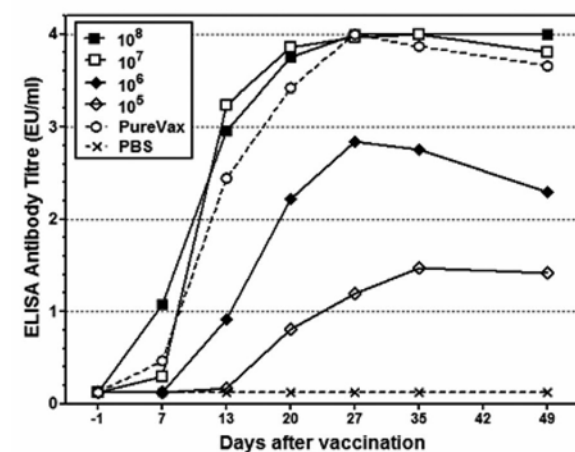


FIG 8 Serum antibody response in vaccinated cats and dogs. (A) Dogs ($n = 5$) were vaccinated s.c. (filled squares) or i.m. (open squares) with $10^{7.5}$ TCID₅₀ of D1701-V-RabG, and the serum VNA response was determined by RIFFT. At day 28, all animals received a booster immunization with the same dose of D1701-V-RabG. Control animals were mock immunized with PBS (stars). (B) VNA GMT titers of cats ($n = 7$ or 8) s.c. immunized with 10^8 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀, 10^6 TCID₅₀, 10^5 TCID₅₀ D1701-V-RabG, or PureVax feline rabies or control-immunized with PBS. (C) ELISA titers were obtained from Platelia II ELISA as described in Materials and Methods.

vaccination with several amounts of D1701-V-RabG. For comparison, one group of animals received the commercial Canarypox-based PureVax feline rabies live vaccine (corresponding to

$10^{6.8}$ FAID₅₀). After vaccination, sera were collected weekly over a period of 7 weeks, and RABV antibody responses were determined by RFFIT (VNA) and by ELISA (Platelia Rabies II). Both tests proved all animals seronegative to RABV antibodies prior to vaccination. The level of the induced serum VNA titers clearly depended on the used immunization dose of D1701-V-RabG (Fig. 8B). All cats receiving the highest dose (10^8 TCID₅₀) developed RABV-specific serum antibody titers higher than 0.5 IU/ml within 7 days, ranging from 1.3 to 10.0 IU/ml. Peak VNA titers of 84 IU/ml were found in this group at days 20 to 27, which were approximately 3 to 40 times higher than those obtained after application of the lower doses of the ORFV recombinant. Immunization with 10^7 TCID₅₀ D1701-V-RabG stimulated very similar VNA titers compared to the use of the commercial Canarypox-vectored vaccine. Seroconversion of all animals was found in both groups just at day 13 after vaccination, and titers ranged from 4.3 to 13.0 IU/ml (10^7 PFU D1701-V-RabG) and from 2.8 to 39.0 IU/ml in PureVax-vaccinated animals. VNA titers above the protective threshold of 0.5 IU/ml serum were reached in all vaccinated groups, the latest at day 27, except for one animal after injection of 10^5 PFU of D1701-V-RabG, and persisted during the whole observation period (Fig. 8B).

The development of the serum ELISA antibody response showed comparably high titers using 10^8 or 10^7 TCID₅₀ D1701-V-RabG or the canarypox-vectored vaccine (Fig. 8C). Again, the vaccination with 10^8 TCID₅₀ of the ORFV recombinant elicited the highest antibody titers already during the first week. Adequate ELISA titers were also induced after vaccination with the smaller amounts of the ORFV recombinant (Fig. 8C). Taken together, the most potent antibody response was achieved by the application of a single dose of 10^8 TCID₅₀ D1701-V-RabG. In addition, this immunization did not lead to any adverse effect in the vaccinated cats, and excretion of the ORFV recombinant was not detectable by virus isolation. Very similar immune responses were obtained by the use of 10^7 TCID₅₀ D1701-V-RabG and by vaccination with the commercial vaccine PureVax feline rabies.

DISCUSSION

Rabies is still a global public health threat caused by RABV infection from rabid canids or felids controllable also by wildlife vaccination (1). To this end, improved efficacious and safe vaccines against RABV would be desirable. Since ORFV-vectored vaccines can be regarded as a potent, safe alternative to other poxvirus-based recombinant vaccines (44, 49, 51, 57), we generated the novel recombinant D1701-V-RabG containing the RABV glycoprotein known as the principal correlate of protective immunity against rabies. The RabG gene was inserted into the vegf-e gene locus of the genome of the attenuated ORFV strain D1701-V and was correctly expressed in good amounts, which did not detectably alter the growth characteristics, the plaque phenotype, or the replication of parental D1701-V, as reported after expression of RabG in a Newcastle disease virus vector (22). Immunofluorescence experiments revealed strong expression of RABV-characteristic RabG surface projections already in the early phase of D1701-V-RabG replication (Fig. 2). As demonstrated earlier for other D1701-V recombinants, the regulation of the foreign gene by the early vegf-e promoter allows its expression without the

need for a productive ORFV replication (44, 49 – 51). Therefore, RabG expression and induction of RABV-specific immunity was achieved in ORFV nonpermissive hosts as mice, cats, or dogs, which implies one important prerequisite for the potential usage of D1701-V-RabG as a safe vaccine.

The protective potential of the novel ORFV recombinant D1701-V-RabG was first evaluated in mice, as a proof of concept. The capacity of the mediated immunity was tested on severe infectious conditions by the use of high lethal doses (100 to 3,000 LD₅₀) for the i.c. challenge infections performed with the virulent RABV strain CVS-11. One important demand for improved rabies vaccines is the induction of a solid protective immunity after a single vaccine inoculation, which can be achieved with 10^7 PFU of D1701-V-RabG. Dose-dependent reduction in protection rates was accompanied by a reduction of VNA titers as reported for other recombinant rabies vaccines (22, 33, 35, 58). The presented data, however, do not allow an unambiguous correlation between protection and magnitude of VNA titers in mice. The absence of a relationship between VNA titers and mortality rates was reported earlier (59), albeit the presented results are difficult to compare with other reported mouse studies because of the use of different RABV strains, dosages, or routes for challenge infection. Moreover, RABV-specific antibodies determined by the *in vitro* virus neutralization assay did not necessarily correlate with RABV neutralization or protection *in vivo*, and low titers of VNA with high avidity can be more effective in protection than high titers of VNA with low avidity, as reported for influenza virus (60).

Immunization with smaller amounts of D1701-V-RabG (10^6 PFU) also mediated complete protection, albeit booster immunizations were necessary. In contrast to other poxvirus or adenovirus vectors (26, 32, 61 – 64), the ORFV vector allows repeated immunizations to enhance protective immunity against the transgene, which can be explained by the lack of serum antibodies efficiently neutralizing ORFV as well as by the generally short-living ORFV immunity (38, 40). Preexisting ORFV immunity in vaccine candidates is also highly unlikely due to the very restricted host range. Furthermore, in immunized hosts that are nonpermissive for ORFV, only early ORFV genes are expressed, and thus, immunogenic ORFV late proteins are not produced and consequently cannot induce efficient ORFV-specific immunity.

Although no substantial increase of RABV-specific VNA titers was obtained after a third immunization with 10^6 or more PFU of the recombinant, the protection rate against challenge infection was improved. Mice challenged 43 weeks after prime immunization with 10^6 PFU were completely protected after a third immunization, whereas a single boost protected only 67% of the mice. The longevity of the protective immune response might need booster immunizations with the ORFV recombinant, at least in mice or as earlier reported in rats (51). The findings that groups of animals showed different survival rates but comparable VNA titers indicate that apart from humoral immunity, additional cellular immune mechanisms contribute to protection, particularly the induction and activation of T lymphocytes, including their cytokine production (8, 65). The presented *in vivo* depletion experiments supported the importance of CD4-positive T cells for protection after application of D1701-V-RabG. Removal of CD4-positive T-helper cells impedes stimulation and enhancement of B cells and consequently reduces antibody production (65, 66) and therefore resulted in decreased survival of mice missing CD4-positive T cells. This is corroborated by the result that D1701-V-RabG

immunization did not protect B-cell-knockout mice. The presented data confirm earlier reports on the importance of CD4-positive T cells for developing immunity and protection against rabies (59, 67), which were also induced by the application of the ORFV recombinant. Removal of the CD4- and the CD8-positive T cell subsets just before the time point of challenge only marginally influenced the survival rate of the previously immunized animals. The presented results show that CD4-positive T cells are needed to prime protective immunity, but deleting this T cell subset later on, as for instance shortly before challenge infection, does not substantially reduce protection. These results confirm earlier studies that CD4-positive T cell help is no more required for protection against RABV approximately 10 days after infection or immunization (67). Our results also support findings by Perry and Lodmell that CD8-positive T cells play a rather minor role in conferring resistance against rabies (67). When CD8- and CD4-positive T cell subsets were missing before and during vaccination, the survival rate was mostly reduced, which indicates some protective role of CD8-positive T cells. The protective role of CD8-positive cytolytic T cells was not investigated in the present study, but their importance to eliminate RABV from the brain by providing antiviral cytokines and collaborating in a concerted action with VNA was reported (68). Recently, it was shown that an induction of the recruitment of dendritic cells significantly enhanced the protective immune response against rabies (17). The general property of ORFV to attract dendritic cells to the virus inoculation site (40) was also demonstrated recently for the ORFV strain D1701 (46). This might be one explanation for the excellent immune-stimulating properties of the ORFV recombinants without the need of adjuvant.

The comparison of mice vaccinated with D1701-V-RabG to mice vaccinated with Nobivac or Rabipur, two commercial inactivated RABV vaccines, may indicate some superiority of D1701-V-RabG. Although Nobivac i.m. prime immunization induced the highest VNA titers, they also rapidly decreased and remained low even after another booster injection, which indicates the development of only short-lived VNA by that inactivated rabies vaccine. Also, the vaccinated mice were less protected than those immunized with the ORFV recombinant. The failure of Nobivac booster immunizations to increase the VNA response has not been reported and cannot be explained. In contrast to Nobivac, Rabipur immunization resulted in relatively low VNA titers after prime, but one booster immunization increased the immune response to serum VNA titers comparable to the i.m. administration of 10^5 PFU of D1701-V-RabG. However, the protective potential of Rabipur was low (14% survivors), a finding that is in contrast to other studies that reported efficacy even of a single immunization (23). We suppose that the different challenge virus and the high i.c. challenge dose can explain the poor protection efficacy of both inactivated vaccines in our experiments, which also argue for the excellent potency of D1701-V-RabG.

Vaccination of wildlife is considered the most effective strategy for rabies control, but application of effective vaccines requires more practicable inoculation routes than i.m. injection. Therefore, we examined the efficacy of D1701-V-RabG immunization after alternate inoculation routes. In summary, the results demonstrated that in all cases, adequate immunity against RABV could be stimulated at least after 2 vaccinations. The i.n. and i.m. immunized mice developed the highest VNA titers among the different inoculation ways and were protected against RABV chal-

lenge (Table 2). Only weak VNA responses and partial protection were found after the i.d. or the s.c. administration of the recombinant, which, however, can be explained by technical drawbacks of the mouse model. The oral application, a favorite route of vaccination for wildlife animals, showed promising results for the use of the ORFV recombinant with superior potential compared with other RabG-expressing recombinant vaccines. For example, a canine adenovirus 2-RabG recombinant was not able to protect mice against RABV challenge (58). VACV vector strain MVA expressing RabG failed to elicit detectable VNA even after booster with high doses of this recombinant and consequently did not protect against RABV challenge infection. Similarly, V-RG or a recombinant derived from the VACV strain Western Reserve mediated only partial protection against mild RABV challenge infection (33). Nevertheless, those vaccines were found effective in other animals by oral application, indicating some limitations of the murine model for evaluating the efficacy of the oral vaccination and, therefore, encourages testing the oral vaccination efficacy of D1701-V-RabG in wildlife reservoirs. In addition, the complete protection of i.n. immunized animals indicates the potential of D1701-V-RabG to trigger RABV-specific immunity by targeting mucosa-associated lymphoid tissue as described for other poxviruses (for review, see reference 69). The presented results now demonstrate that ORFV recombinants can be successfully used to elicit protective immunity by different routes of inoculation, which will be an important practical benefit for field application if shown for target animals.

Important prerequisites for controlling rabies are effective vaccination of dogs and cats, which both represent important reservoirs for RABV. As in mice (44), there was no evidence for replication of D1701-V in these animals (unpublished data). The success of rabies vaccination is inferred from the induced VNA response, as VNA titers equal to or higher than 0.5 IU per ml serum are regarded protective against rabies. In this study, cats were s.c. vaccinated with different dosages of D1701-V-RabG and compared to cats vaccinated with the commercial feline rabies vaccine PureVax, a licensed canarypox virus-vectored rabies live vaccine. The results showed that cats receiving comparable amounts of D1701-V-RabG or of the canarypox virus recombinant also develop similar, adequate serum VNA titers, and all animals had seroconverted during 13 days after immunization. By increasing the dose of the ORFV recombinant, very high VNA titers can be elicited during the first 10 days, which could be of interest for vaccinations needed for rapid induction of high VNA response. The amount of the applied dosage of D1701-V-RabG determines the magnitude of the VNA titer, but even after the inoculation of the lowest dose (10^5 TCID₅₀), all animals seroconverted (i.e., VNA higher than 0.5 IU/ml), albeit lasting 35 days. The potential of D1701-V-RabG was also tested in dogs using i.m. and s.c. vaccination. Both application routes elicit VNA titers higher than 0.5 IU/ml within 7 days, peaking around day 14 after immunization, similar to results after application of inactivated rabies vaccines (70). Booster s.c. or i.m. immunization strongly increased the VNA titers, indicating low vector immunity, which, for instance, was not possible using a recombinant canine adenovirus expressing RabG (71). Intramuscular application appeared to lead to a better and more durable VNA response at later times after vaccination compared to the s.c. vaccinated animals, which was reported for other rabies vaccines, too (9).

In conclusion, the presented results are promising for the use

of D1701-V-RabG as a potent, nonadjuvanted vaccine candidate, e.g., for companion animals against rabies. The VNA titers remaining after the deemed normal decline of serum antibodies were still above the protective threshold, which has to be shown by forthcoming challenge studies. This report adds another example of an ORFV recombinant mediating an effective and sustained protective immune response in hosts nonpermissive for ORFV, as replication of the recombinant virus is not required and underlines the excellent potential of the *Parapoxvirus* ORFV strain D1701-V as an attractive virus vector platform for the development of live ORFV-vectored vaccines.

ACKNOWLEDGMENTS

The excellent technical assistance of Karin Kegreiss and Berthilde Bauer is greatly acknowledged. We thank Lothar Stitz for assistance with mice experiments, fruitful discussions, and critical commentary on the manuscript. The most valuable comments of Stefan Finke and Gregor Meyers after critically reading the manuscript are highly appreciated. The dog experiments were carried out by Charles River Laboratory Pre-Clinical Services, Ireland.

This study was financially supported by Pfizer Animal Health.

REFERENCES

- Lembo T, Hampson K, Kaare MT, Ernest E, Knobel D, Kazwala RR, Haydon DT, Cleaveland S. 2010. The feasibility of canine rabies elimination in Africa: dispelling doubts with data. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**:e626. doi:10.1371/journal.pntd.0000626.
- Dietzschold B, Schnell M, Koprowski H. 2005. Pathogenesis of rabies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **292**:45 – 56.
- Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. 2010. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:51 – 61.
- Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG. 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* **16**:754 – 759.
- Foley HD, McGettigan JP, Siler CA, Dietzschold B, Schnell MJ. 2000. A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:14680 – 14685.
- Macfarlan RI, Dietzschold B, Koprowski H. 1986. Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol. Immunol.* **23**:733 – 741.
- Wiktor TJ, Gyorgy E, Schlumberger D, Sokol F, Koprowski H. 1973. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* **110**:269 – 276.
- Moore SM, Wilkerson MJ, Davis RD, Wyatt CR, Briggs DJ. 2006. Detection of cellular immunity to rabies antigens in human vaccinees. *J. Clin. Immunol.* **26**:533 – 545.
- Aubert MF, Masson E, Artois M, Barrat J. 1994. Oral wildlife rabies vaccination field trials in Europe, with recent emphasis on France. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **187**:219 – 243.
- Rupprecht CE, Wiktor TJ, Johnston DH, Hamir AN, Dietzschold B, Wunner WH, Glickman LT, Koprowski H. 1986. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:7947 – 7950.
- Rupprecht CE, Hanlon CA, Blanton J, Manangan J, Morrill P, Murphy S, Niezgodka M, Orciari LA, Schumacher CL, Dietzschold B. 2005. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. *Virus Res.* **111**:101 – 105.
- Conzelmann KK, Schnell M. 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J. Virol.* **68**:713 – 719.
- Gomme EA, Wanjalla CN, Wirblich C, Schnell MJ. 2011. Rabies virus as a research tool and viral vaccine vector. *Adv. Virus Res.* **79**:139 – 164.
- Ertl HC. 2009. Novel vaccines to human rabies. *PLoS Negl Trop. Dis.* **3**:e515. doi:10.1371/journal.pntd.0000515.
- Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, Marx PA, McGettigan JP. 2009. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* **200**:1251 – 1260.
- Faber M, Li J, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, Dietzschold B. 2009. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:11300 – 11305.
- Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, Fu ZF. 2011. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J. Virol.* **85**:1634 – 1644.
- Zhao L, Toriumi H, Wang H, Kuang Y, Guo X, Morimoto K, Fu ZF. 2010. Expression of MIP-1alpha (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J. Virol.* **84**:9642 – 9648.
- Ullas PT. 2012. Rabies DNA vaccines: current status and future. *World J. Vaccines* **2**:36 – 45.
- Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhatnagar R. 2010. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB J.* **24**:173 – 183.
- Liu MA. 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* **239**:62 – 84.
- Ge J, Wang X, Tao L, Wen Z, Feng N, Yang S, Xia X, Yang C, Chen H, Bu Z. 2011. Newcastle disease virus-vectored rabies vaccine is safe, highly immunogenic, and provides long-lasting protection in dogs and cats. *J. Virol.* **85**:8241 – 8252.
- Saxena S, Dahiya SS, Sonwane AA, Patel CL, Saini M, Rai A, Gupta PK. 2008. A sindbis virus replicon-based DNA vaccine encoding the rabies virus glycoprotein elicits immune responses and complete protection in mice from lethal challenge. *Vaccine* **26**:6592 – 6601.
- Yuan Z, Zhang S, Liu Y, Zhang F, Fooks AR, Li Q, Hu R. 2008. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* **26**:1314 – 1321.
- Prehaud C, Takehara K, Flamand A, Bishop DH. 1989. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology* **173**:390 – 399.
- Weyer J, Rupprecht CE, Nel LH. 2009. Poxvirus-vectored vaccines for rabies—a review. *Vaccine* **27**:7198 – 7201.
- Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecocq JP. 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**:163 – 166.
- Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Mackett M, et al. 1984. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:7194 – 7198.
- Blancou J, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Pastoret PP, Soulebot JP, Desmetre P. 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* **322**:373 – 375.
- Rupprecht CE, Charlton KM, Artois M, Casey GA, Webster WA, Campbell JB, Lawson KF, Schneider LG. 1990. Ineffectiveness and comparative pathogenicity of attenuated rabies virus vaccines for the striped skunk (*Mephitis mephitis*). *J. Wildl. Dis.* **26**:99 – 102.
- Rupprecht CE, Blass L, Smith K, Orciari LA, Niezgodka M, Whitfield SG, Gibbons RV, Guerra M, Hanlon CA. 2001. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N. Engl. J. Med.* **345**:582 – 586.
- Lodmell DL, Ewalt LC. 2000. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. *Vaccine* **18**:2394 – 2398.
- Weyer J, Rupprecht CE, Mans J, Viljoen GJ, Nel LH. 2007. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* **25**:4213 – 4222.
- Esposito JJ, Knight JC, Shaddock JH, Novembre FJ, Baer GM. 1988. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* **165**:313 – 316.
- Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, Languet B, Guillemain F, Desmetre P, Paoletti E. 1991. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* **9**:190 – 193.
- Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmetre P, Paoletti E. 1988. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**:497 – 503.
- Aspden K, van Dijk AA, Bingham J, Cox D, Passmore JA, Williamson

- AL. 2002. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle. *Vaccine* **20**:2693 – 2701.
38. **Büttner M, Rziha H-J.** 2002. Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **49**:7 – 16.
39. **Hussain KA, Burger D.** 1989. In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. *Vet. Microbiol.* **19**:23 – 36.
40. **Haig DM.** 2006. Orf virus infection and host immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:127 – 131.
41. **Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A.** 2000. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J. Virol.* **74**:7943 – 7951.
42. **Friebe A, Siegling A, Friederichs S, Volk HD, Weber O.** 2004. Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J. Virol.* **78**:9400 – 9411.
43. **Siegemund S, Hartl A, H von Buttlar Dautel F, Raue R, Freudenberg MA, Fejer G, Buttner M, Kohler G, Kirschning CJ, Sparwasser T, Alber G.** 2009. Conventional bone marrow-derived dendritic cells contribute to Toll-like receptor-independent production of alpha/beta interferon in response to inactivated parapoxvirus ovis. *J. Virol.* **83**:9411 – 9422.
44. **Fischer T, Planz O, Stitz L, Rziha H-J.** 2003. Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *J. Virol.* **77**:9312 – 9323.
45. **Friebe A, Friederichs S, Scholz K, Janssen U, Scholz C, Schlapp T, Mercer A, Siegling A, Volk HD, Weber O.** 2011. Characterization of immunostimulatory components of Orf virus (parapoxvirus ovis). *J. Gen. Virol.* **92**:1571 – 1584.
46. **McGuire MJ, Johnston SA, Sykes KF.** 2012. Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. *Proteome Sci.* **10**:4.
47. **Weber O, Siegling A, Friebe A, Limmer A, Schlapp T, Knolle P, Mercer A, Schaller H, Volk HD.** 2003. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **84**:1843 – 1852.
48. **Rziha H-J, Henkel M, Cottone R, Bauer B, Auge U, Gotz F, Pfaff E, Rottgen M, Dehio C, Büttner M.** 2000. Generation of recombinant parapoxviruses: nonessential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J. Biotechnol.* **83**:137 – 145.
49. **Rohde J, Schirrmeier H, Granzow H, Rziha H-J.** 2011. A new recombinant Orf virus (ORFV, parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Vaccine* **29**:9256 – 9264.
50. **Voigt H, Merant C, Wienhold D, Braun A, Hutet E, Le Potier MF, Saalmuller A, Pfaff E, Büttner M.** 2007. Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* **25**:5915 – 5926.
51. **Henkel M, Planz O, Fischer T, Stitz L, Rziha H-J.** 2005. Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J. Virol.* **79**:314 – 325.
52. **Dory D, Fischer T, Beven V, Cariolet R, Rziha H-J, Jestin A.** 2006. Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against pseudorabies virus (herpes suid 1). *Vaccine* **24**:6256 – 6263.
53. **van Rooij EM, Rijsewijk FA, Moonen-Leusen HW, Bianchi AT, Rziha H-J.** 2010. Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *Vaccine* **28**:1808 – 1813.
54. **Klingen Y, Conzelmann KK, Finke S.** 2008. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J. Virol.* **82**:237 – 245.
55. **Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H.** 1984. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* **312**:548 – 551.
56. **Le Gros GS, Prestidge RL, Watson JD.** 1983. In-vivo modulation of thymus-derived lymphocytes with monoclonal antibodies in mice. I. Effect of anti-Thy-1 antibody on the tissue distribution of lymphocytes. *Immunology* **50**:537 – 546.
57. **Brun A, Albina E, Barret T, Chapman DA, Czub M, Dixon LK, Keil GM, Klonjowski B, Le Potier MF, Libeau G, Ortego J, Richardson J, Takamatsu HH.** 2008. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* **26**:6508 – 6528.
58. **Li J, Faber M, Papaneri A, Faber ML, McGettigan JP, Schnell MJ, Dietzschold B.** 2006. A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. *Virology* **356**:147 – 154.
59. **Dietzschold B, Tollis M, Rupprecht CE, Celis E, Koprowski H.** 1987. Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: cross-protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. *J. Infect. Dis.* **156**:815 – 822.
60. **Gulati U, Kumari K, Wu W, Keitel WA, Air GM.** 2005. Amount and avidity of serum antibodies against native glycoproteins and denatured virus after repeated influenza whole-virus vaccination. *Vaccine* **23**:1414 – 1425.
61. **Kanesa-thasan N, Smucny JJ, Hoke CH, Marks DH, Konishi E, Kurane I, Tang DB, Vaughn DW, Mason PW, Shope RE.** 2000. Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus—poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* **19**:483 – 491.
62. **Kundig TM, Kalberer CP, Hengartner H, Zinkernagel RM.** 1993. Vaccination with two different vaccinia recombinant viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. *Vaccine* **11**:1154 – 1158.
63. **McCoy K, Tatsis N, Koriath-Schmitz B, Lasaro MO, Hensley SE, Lin SW, Li Y, Giles-Davis W, Cun A, Zhou D, Xiang Z, Letvin NL, Ertl HC.** 2007. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. *J. Virol.* **81**:6594 – 6604.
64. **Sharpe S, Polyanskaya N, Dennis M, Sutter G, Hanke T, Erfle V, Hirsch V, Cranage M.** 2001. Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of pre-existing anti-vector immunity. *J. Gen. Virol.* **82**:2215 – 2223.
65. **Whitmire JK.** 2011. Induction and function of virus-specific CD4 T cell responses. *Virology* **411**:216 – 228.
66. **Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM.** 2012. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **12**:136 – 148.
67. **Perry LL, Lodmell DL.** 1991. Role of CD4 and CD8 T cells in murine resistance to street rabies virus. *J. Virol.* **65**:3429 – 3434.
68. **Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H, Dietzschold B.** 1998. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.* **72**:3711 – 3719.
69. **Gherardi MM, Esteban M.** 2005. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J. Gen. Virol.* **86**:2925 – 2936.
70. **Minke JM, Bouvet J, Cliquet F, Wasniewski M, Guiot AL, Lemaitre L, Cariou C, Cozette V, Vergne L, Guigal PM.** 2009. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet. Microbiol.* **133**:283 – 286.
71. **Hu R, Zhang S, Fooks AR, Yuan H, Liu Y, Li H, Tu C, Xia X, Xiao Y.** 2006. Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microbes Infect.* **8**:1090 – 1097.

New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus

Jörg Rohde¹, Ralf Amann², Hanns-Joachim Rziha^{1*}

Institute of Immunology, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Island of Riems, Greifswald, Germany

Abstract

Previously we demonstrated the versatile utility of the *Parapoxvirus* Orf virus (ORFV) as a vector platform for the development of potent recombinant vaccines. In this study we present the generation of new ORFV recombinants expressing the hemagglutinin (HA) or nucleoprotein (NP) of the highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) H5N1. Correct foreign gene expression was examined *in vitro* by immunofluorescence, Western blotting and flow cytometry. The protective potential of both recombinants was evaluated in the mouse challenge model. Despite adequate expression of NP, the recombinant D1701-V-NPh5 completely failed to protect mice from lethal challenge. However, the H5 HA-expressing recombinant D1701-V-HAh5n mediated solid protection in a dose-dependent manner. Two intramuscular (i.m.) injections of the HA-expressing recombinant protected all animals from lethal HPAIV infection without loss of body weight. Notably, the immunized mice resisted cross-clade H5N1 and heterologous H1N1 (strain PR8) influenza virus challenge. *In vivo* antibody-mediated depletion of CD4-positive and/or CD8-positive T-cell subpopulations during immunization and/or challenge infection implicated the relevance of CD4-positive T-cells for induction of protective immunity by D1701-V-HAh5n, whereas the absence of CD8-positive T-cells did not significantly influence protection. In summary, this study validates the potential of the ORFV vectored vaccines also to combat HPAIV.

Citation: Rohde J, Amann R, Rziha H-J (2013) New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus. PLoS ONE 8(12): e83802. doi:10.1371/journal.pone.0083802

Editor: Matthias Johannes Schnell, Thomas Jefferson University, United States of America

Received: September 30, 2013; **Accepted:** November 16, 2013; **Published:** December 20, 2013

Copyright: © 2013 Rohde et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Part of the work was financially supported by Pfizer Animal Health. No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The indicated funding from Pfizer-Animal Health did not influence at any time the planning, performance, analysis, interpretation and discussion of the presented results. It also does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: achim.rziha@fli.bund.de

¹ Current address: Department of Immunology, Interfaculty Institute for Cell Biology, University Tuebingen, Tuebingen, Germany.

Introduction

Influenza A virus is a member of the *Orthomyxoviridae* and can infect numerous hosts, including aquatic birds, poultry, swine and humans (for review [1]). Its negative-sense, single-stranded RNA genome is composed of eight gene segments encoding the viral proteins. The genetic variation of the surface glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) is the basis for further subtyping influenza A viruses in H1 to H16 and N1–N9, respectively [2], and a novel subtype H17N10 has recently been detected in bats [3,4]. Cross-species transmission of influenza viruses to humans has been documented frequently, and in 2009 the new H1N1 influenza A virus (pH1N1) resulted from recombination of gene segments from human, swine and avian influenza A virus causing a new pandemic human flu [5]. The highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) H5N1 has caused outbreaks in wild birds and poultry leading to severe, fatal disease [6], and transmission from birds to humans was reported [1,7]. The World Health Organization registers approximately 600 confirmed human H5N1 virus infections, approximately 60% resulting in death (WHO, August 2013; http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20130829_CumulativeNumberH5N1cases.pdf). Thus, serious concerns exist about the emergence of a pandemic H5N1 strain transmissible

between humans. The trimeric HA is an important viral factor determining virulence, host tropism and transmission of influenza A virus [8,9,10,11]. For entering the host cell the HA0 precursor form of the trimeric HA must be proteolytically cleaved into HA1, which binds to sialic acid-containing host cell receptors, and into HA2, which mediates membrane fusion. This cleavage site differs amongst HA subtypes, which in part, can determine the degree of virulence (for review [12]). Influenza virus infections can be effectively controlled and prevented by vaccination. Currently, inactivated vaccines are produced according to the HA and NA subtypes of circulating virus strains. Virus-neutralizing and receptor-blocking antibodies directed against HA1, the globular head of HA, can mediate sterilizing immunity provided that they have the proper strain-specificity. However, the rapid mutation rate of NA and of HA1 can impede the production of effective vaccines matching currently circulating virus types. Therefore, several attempts are reported for the generation of effective, more universal influenza virus vaccines (reviewed in [13]). Plasmid DNA vaccines expressing consensus sequences of HA and NA mounted cross-reactive cellular and humoral immune responses [14,15] and were able to protect mice against divergent H5N1 strains [16]. Other approaches comprise the development of headless constructs, also to limit the suggested immunodominance of the

globular head of HA [17]. Recent reports on the construction of various chimeric head and stalk HA proteins or functional influenza viruses expressing those chimeras offer another strategy for cross-protecting vaccines [18,19].

Besides the humoral immune response against Influenza virus, T-cells that either eliminate infected cells or help B-cells to mount a more rapid and efficient neutralizing antibody response are also important to relieve the disease [20]. Especially cytolytic and cytokine-secreting T-cells directed to conserved influenza virus proteins, like the nucleoprotein (NP) or matrix protein (M1), can represent effectors in protective immunity [21,22,23] and are considered another promising approach for the development of more universal influenza vaccines [24,25,26]. HA epitopes, which are recognized by virus-specific human and mouse CD8-positive cytolytic T-cells, have also been identified (reviewed in [27]). The role of additional viral targets in adaptive, protective immunity against influenza A virus has recently been reviewed comprehensively [28,29].

Various strategies are pursued to develop improved, safe, effective and cross-protecting vaccines not only against H5N1 strains but also against different influenza A virus subtypes. Those approaches comprise the generation of baculovirus-based multivalent vaccines [30] or self-assembling viral-like particles [31,32], or DNA vaccines preferentially now in prime boost combinations with e.g. adenovirus recombinants [13]. The efficient and fast technology of reverse genetics allows the safe and effective creation of recombinant or attenuated influenza viruses with almost every desired gene alteration and constellation (reviewed in [33]). Moreover, attenuated influenza virus designed by a synthetic engineering approach to recode and synthesize the viral genome induced protective immunity in mice [34]. Finally, very recently the successful vaccination with optimized mRNA of HA, NA, and NP was reported, which stimulated T- and B-cell dependent protection against influenza A H1N1, H3N2 and H5N1 viruses [35]. Poxvirus-vectored vaccines are attractive due to the possibility for inserting multiple antigens by established methods, and their potential of rapid stimulation of good humoral and cell-mediated immune responses also mediating protection against e.g. HPAIV challenge infection [36,37,38,39]. For safety reasons attenuated or replication-deficient poxviral vectors have been developed and used to mount protective immune responses against different influenza A virus subtypes [40,41].

The *Orf Virus* (ORFV) from the genus *Parapoxviridae* (PPV) represents a promising candidate for novel vectored vaccines [42,43,44,45,46,47,48,49]. ORFV has a very restricted host range *in vivo* and *in vitro*, a restricted skin tropism and an absence of systemic infection [50]. Ideal vector vaccine properties are the short-lived ORFV vector-specific immunity allowing repeated immunizations, and still not entirely understood immunomodulating properties, which lead to the induction of strong innate and adaptive Th1-Th2 balanced immune responses [44,45,50,51]. The inserted foreign genes are regulated by an early ORFV promoter, which results in the induction of foreign antigen-specific immunity without the need of replication and multiplication of mature, infectious ORFV.

The present study describes the generation of new ORFV recombinants expressing the HPAIV genes H5 HA (D1701-V-HAh5n) or H5 NP (D1701-V-NPh5). After demonstrating proper expression of the inserted HPAIV genes, the protective potential of both recombinants was investigated by challenge infection of mice. Whereas the HA-expressing recombinant was able to protect all mice against lethal H5N1 virus challenge, the NP-expressing recombinant failed to mount protective immunity. Intramuscular (i.m.) immunization with D1701-V-HAh5n mediated cross-clade

(H5N1 clades 1, 2.2.2, and 2.2.3) and heterosubtypic (H1N1) protection in different mouse strains. *In vivo* T-cell depletion experiments and a dose dependent increase of H5 HA-specific antibodies indicated that both arms of the immune response seem to be essential for protection after immunization with the HA-expressing ORFV recombinant.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal studies were reviewed and approved by the local authorities (Regional council of Tuebingen) and were carried out in strict accordance with the regulations of the German animal welfare law set forth by this authority (permit number FLI 250/10).

Cells and viruses

Propagation and titration of ORFV in Vero cells has been described earlier [44]. The highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses (HPAIV) A/Mallard/Bavaria/1/2006 (MB1, clade 2.2.1), A/mute swan/Germany/R1349/07 (SN1, clade 2.2.3), and the H1N1 human influenza A virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) were kindly provided by O. Planz (Univ. Tübingen, Dep. Immunology) and L. Stütz (Friedrich-Loeffler-Institut, Germany). The HPAIV were propagated and titrated as described [20]. For inactivation, the MB1 virus was incubated with 0.02% formalin at 4°C for three days and then stored at -20°C.

Generation and selection of new ORFV recombinants

The HA coding sequence of H5N1 influenza A strain Vietnam/1203/2004 (Acc. no. AY818135) and the NP coding sequence of strain MB1 (Acc. no. DQ792924) were chemically synthesized by GeneArt (Regensburg, Germany) changing poxviral early transcript stop motifs (TTTTTCT) by silent mutations from codon TTT to TTC. In addition, new restriction sites were added to the 5' and 3' ends of both genes allowing to clone the HA gene as a HindIII – BamHI fragment and the NP gene as a KpnI – EcoRI fragment into plasmid pdV-Rec1 [44]. Correct insertion of the AIV genes into the obtained transfer plasmids pdV-HAh5n3 and pdV-NPh5n were tested by DNA-sequencing and restriction enzyme analysis (data not shown). Electroporation of *LacZ* positive ORFV D1701-VrV-infected Vero cells (moi 0.1–0.2) with 2 µg pdV-HAh5n3 DNA or pdV-NPh5n DNA, respectively, and selection of the new ORFV recombinants was described recently [46]. Single plaque PCR was used to screen virus progeny positive for the HA or the NP gene and negative for the *LacZ* gene of the parental virus D1701-VrV. Oligonucleotides used as PCR primers were purchased from Metabion (Martinsried, Germany). H5 HA-specific amplification (459 bp) was achieved with 3.8 pmol primer HA5Fn 5'-GTG AGC AGC GCA TGT CCT TAC CAG-3' and 3.8 pmol primer HA5-Rnn 5'-CTC CCA TAG GGG TCT GGC ACT TTG-3', NP-specific amplification (452 bp) with 4 pmol primer NP5-F 5'-GGA GGA TTT GGC GTC AAG CGA AC-3' and 3.8 pmol primer NP5-R 5'-CTC TCA GGA TGA GTG CAG ACC TTG-3'. The PCR reactions contained 2X Reddy mix (ABgene, Fisher Scientific, Germany) and were denatured at 98°C for 2 minutes followed by 35 cycles at 96°C (1 min), annealing (30 sec) at 66°C for HA or 70°C for NP, and extension at 72°C (30 sec) in a T3-Thermocycler (Biometra, Germany). The amplification of the *LacZ* gene fragment was performed as described [46]. PCR amplicons were detected by electrophoresis using 0.8 % (w/v) agarose-ethidium bromide gels.

Antibodies

Specific detection of H5 HA was accomplished with the mouse monoclonal antibody (mAb) 15A3 (Rockland, USA) and the polyclonal rabbit LGL antiserum (kindly provided by M. Büttner, Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany). The mouse mAb 2442 (Abnova, Germany) was used for specific recognition of the NP protein. The mAb 4D9 [52] allowed detection of the ORFV major envelope protein (F1L), the β -actin specific antibody was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated (Fisher Scientific, Invitrogen, Germany), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG (Dianova, Germany) and goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody (Dianova, Germany) were used as second antibodies.

Western blot analysis

Non-infected or infected Vero cells were suspended in 1% (v/v) Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Germany) in PBS and incubated for 30 minutes at 4°C. Western blot analysis was performed as described [46]. Protein concentration of the lysates was determined using Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Germany) according to the recommendation of the manufacturer. Afterwards, the lysates were adjusted to equal protein concentrations. The antibodies were diluted in 1X RotiBlock (Roth, Germany) and the substrate Immobilon Western HRP (Millipore, Germany) was used for enhanced chemiluminescence (ECL). X-ray films for ECL were purchased from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Germany).

Immune peroxidase monolayer assay (IPMA)

Expression of inserted HA and NP genes in recombinant-infected cells was demonstrated by IPMA exactly as described [42] using HRP substrate (Vector NovaRED, USA).

Immunofluorescence

Vero cells infected with the ORFV recombinants were grown in chamber slides (BD Biosciences, Germany), fixed with 2% (v/v) methanol-free formaldehyde (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Germany) in PBS and permeabilized with 0.2% Triton-X100 (Sigma, Germany) as reported [46]. Microscopy was performed with ApoTome confocal fluorescence microscope (Axiovert 200 M; Zeiss, Germany) and AxioVision Rel. 4.8 software (Zeiss).

Flow cytometry

Vero cells were harvested by trypsinization and washed once with FACS buffer (10% v/v foetal bovine serum, 0.1% v/v sodium azide in PBS). Approximately 10^6 cells were stained with H5 HA-specific primary antibody mAb15A3 for 30 minutes at 4°C. After three times washing the cells were stained in the dark with FITC-conjugated secondary antibody for another 30 minutes at 4°C. To exclude nonviable cells staining with 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D; BD Bioscience, Germany) was performed 10 minutes prior to flow cytometry with FACSCalibur (BD Bioscience, Germany) and CellQuest Pro (BD Bioscience, Germany). Gates were set for viable cells negative for 7-AAD.

Vaccination of mice and Influenza A virus challenge

BALB/c and C57BL/6 mice at the age of 8–12 weeks were obtained from the animal breeding facility of the Friedrich-Loeffler-Institut (Germany). Mice were instilled intranasally (i.n.) under anaesthesia [20] using 50 μ l of the indicated mouse 50% lethal dose (MLD50) of HPAIV. For BALB/c mice $1 \times$ MLD50 corresponded to 7×10^1 plaque-forming units (pfu) of strain MB1,

Table 1. Monitoring the success of T-cell depletion.

Days ^{a)}	CD4-positive T-cells (%)	CD8-positive T-cells (%)
2	0.20 (n=4: 0.00–0.80) ^{b)}	0.03 (n=5: 0.00–0.07)
6	0.15 (n=4: 0.00–0.39)	0.03 (n=5: 0.00–0.08)
9	0.06 (n=4: 0.01–0.06)	0.01 (n=5: 0.00–0.04)
14	1.55 (n=4: 0.34–3.10)	0.22 (n=5: 0.06–0.45)

^{a)}Days after second antibody treatment.

^{b)}Mean percentage; number of animals (n) and range of percentage is given in parenthesis.

doi:10.1371/journal.pone.0083802.t001

2×10^1 pfu of strain SN1 and 1×10^4 pfu of strain PR8. For C57BL/6 mice 2×10^3 pfu of strain MB1, 1.4×10^3 pfu of strain PR8 matched to $1 \times$ MLD50. Weight loss and survival of infected mice was daily monitored during 14 days after challenge infection. According to the German animal-protection law, animals that lost approximately 25% of their body weight were sacrificed, documented as dead, and thereafter excluded from calculation of the body weight graph. The challenge experiments were performed under BSL3 conditions at the Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen (Germany).

In vivo depletion of T-cell subpopulations

Monoclonal antibodies directed against murine CD4 (mAb YTS 191.1) or CD8 (mAb YTS 169.4) [53] were kindly provided by L. Stütz, (Friedrich-Loeffler-Institut, Germany) and used for depletion of T-cell subsets as described recently [42]. The 1:25 diluted mAbs were administered intraperitoneally, and 0.2 ml of each mAb was applied per mouse or 0.4 ml of an equal mixture of

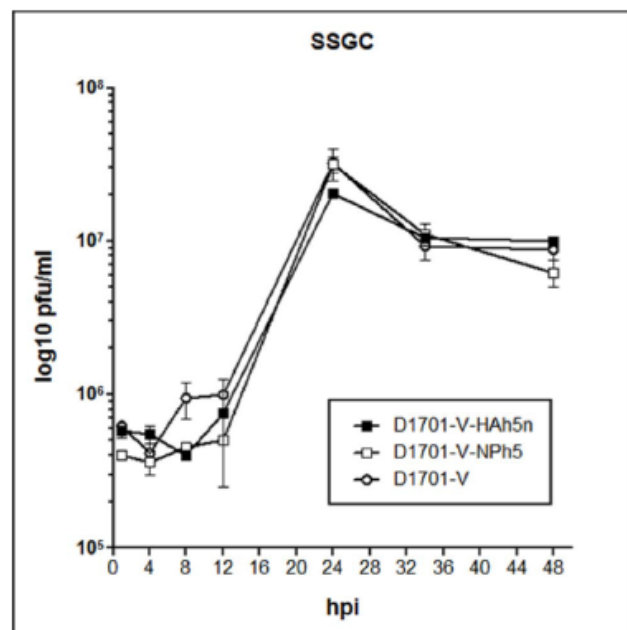


Figure 1. Single step growth curve. Comparison of the *in vitro* growth characteristics of D1701-V-HAh5n, D1701-V-NPh5 and parental D1701-V. Vero cells were infected with moi 5.0 and total cell lysates were taken for virus titration at the indicated hours post infection (hpi). The results demonstrate very similar growth kinetics of both ORFV recombinants and the parental D1701-V.
doi:10.1371/journal.pone.0083802.g001

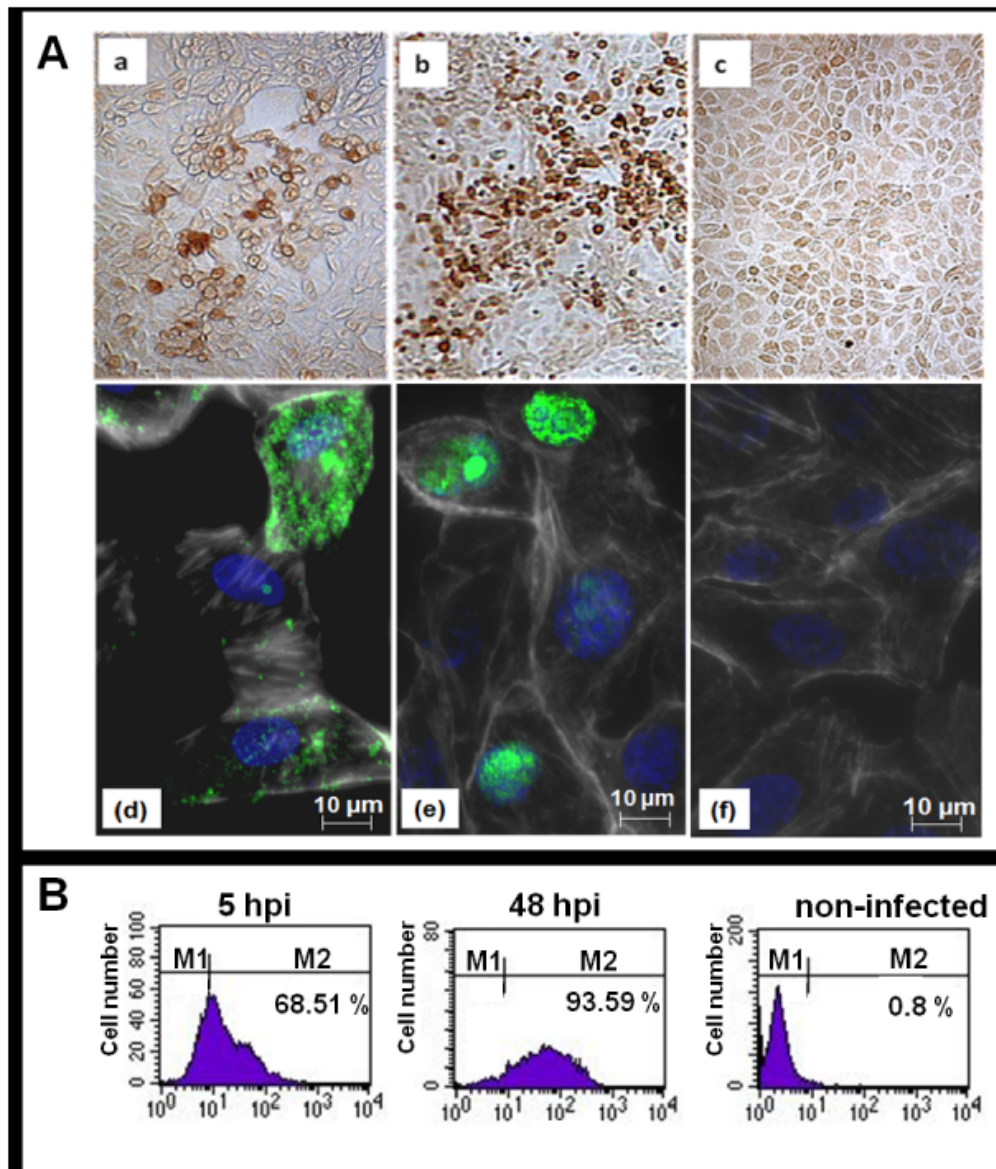


Figure 2. AIV gene expression of D1701-V-HAh5n and D1701-V-NPh5. (A) Expression of HA and NP in ORFV recombinant-infected cells demonstrated by IPMA (panel a–c) and by immunofluorescence (panel d–f). Vero cells were infected with D1701-V-HAh5n (panel a and d), D1701-V-NPh5 (panel b and e) or non-infected (panel c and f). Three days post infection transgene expression (brown) is detected with the HA-specific, 1:250 diluted LGL antiserum (panel a, magnification $\times 40$) and with the NP-specific, 1: 500 diluted mAb 2442 (panel b, magnification $\times 20$), whereas non-infected cells (panel c, magnification $\times 40$) remained unstained. HA-specific immunofluorescence (green) is shown 24 hpi with the 1:250 diluted mAb 15A3 (panel d), and nuclear NP expression with the 1:1,000 diluted mAb 2442 (panel e). Non-infected cells as negative control are depicted in panel f. The cell nuclei are DAPI-stained (blue) and the actin cell skeleton is stained by Phalloidin-CF647 (white). (B) Cell surface expression of H5 HA was quantified by flow cytometry. Vero cells were harvested 5 hours (5 hpi) and 48 hours (48 hpi) after D1701-V-HAh5n infection (moi 1.0) and stained with mAb 15A3. The histograms show the cell number (ordinate) plotted against the fluorescence intensity (abscissa) gated for 7-AAD negative, viable cells. HA-positive cells are gated in M2, negative cells in M1. Distinct H5 HA cell surface expression was demonstrable already 5 hpi increasing with later times after infection.

doi:10.1371/journal.pone.0083802.g002

both mAb for the simultaneous depletion of CD4- and CD8-positive T-cells. The timeline of the injections of mAb is detailed in the Results part. Efficacy of depletion and kinetic of T-cell repopulation was monitored by flow cytometry in a preliminary experiment. Blood was taken from the retro-orbital plexus 2, 6, 9, and 14 days after antibody-treatment at days -2 and 0 . The gated lymphocytes were used for double-staining with PE- or FITC-labelled CD3- and CD4- or CD3- and CD8-specific antibodies (BD Biosciences, Germany). Non-depleted mice contained on the

average approximately 30 % CD4-positive T-cells ($n = 4$: 20.6%–33.5%) and 5 % CD8-positive T-cells ($n = 4$: 3.8%–5.9%), respectively. After antibody treatment more than 99% of each T-cell subpopulation remained absent for at least 9 days, before T-cell repopulation started (Table 1), similarly as reported earlier [53,54].

The mice (BALB/c; $n = 8$) were i.m. immunized twice (14 days interval) with 10^7 pfu of the recombinant D1701-V-HAh5n.

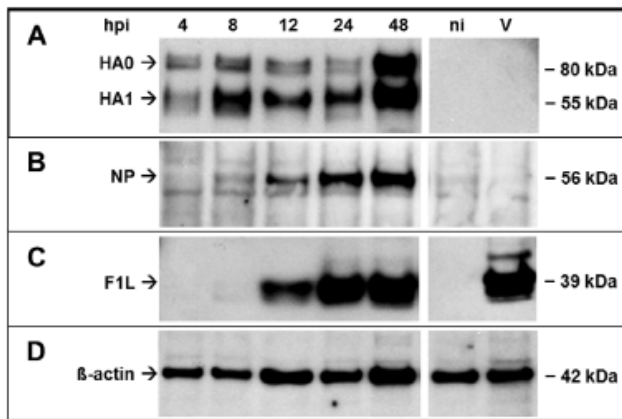


Figure 3. Western Blot analysis for the detection of HA and NP. Cell lysates were harvested at indicated hours post infection (hpi) with (A, C) D1701-V-HAh5n (moi 3.0) or (B, D) D1701-V-NPh5 (moi 1.0). As controls non-infected cells (lanes ni) or parental D1701-V- (moi 1.0) infected cells (lanes V) were tested at 24 hpi. (A) H5 HA was detected with the specific mAb 15A3 (diluted 1:5,000), (B) NP was detected with specific mAb 2442 (diluted 1:2,000). (C) The mAb 4D9 (diluted 1:800) was used to detect the ORFV major envelope protein F1L expressed at late times pi. (D) Beta-actin was demonstrated as loading control. The apparent mol. wt. of the specific proteins is indicated in kilodalton (kDa).

doi:10.1371/journal.pone.0083802.g003

Fourteen days after last vaccination the i.n. challenge infection was performed with $20 \times \text{MLD}_{50}$ HPAIV MB1.

Hemagglutination inhibition (HI) test

HI test was performed according to the OIE (World Organization for Animal Health) instruction manual (Manual of diagnostic tests and Vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004) in 96-well microtiter plates (Greiner bio-one, Germany) using 25 μl 1% (v/v) suspension of chicken red blood cells in PBS. Twenty-five μl of two-fold dilutions of heat-inactivated (30 min, 56°C) sera were incubated for 40 min at RT with 4 hemagglutination units (HAU) of formalin-inactivated H5N1 MB1 virus. The HI titre was defined as the reciprocal of the highest serum dilution inhibiting hemagglutination.

Results

Generation of the new ORFV recombinants

The transfer plasmids containing the H5 HA gene (pdV-HAh5n3) or the NP gene (pdV-NPh5n) were used for electroporation of Vero cells infected with D1701-VrV, which expresses the *LacZ* gene and enables the blue-white selection as described [44,46]. New white ORFV recombinants were selected by PCR as described in Material and Methods. Single plaque virus isolates of D1701-V-HAh5n and D1701-V-NPh5 were subject to five and four additional rounds of plaque purification, respectively, to obtain genetically homogeneous new ORFV recombinants. Single step growth curve experiments demonstrated that the insertion of the H5 HA or NP gene had no influence on the *in vitro* growth characteristics of both ORFV recombinants compared to the parental ORFV D1701-V (Fig. 1). Transgene expression of the virus plaque isolates was tested by IPMA. As shown in Figure 2A (panel a–c) expression of the H5 HA and NP transgene in ORFV recombinant-infected cells was demonstrable by specific brown immune staining (Fig. 2A, panel a, b), but not in non-infected cells (Fig. 2A, panel c) or in cells infected with the parental D1701-VrV

(data not shown). Correct insertion of the HA or NP gene into the *vegF-e* gene locus of D1701-V was verified by PCR and Southern blot hybridization of recombinant virus DNA (data not shown).

Expression of the H5 HA and NP gene

Indirect immunofluorescence assays demonstrated expression of H5 HA and NP gene in recombinant virus-infected cells (Fig. 2A). As expected, the NP gene was expressed in the nuclei of D1701-V-NPh5n-infected cells (Fig. 2A, panel e), whereas non-infected (Fig. 2A, panel f) or parental virus-infected Vero cells (data not shown) remained negative. Cell surface expression of H5 HA was further demonstrated by flow cytometry of D1701-V-HAh5n-infected Vero cells. Already five hours after infection (hpi) 68.5% of the infected cells expressed the H5 HA on the cell surface increasing to 93.6% at 48 hpi (Fig. 2B).

Expression of the inserted influenza A virus HA and NP gene was also inspected by Western blot analysis at different times after infection of Vero cells with D1701-V-HAh5n or D1701-V-NPh5. Using mAb 15A3 the expression of the H5 HA was detectable from 4 hpi onwards with increasing amounts at later times after infection (Fig. 3A). At all tested time points after infection the precursor protein HA0 was recognized as a double band migrating with a mol. wt. of approximately 80 kDa as well as the subunit HA1 (55 kDa). The subunit HA2 is not recognized by the used antibody. Non-infected (ni) cells and cells infected with parental D1701-V (V) remained negative. The NP protein (56 kDa) was demonstrable with mAb 2442 by Western blot analysis (Fig. 3B). In the presented experiment, protein lysates were obtained from cells infected with a lower moi (1.0) of D1701-V-NPh5 in contrast to the D1701-V-HAh5n lysates (moi = 3.0), which explains the weaker NP expression compared to HA. In addition, early NP expression could be unequivocally proven by Northern blot analysis (data not shown). The late ORFV major envelope protein F1L (39 kDa) was recognized beyond 12 hpi with the mAb 4D9, which reflected multiplication of the ORFV recombinants in Vero cells (Fig. 3C). Nearly comparable protein loading was verified by detection of cellular β -actin (Fig. 3D).

Protection of mice from challenge with divergent H5N1 strains

The protective potential of the new ORFV recombinants was evaluated first in C57BL/6 mice after i.m. immunization with different doses followed by i.n. challenge infection with strain MB1 ($20 \times \text{MLD}_{50}$). A single immunization with 1×10^5 pfu of D1701-V-HAh5n was not able to mediate proper protection against the MB1 challenge infection. Except of 2 mice, all animals suffered from severe disease and 6 out of the 12 mice had to be euthanized at days 6 to 8 after challenge (Fig. 4A). The surviving mice gradually lost body weight 2 to 4 days after challenge (Fig. 4B), individually ranging from 8% to 15%, and one animal lost 24% of weight. Thereafter all survivors recovered and regained their body weight (Fig. 4B). A booster immunization with 10^5 pfu improved protection rate to 89% survival, 8 out of 9 mice survived the challenge (Fig. 4A). One survivor suffered from severe illness associated with 24% weight loss before recovering, whereas the body weight loss of the other 7 mice ranged only from 8% to 17% around 3 days after challenge (Fig. 4B, mean 12%). Increasing the immunization dosage of D1701-V-HAh5n to 1×10^6 pfu, again as a single application mediated only partial protection from challenge (Fig. 4C) and from body weight loss (Fig. 4D). The 4 surviving animals experienced weight loss of 7%, 11%, 21%, and 24%, respectively, before recovering beyond day 4 (Fig. 4D). Two immunizations with 1×10^6 pfu, however, conferred complete protection from lethal challenge (Fig. 4C and 4D). Only 3 mice

lost 11% body weight, whereas the other mice sustained their body weight and remained healthy.

The administration of 10^7 pfu of D1701-V-HA_{h5n} clearly improved the generation of protective immunity against $20 \times$ MLD50 MB1 challenge. Single vaccination with that immuniza-

tion dosage was sufficient to mediate 100% survival (Fig. 4E). At day 3 after challenge a mean body weight loss of 18% was observed (individually ranging from 14% to 23%), but thereafter all mice fully recovered and regained their body weight (Fig. 4F). All C57BL/6 mice receiving 2 doses of 1×10^7 pfu of that

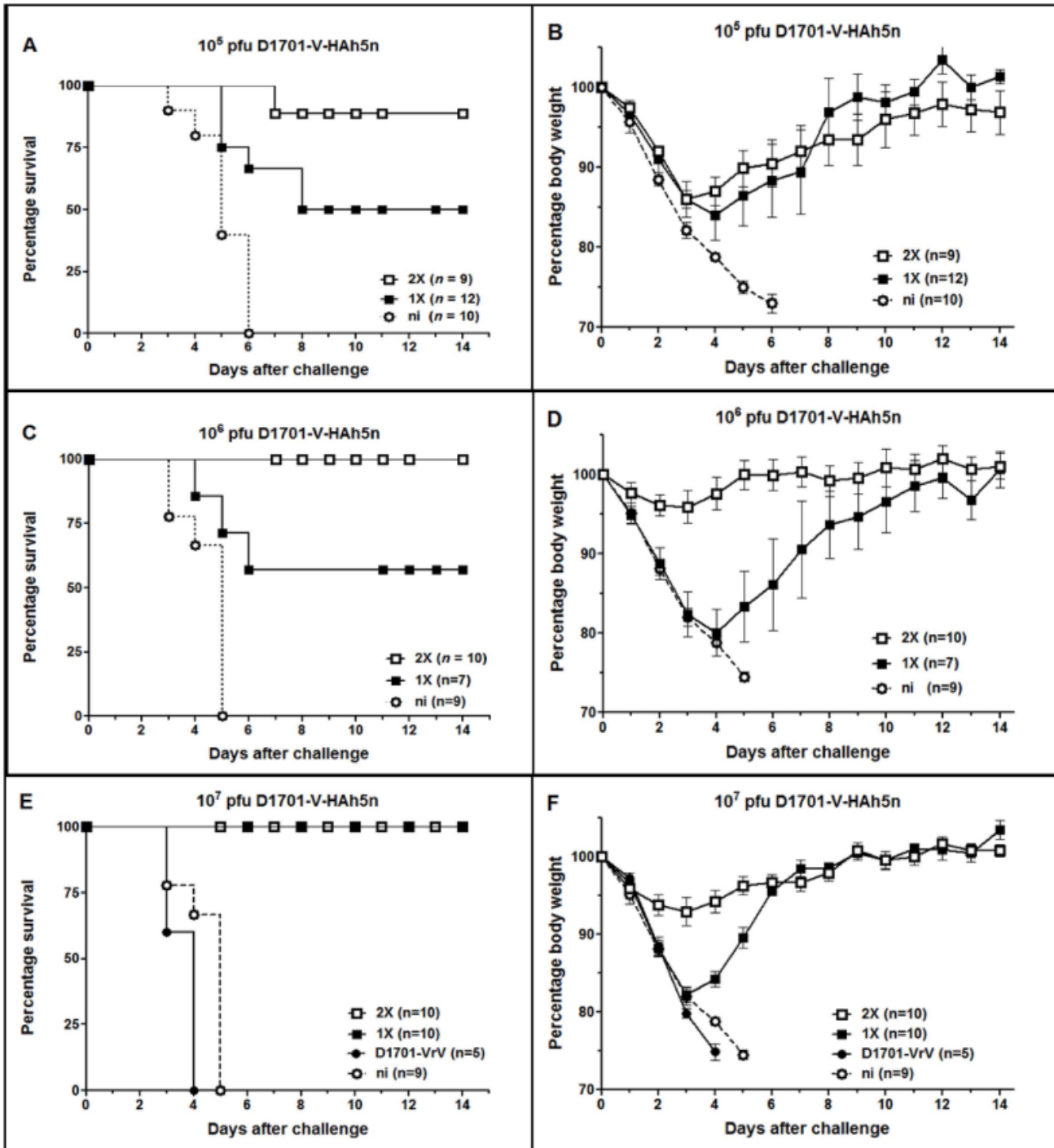


Figure 4. Protective efficacy of D1701-V-HA_{h5n} in C57BL/6 mice. Survival rates (A, C, E) and mean body weight changes (B, D, F) of C57BL/6 mice i.m. immunized once (1X) or twice (2X) with the indicated pfu of D1701-V-HA_{h5n}. The mice were monitored during 14 days after i.n. challenge infection with $20 \times$ MLD50 of H5N1 strain MB1. As controls mice were immunized two times with 10^7 pfu of parental ORFV D1701-VrV (E, F) or were non-immunized (ni). SEM is shown by bars, *n* indicates the total number of mice in each group. Mice exhibiting more than 25% loss of body weight were sacrificed according to the German animal protection law. doi:10.1371/journal.pone.0083802.g004

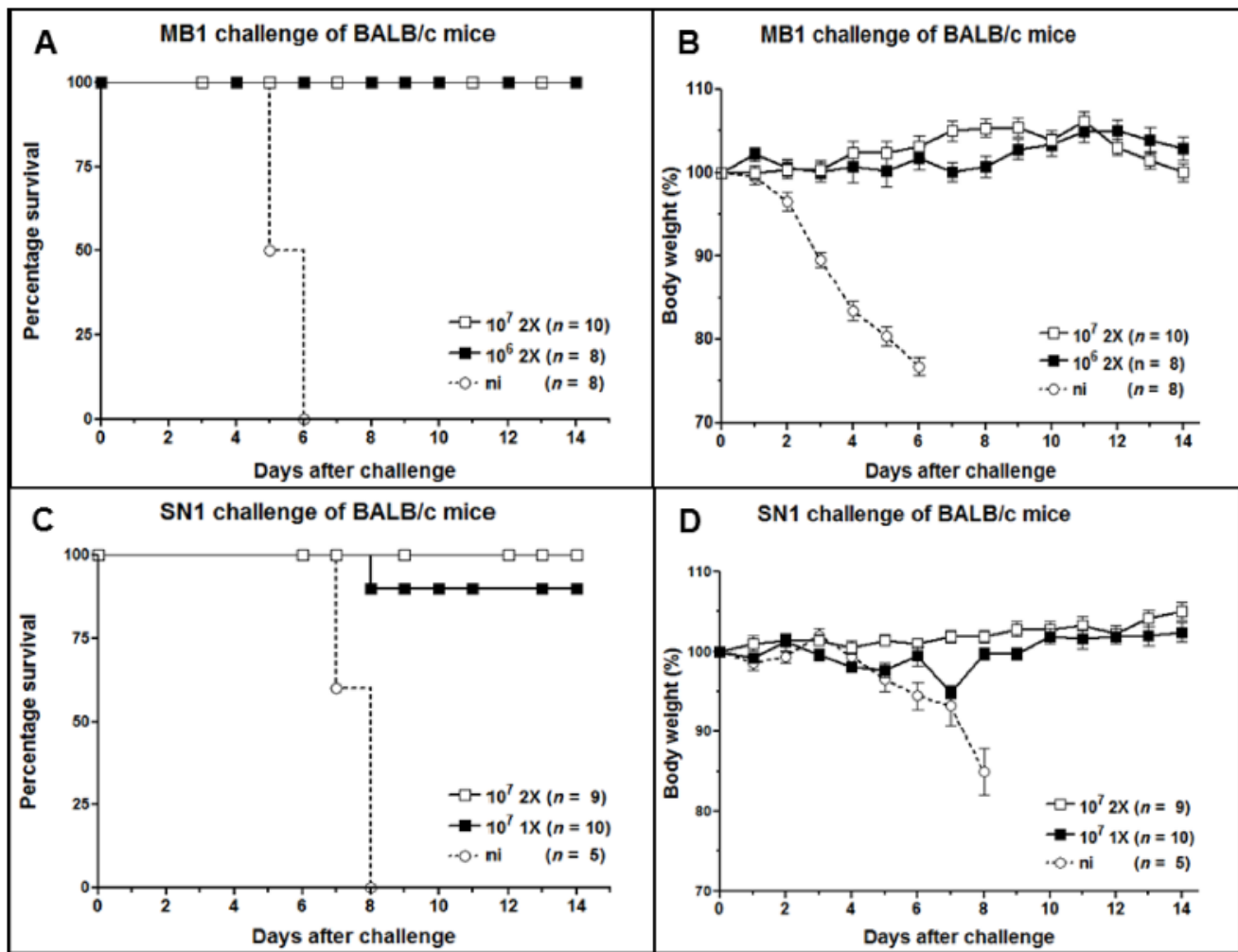


Figure 5. Protection of BALB/c mice from cross-clade HPAIV challenge infection. Survival rates (A, C) and body weight changes (B, D) of BALB/c mice after i.n. challenge with $20\times$ MLD50 of H5N1 strain MB1 (A, B) or SN1 (C, D). Single (1X) or booster (2X) i.m. immunization was performed with 10^6 pfu or 10^7 pfu D1701-V-HA5n and mice were monitored during 14 days after challenge infection. Mean percentage of body weight change is shown (bars indicate SEM), and n indicates the number of mice per group. After approximately 25% loss of body weight mice were sacrificed according to the German animal protection law. doi:10.1371/journal.pone.0083802.g005

recombinant survived the challenge (Fig. 4E) and stayed healthy (Fig. 4F). Only 2 animals exhibited a transient weight loss of 17% until day 3 before also retrieving their original body weight. Control mice receiving 2 injections of 10^7 pfu of the parental ORFV D1701-VrV were not protected against the MB1 challenge infection. Onset of disease and loss of body weight were similar to non-immunized animals, and the mice had to be euthanized 4 days after challenge (Fig. 4E and F).

The NP gene expressing recombinant D1701-V-NPh5 did not confer protection from lethal challenge or prevent morbidity after infection with $20\times$ MLD50 MB1. Groups of mice (C57BL/6, $n = 10$) were i.m. immunized once or twice and neither 10^6 nor 10^7 pfu of D1701-V-NPh5n were able to protect. All animals became diseased and had to be sacrificed during days 4 to 6 after challenge, likewise the non-immunized or parental D1701-VrV vaccinated control animals. Also three doses of 5×10^6 pfu did not confer protection against challenge infection (data not shown).

The protective potential of D1701-V-HA5n was also tested in BALB/c mice, which are approximately 30-fold more susceptible to MB1 challenge as compared to C57BL/6 mice (see Material

and Methods). Two i.m. applications of either 1×10^6 or 1×10^7 pfu also elicited complete protection against $20\times$ MLD50 of strain MB1. All immunized animals survived the lethal challenge without body weight loss or any sign of disease, in contrast to all non-immunized mice (Fig. 5A and B). As for C57BL/6 mice again vaccination with D1701-V-HA5n, expressing H5 HA from a clade 1 HPAIV (A/Vietnam/1203/2004), could protect from a cross-clade challenge infection with HPAIV strain MB1 (clade 2.2.1). Finally we found protection of mice from challenge with $20\times$ MLD50 HPAIV strain SN1, which belongs to influenza A virus clade 2.2.3. As depicted in Figure 5C, 9 out of 10 BALB/c mice survived the challenge infection after a single administration of 10^7 pfu D1701-V-HA5n, and all animals immunized twice survived the challenge. Both groups of mice did not show loss of body weight (Fig. 5D) and the non-immunized mice had to be sacrificed within 8 days after challenge infection.

Protection from challenge with H1N1 strain PR8

After demonstrating the induction of protective immunity against HPAIV H5N1 strains of clade 2, we tested the potential

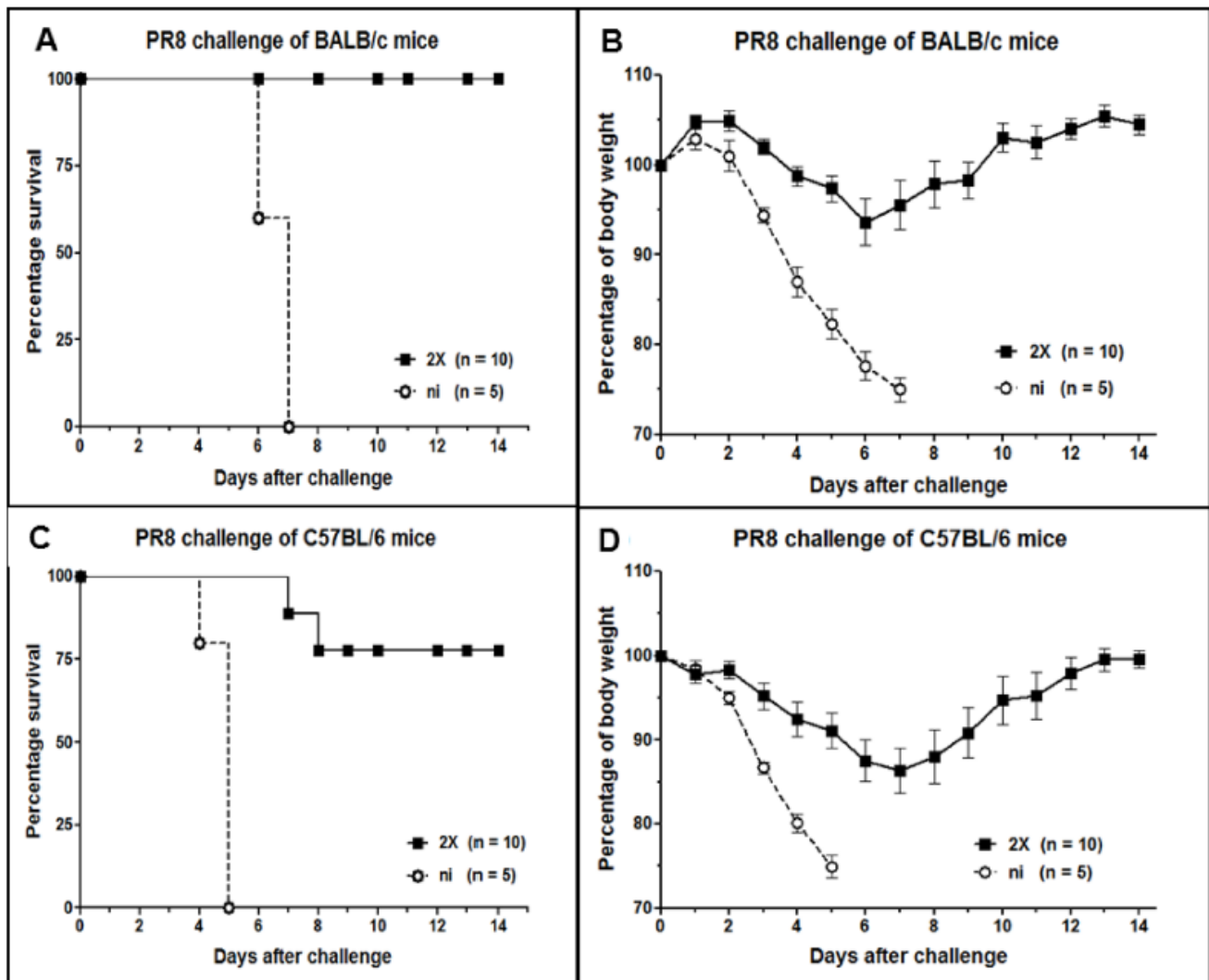


Figure 6. Protection against heterologous influenza A virus H1N1. Survival rates (A, C) and average body weight loss (B, D) of BALB/c (A, B) or C57BL/6 (C, D) mice i.m. immunized twice (2X) with 10^7 pfu D1701-V-HAh5n. The percentage of body weight (bars indicate SEM) was monitored during 14 days after i.n. challenge infection with $50 \times$ MLD50 (A, B) or $20 \times$ MLD50 (C, D) of H1N1 strain PR8. Mice suffering from more than 25% body weight loss were sacrificed. Control non-immunized mice (ni) are shown, *n* indicates the number of mice per group. doi:10.1371/journal.pone.0083802.g006

of the recombinant D1701-V-HAh5n to protect mice against heterologous H1N1 influenza A virus. BALB/c and C57BL/6 mice were i.m. immunized once or twice with 10^7 pfu of D1701-V-HAh5n followed by i.n. challenge infection with lethal doses of the H1N1 strain PR8. Whereas a single immunization was not sufficient to protect BALB/c mice (data not shown), after two vaccinations all BALB/c mice survived the challenge using $50 \times$ MLD50 (Fig. 6A). Transient, slight loss of body weight ranging from 5% to 17% was observed with 6 out of the 10 mice followed by complete recovery during days 7 to 10 (Fig. 6B). On the contrary, 2 out of the 10 double-immunized C57BL/6 mice were not protected from the $20 \times$ MLD50 PR8 challenge (Fig. 6C). Six out of the 8 survivors exhibited weight losses at days 6 to 9 (individually ranging from 8% to 22%) before completely recovering (Fig. 6D). In contrast to H5N1 strain MBI (Fig. 4), the peak of disease was delayed by 4–5 days after challenge infection with H1N1 strain PR8 (Fig. 6). The most pronounced body weight loss was found around day 6–7 (BALB/c mice) or day

7–8 (C57BL/6 mice) after PR8 challenge, but at day 3 after MBI challenge.

Taken together, two immunizations with the H5 HA-expressing ORFV recombinant mediated potent protection of BALB/c or C57BL/6 mice against cross-clade strains MBI or SN1, and against the human H1N1 strain PR8.

HA-specific serum antibody response

The immune response stimulated by D1701-V-HAh5n immunization of C57BL/6 mice was determined by HI tests as described in *Material and Methods*. Figure 7 exemplary demonstrates the HI titres obtained by the i.m. application of 10^7 pfu of D1701-V-HAh5n. One week after prime immunization relevant HA-specific antibodies were detectable in the serum of only one out of 10 mice, but one week after booster immunization all animals except of one had seroconverted (Fig. 7, week 3). The titres of the individual sera ranged between 1:32 and 1:512 resulting in a mean titre of 1:144. Thereafter, only a slight decline to a mean titre of 1:74 was found just before challenge infection (Fig. 7, Ch). Very

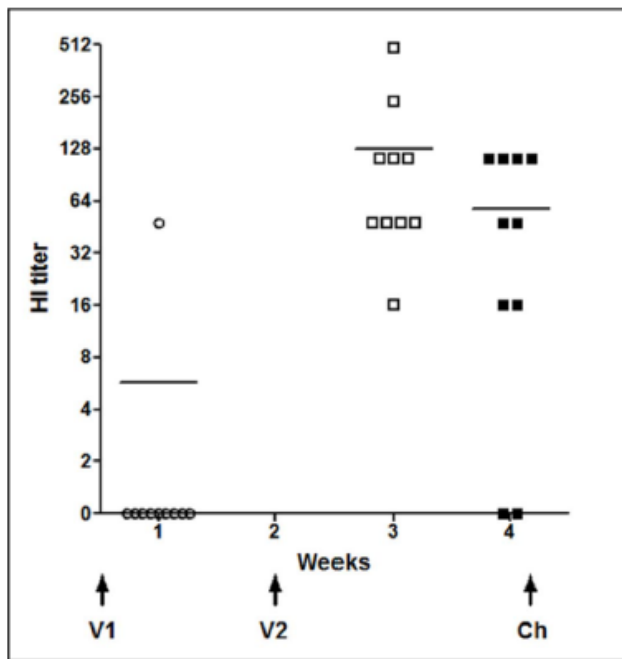


Figure 7. HA-specific serum antibody response. H5 HA-specific serum antibody response of mice elicited after i.m. immunization with 10^7 pfu of D1701-V-HAh5n. The hemagglutination inhibition (HI) titers (reciprocal log₂) of individual mice were determined 1 week after prime immunization (V1), after booster immunization (V2), and at the day of challenge infection (Ch). Sera from control mice immunized twice with 10^7 pfu of D1701-VrV (VrV) displayed unspecific HI titers of 1:16. The lines denote the mean titers calculated from the individual sera. doi:10.1371/journal.pone.0083802.g007

similar HI titres were also found after applying 10^6 pfu of D1701-V-HAh5n (data not shown), whereas after immunization with 10^5 pfu no specific immune response could be detected. Sera from non-immunized mice (data not shown) or control mice immunized twice with 10^7 pfu of the parental virus D1701-VrV exhibited unspecific HI titres of 1:16 (Fig. 7, VrV). In summary, the stimulation of a distinct cross-clade HA serum antibody response needed two immunizations with 10^6 or 10^7 pfu of D1701-V-HAh5n.

Importance of T-cell subsets in D1701-V-HAh5n-immunized mice

To examine the relevance of T-cells for the D1701-V-HAh5n mediated immunity the CD4-positive and/or CD8-positive T-cell subsets of BALB/c mice were depleted *in vivo*. Flow cytometry ensured successful depletion of the T-cells (data not shown). The T-cell populations were removed as described in *Materials and Methods* and depicted in Figure 8, panels c. At first we examined the relevance of T-cells present during H5N1 challenge infection (Fig. 8A, Depletion-A, panel c). In this situation the lack of CD4- and/or of CD8-positive T-cells had no influence on the protective immunity generated by D1701-V-HAh5n. All animals of the 3 groups survived without body weight loss (Fig. 8A, panel a and b).

Next, we analysed the importance of the T-cell subsets for priming the protective anti-HA response (Fig. 8B, depletion-B). After eliminating CD4- or CD8-positive T-cells all immunized mice survived the challenge infection, and after simultaneous removal of both T-cell subsets still 7 out of 8 mice resisted the challenge (Fig. 8B, panel a). All challenged animals depleted for CD8-positive T-cells during immunization retained their body

weight (Fig. 8B, panel b). The lack of CD4-positive T-cells during prime immunization resulted in slight decrease of body weight, ranging from 8% to 18%, during days 3–5 after challenge (Fig. 8B, panel b). Thereafter all animals recovered and regained their original body weight (Fig. 8B, panel b). A similar effect was observed after removing both CD4- and CD8-positive T-cells. Five out of the 7 surviving mice showed weight losses ranging from 9% to 21% around days 4–5 after challenge (Fig. 8B, panel b).

Finally, we tested the effect of the absence of CD4- and/or CD8-positive cells during immunization and challenge infection (Fig. 8C, Depletion-C, panel c). Again, all mice missing only CD8-positive T-cells survived the lethal challenge without loss of body weight (Fig. 8C, panel a, b). After depletion of CD4-positive cells 7 out of 8 immunized mice survived the challenge, one animal exhibited 23% weight loss, the three other mice lost weight between 11% and 14% at days 4 and 5 after challenge (Fig. 8C). Two out of 8 mice did not survive challenge infection after combined removal of CD4- and CD8-positive T-cells (Fig. 8C, panel a). Four mice lost 17% to 22% of body weight at day 6 after challenge before completely recovering (Fig. 8C, panel b). Collectively, the presented results implicate the importance of CD4-positive T-cells for eliciting a robust, protective immunity in mice by the use of the new H5 HA-expressing ORFV recombinant.

Discussion

In previous studies we demonstrated the utility of recombinant ORFV vectored vaccines [42,43,44,45,46]. Here we describe the generation and evaluation of two new ORFV recombinants, which express the H5 HA gene or the NP gene of H5N1 HPAIV. Both AIV genes were expressed under the control of the early promoter of the ORFV *veg-f-e* gene, which allows expression of the inserted genes without the need of recombinant virus multiplication as also reported for other ORFV recombinants [42,44]. In the ORFV-permissive Vero cell line both recombinants demonstrate comparable virus growth kinetics to each other and also to the parental virus D1701-V used for recombinant virus generation. Western blot and immunofluorescence analyses demonstrated correct expression of both genes including the cleavage of the HA precursor protein HA0. The H5 HA was also demonstrable on the surface of the ORFV recombinant infected cells, and the NP protein was expressed in the cell nucleus. HA and NP genes were chosen because both are of importance for the induction of a protective immune response. The crucial role of HA-specific virus-neutralizing antibodies for protection has been manifold documented. We used the H5 HA from influenza strain A/Vietnam/1203/2004, because most H5N1 vaccines based on the HA from the highly virulent human isolates of this Vietnam strain confer solid protection against H5N1 strains [38]. The contribution of the conserved NP antigen to protection is mainly attributed to the activation of cellular immune responses including the induction of specific cytolytic T-cells [23,55,56]. Additionally, it was reported that NP-specific antibodies can exert potent antiviral activity [55].

The protective capacity of the new ORFV recombinants was assessed in the mouse challenge model. The results showed that the ORFV recombinant expressing the conserved NP was not protective in mice. None of the animals survived the lethal challenge infection, also not after three immunizations with the recombinant. It remains to be determined whether the lack of protection can be explained by insufficient activation of T-cells or dendritic cells and/or missing induction of specific antibodies. Both B- and T-cells were reported to be of importance for NP-mediated protection [55]. Another explanation might be that the

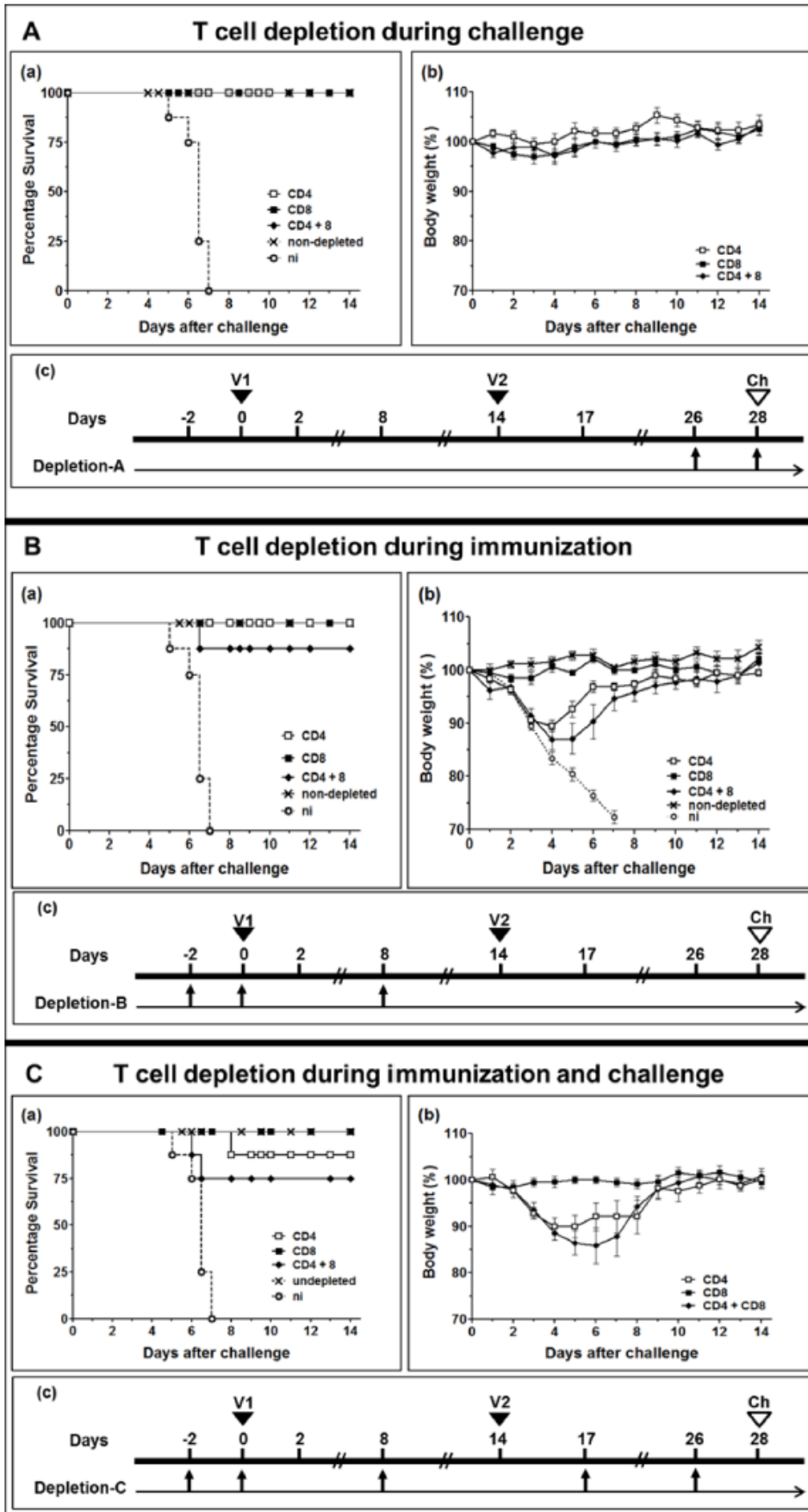


Figure 8. Role of T-cells for D1701-V-HAh5n-induced protection. BALB/c mice were immunized twice (V1 and V2) with 10^7 pfu of D1701-V-HAh5n and depletion was performed during immunization (A), during challenge (B) or during immunization and challenge (C). Challenge (Ch) was performed with $20 \times$ MLD50 strain MB1 and mice were monitored during 14 days after challenge. Survival of mice ($n=8$) is shown in panels a, the mean percentage of body weight (bars indicate SEM) is demonstrated in panels b. Mice were sacrificed after having dropped more than 25% of their original body weight. Panels c schematically depict the days of *in vivo* depletion of CD4-positive, CD8-positive or both CD4- and CD8-positive T-cell subset as described in *Material and Methods*. For control, challenge infection of immunized non-depleted animals or non-immunized mice (ni) was also performed.

doi:10.1371/journal.pone.0083802.g008

immunity mediated by D1701-V-NPh5 was not sufficient to protect from the dose of lethal challenge virus used in our experiments. Reduced protective efficacy of NP against increasing challenge virus dose was found in mice and ferrets [57]. Although non-protective the described experiments do not exclude the utility of D1701-V-NPh5 in prime-boost vaccination regimens, similarly as reported for DNA prime-recombinant adenoviral boost immunization with NP [58].

The H5 HA-expressing recombinant D1701-V-HAh5n was found to elicit very good protection in a dose-dependent manner. The results showed that booster *i.m.* immunization was superior to single application of the recombinant. The animals of both mouse strains used were protected not only from lethal challenge but also from disease according to weight loss determination. All mice immunized twice with 10^6 or 10^7 pfu of the recombinant survived and remained healthy after challenge infection with two different cross-clade H5N1 strains, namely MB1 (clade 2.2.1) and SN1 (clade 2.2.3). Similar findings were reported for MVA recombinants expressing the H5 HA of clade 1, which were able to protect mice against infection with H5N1 AIV of clades 2.1.3, 2.2 and 2.3.4 [39]. Despite only 66% HA amino acid homology, the presented recombinant D1701-V-HAh5n was able to protect BALB/c and C57BL/6 mice against the heterologous AIV strain PR8 (H1N1). The results indicate slightly better protection of BALB/c mice, which resisted a higher challenge virus dose ($50 \times$ MLD50) compared to C57BL/6 mice ($20 \times$ MLD50). Whether the different genetic background of the two mouse strains might influence the anti-AIV immune response is not known. The major determinants of the D1701-V-HAh5n induced cross-protective immunity, cross-neutralizing HA antibodies and/or specific cytotoxic T-cells, must be clarified. Both are suspected to work in protection from heterologous AIV infection [59], as also cooperation of virus-specific CD8-positive T-cells and non-neutralizing antibodies was described [60].

The presence of HI antibodies with titres of 1:40 or higher are considered to predict protection (for review [27]), but animals with low or without detectable HI antibodies were also protected, as for instance by poxvirus based vaccination [61]. The presented data indicate that only the twofold application of higher doses of D1701-V-HAh5n elicited moderate HI antibody responses and protected all animals from disease and death. Similarly it was reported that 2 injections of HA-based vaccines can be necessary to elicit higher HI antibody titres (for review [62]). Also higher doses of MVA-based H5 HA recombinant have been necessary to induce detectable antibodies [41]. Two immunizations with 10^5 pfu of D1701-V-HAh5n did not induce detectable HI antibodies also suggesting that the magnitude of the antibody responses can depend on the vaccine dose. But nevertheless more than 80% of these animals survived the lethal challenge infection, which implies a certain immune control. In addition, the still not completely unravelled immunomodulating properties of ORFV strain D1701 [63] can be considered to improve not only cross-protective immunity. Collectively, these results might indicate the additional involvement of T-cells for the formation of a protective immunity.

The mouse immunization experiments demonstrated that two injections of D1701-V-HAh5 were beneficial to mediate robust protective immunity from lethal AIV challenge. To investigate the involvement of T-cells in protection, immune mice were *in vivo* depleted of CD4-positive and/or CD8-positive T-cells as described. Elimination of the T-cell subsets after the two vaccinations before challenge infection did not affect protective immunity. That can be explained by the development of a complete robust protective immunity before depleting the T-cell subsets. Most probably specific antibodies present at the time of challenge infection control the virus. The body weight loss indicated that the presence of CD4-positive T-cells at prime vaccination contributed to disease control, although all challenge infected animals recovered (Fig. 8B). The lack of B-cell help by CD4-positive T-cells during prime immunization can be expected to impair the production of antibodies that effectively neutralize the virus [21]. Depletion of CD4-positive T-cells alone or in combination with CD8-positive T-cells during immunization and challenge resulted in loss of body weight and slightly reduced survival rate (Fig. 8C). Most probably the missing CD4-T-cell help until the time of challenge impeded maturation of B-cells and consequently an effective specific antibody response necessary for early control of challenge virus (for review [64]). That can be also suggested from a prolonged course of disease for 2 days. The question on a possible contribution of CD8-positive T-cells for protective immunity mediated by the HA-expressing ORFV recombinant could be answered by the use of B-cell knock-out mice for *in vivo* deletion of T-cell subsets. Whether CD8-positive T-cells add some effector functions and/or cytokine production remains to be investigated in more detail. Conclusively, the presented findings show that CD4-positive T-cells are needed to prime protective immunity, but deleting these T-cell subset later, e.g. before challenge infection, does not substantially reduce protection. This supports recent reports on the importance of CD4-positive T-cells and of specific antibodies for protection from H5N1 and on the minor protective role of CD8-positive T-cells [20]. CD4-positive T-cells are also important for the development of memory B- and T-cells and thus, additionally aid to increase the protective immune response against AIV [22,28]. Moreover, they help to clear infected cells early after infection also in the absence of CD8-positive T-cells by antibody-independent, cytotoxic mechanisms or interferon-gamma secretion [65] (for review [64]).

In conclusion, the presented study adds another example of the utility of the *Parapoxvirus* ORFV strain D1701-V as a versatile vector virus platform for the development of live non-adjuvanted recombinant vaccines, which can be used for repeated immunizations. The ORFV based vaccines can be easily propagated in the non-tumorigenic, permanent Vero cell line, also accepted for influenza virus vaccine production [66]. The application of the H5 HA-expressing ORFV recombinant to protect against cross-clade HPAIV or heterologous AIV can be of great interest for vaccination of pets that have the potential to transmit H5N1 from domestic animals to humans. HPAIV H5N1 or H7N7 strains have the capacity to cross the species barrier by infecting dogs and domestic cats, respectively (for review [67]), [68,69]. The excellent applicability and safety of ORFV-vectored vaccines in pets was

demonstrated recently [42]. Due to the very good experience of using ORFV recombinants for immunization of pigs [43,48,49] the application of AIV gene expressing ORFV recombinants could also represent alternative vaccines for this AIV relevant host. Based on the presented findings more detailed studies must now scrutinize the induced immune response. In addition, improved cross-protective immunity against AIV can be attempted by using additional recombinants expressing other immune-relevant proteins of AIV.

Acknowledgments

The generous help of Annette Vogel, Emanuel Haasbach, Oliver Planz and Benjamin Petsch during the work of influenza virus, the brilliant

technical assistance of K. Kegreiss and B. Bauer is greatly acknowledged. We thank Lothar Stitz (FLI, Inst. Immunology) for his assistance with mice experiments as well as his fruitful discussions. The authors also want to thank Mathias Büttner (Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany) for providing valuable information on the HPAIV strain MB1, and Oliver Planz (Univ. Tübingen, Dep. Immunology) for critically reading the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HJR JR RA. Performed the experiments: JR. Analyzed the data: JR RA HJR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JR HJR RA. Wrote the paper: HJR JR.

References

1. Tumpey TM, Belser JA (2009) Resurrected pandemic influenza viruses. *Annual review of microbiology* 63: 79–98.
2. Bouvier NM, Palese P (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4: D49–53.
3. Li Q, Sun X, Li Z, Liu Y, Vavricka CJ, et al. (2012) Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 18897–18902.
4. Tong S, Li Y, Rivailier P, Conrardy C, Castillo DA, et al. (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 4269–4274.
5. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325: 197–201.
6. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y (2007) Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clinical microbiology reviews* 20: 243–267.
7. Gillim-Ross L, Subbarao K (2006) Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clinical microbiology reviews* 19: 614–636.
8. Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, et al. (2012) Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336: 1534–1541.
9. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, et al. (2012) Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486: 420–428.
10. Russell CA, Fonville JM, Brown AE, Burke DF, Smith DL, et al. (2012) The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science* 336: 1541–1547.
11. Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, et al. (2008) Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2800–2805.
12. Skehel JJ, Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* 69: 531–569.
13. Chen JR, Ma C, Wong CH (2011) Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza. *Trends in biotechnology* 29: 426–434.
14. Laddy DJ, Yan J, Kutzler M, Kobasa D, Kobinger GP, et al. (2008) Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS one* 3: e2517.
15. Xu K, Ling ZY, Sun L, Xu Y, Bian C, et al. (2011) Broad humoral and cellular immunity elicited by a bivalent DNA vaccine encoding HA and NP genes from an H5N1 virus. *Viral immunology* 24: 45–56.
16. Chen MW, Cheng TJ, Huang Y, Jan JT, Ma SH, et al. (2008) A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13538–13543.
17. Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, et al. (2010) Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13701–13706.
18. Hai R, Krammer F, Tan GS, Pica N, Eggink D, et al. (2012) Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes. *Journal of virology* 86: 5774–5781.
19. Pica N, Palese P (2013) Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annual review of medicine* 64: 189–202.
20. Droebner K, Haasbach E, Fuchs C, Weinzler AO, Stevanovic S, et al. (2008) Antibodies and CD4(+) T-cells mediate cross-protection against H5N1 influenza virus infection in mice after vaccination with a low pathogenic H5N2 strain. *Vaccine* 26: 6965–6974.
21. Swain SL, Agrewala JN, Brown DM, Jelley-Gibbs DM, Golech S, et al. (2006) CD4+ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4+ T cells in protective immunity to influenza. *Immunological reviews* 211: 8–22.
22. Teijaro JR, Verhoeven D, Page CA, Turner D, Farber DL (2010) Memory CD4 T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent mechanisms. *Journal of virology* 84: 9217–9226.
23. Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, et al. (1998) Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *Journal of virology* 72: 5648–5653.
24. Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG (2006) Influenza and the challenge for immunology. *Nature immunology* 7: 449–455.
25. Heiny AT, Miotto O, Srinivasan KN, Khan AM, Zhang GL, et al. (2007) Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS one* 2: e1190.
26. Hillaire ML, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF (2011) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011: 939860.
27. Bodewes R, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF (2010) Targets for the induction of protective immunity against influenza A viruses. *Viruses* 2: 166–188.
28. Dormitzer PR, Galli G, Castellino F, Golding H, Khurana S, et al. (2011) Influenza vaccine immunology. *Immunological reviews* 239: 167–177.
29. Osterhaus A, Fouchier R, Rimmelzwaan G (2011) Towards universal influenza vaccines? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366: 2766–2773.
30. Tang XC, Lu HR, Ross TM (2010) Hemagglutinin displayed baculovirus protects against highly pathogenic influenza. *Vaccine* 28: 6821–6831.
31. Khurana S, Wu J, Verma N, Verma S, Raghunandan R, et al. (2011) H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies that preferentially bind to the oligomeric form of influenza virus hemagglutinin in humans. *Journal of virology* 85: 10945–10954.
32. Pushko P, Pearce MB, Ahmad A, Tretyakova I, Smith G, et al. (2011) Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. *Vaccine* 29: 5911–5918.
33. Ozawa M, Kawaoka Y (2011) Taming influenza viruses. *Virus research* 162: 8–11.
34. Mueller S, Coleman JR, Papamichail D, Ward CB, Nimmual A, et al. (2010) Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nature biotechnology* 28: 723–726.
35. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, et al. (2012) Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nature biotechnology* 30: 1210–1216.
36. Kyriakis CS, De Vleeschauwer A, Barbe F, Bublot M, Van Reeth K (2009) Safety, immunogenicity and efficacy of posivirus-based vector vaccines expressing the haemagglutinin gene of a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in pigs. *Vaccine* 27: 2258–2264.
37. Poon LL, Leung YH, Nicholls JM, Perera PY, Lichy JH, et al. (2009) Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice. *Journal of immunology* 182: 3063–3071.
38. Mayrhofer J, Coulibaly S, Hessel A, Holzer GW, Schwendinger M, et al. (2009) Nonreplicating vaccinia virus vectors expressing the H5 influenza virus hemagglutinin produced in modified Vero cells induce robust protection. *Journal of virology* 83: 5192–5203.
39. Hessel A, Schwendinger M, Holzer GW, Orlinger KK, Coulibaly S, et al. (2011) Vectors based on modified vaccinia Ankara expressing influenza H5N1 hemagglutinin induce substantial cross-clade protective immunity. *PLoS one* 6: e16247.
40. Karaca K, Swayne DE, Grosenbaugh D, Bublot M, Robles A, et al. (2005) Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12: 1340–1342.
41. Kreijtz JH, Suezter Y, de Mutser G, van Amerongen G, Schwantes A, et al. (2009) MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. *PLoS one* 4: e7790.

42. Amann R, Rohde J, Wille U, Conlee D, Raue R, et al. (2013) A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *Journal of virology* 87: 1618–1630.
43. Dory D, Fischer T, Beven V, Cariolet R, Rziha HJ, et al. (2006) Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). *Vaccine* 24: 6256–6263.
44. Fischer T, Planz O, Stitz L, Rziha HJ (2003) Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *Journal of virology* 77: 9312–9323.
45. Henkel M, Planz O, Fischer T, Stitz L, Rziha HJ (2005) Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *Journal of virology* 79: 314–325.
46. Rohde J, Schirmer H, Granzow H, Rziha HJ (2011) A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Vaccine* 29: 9256–9264.
47. Rziha H, Henkel M, Cottone R, Bauer B, Auge U, et al. (2000) Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *Journal of biotechnology* 83: 137–145.
48. van Rooij EM, Rijsewijk FA, Moonen-Leusen HW, Bianchi AT, Rziha HJ (2010) Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *Vaccine* 28: 1808–1813.
49. Voigt H, Merant C, Wienhold D, Braun A, Hutet E, et al. (2007) Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* 25: 5915–5926.
50. Buttner M, Rziha HJ (2002) Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* 49: 7–16.
51. Haig DM (2006) Orf virus infection and host immunity. *Current opinion in infectious diseases* 19: 127–131.
52. Czerny CP, Waldmann R, Scheubeck T (1997) Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. *Archives of virology* 142: 807–821.
53. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312: 548–551.
54. Le Gros GS, Herbert AG, Watson JD (1984) In vivo modulation of thymus-derived lymphocytes with monoclonal antibodies in mice. II. Separation of natural killer cells and cytotoxic T cells. *Immunology* 51: 103–113.
55. LaMere MW, Lam HT, Moquin A, Haynes L, Lund FE, et al. (2011) Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus. *Journal of immunology* 186: 4331–4339.
56. Rimmelzwaan GF, Kreijtz JH, Bodewes R, Fouchier RA, Osterhaus AD (2009) Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine* 27: 6363–6365.
57. Rao SS, Kong WP, Wei CJ, Van Hoeven N, Gorres JP, et al. (2010) Comparative efficacy of hemagglutinin, nucleoprotein, and matrix 2 protein gene-based vaccination against H5N1 influenza in mouse and ferret. *PLoS one* 5: e9812.
58. Epstein SL, Kong WP, Mispion JA, Lo CY, Tumpey TM, et al. (2005) Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23: 5404–5410.
59. Guo H, Santiago F, Lambert K, Takimoto T, Topham DJ (2011) T cell-mediated protection against lethal 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection in a mouse model. *Journal of virology* 85: 448–455.
60. Laidlaw BJ, Decman V, Ali MA, Abt MC, Wolf AI, et al. (2013) Cooperativity between CD8+ T cells, non-neutralizing antibodies, and alveolar macrophages is important for heterosubtypic influenza virus immunity. *PLoS pathogens* 9: e1003207.
61. Stittelaar KJ, Lacombe V, van Lavieren R, van Amerongen G, Simon J, et al. (2010) Cross-clade immunity in cats vaccinated with a canarypox-vectored avian influenza vaccine. *Vaccine* 28: 4970–4976.
62. El Sahly HM, Keitel WA (2008) Pandemic H5N1 influenza vaccine development: an update. *Expert review of vaccines* 7: 241–247.
63. Weber O, Mercer AA, Friebe A, Knolle P, Volk HD (2013) Therapeutic immunomodulation using a virus—the potential of inactivated orf virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology 32: 451–460.
64. Swain SL, McKinsty KK, Strutt TM (2012) Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nature reviews Immunology* 12: 136–148.
65. Brown DM, Lee S, Garcia-Hernandez Mde L, Swain SL (2012) Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection. *Journal of virology* 86: 6792–6803.
66. Barrett PN, Portsmouth D, Ehrlich HJ (2010) Developing cell culture-derived pandemic vaccines. *Current opinion in molecular therapeutics* 12: 21–30.
67. Harder TC, Vahlenkamp TW (2010) Influenza virus infections in dogs and cats. *Veterinary immunology and immunopathology* 134: 54–60.
68. Chen Y, Zhong G, Wang G, Deng G, Li Y, et al. (2010) Dogs are highly susceptible to H5N1 avian influenza virus. *Virology* 405: 15–19.
69. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, et al. (2004) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306: 241.