

# Präventions- und Therapiestrategien gegen Orthopockenviren

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Constanze Yue

aus Berlin

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

- Vorsitzende: Prof. Jens Kurreck  
1. Gutachter: Prof. Roland Lauster  
2. Gutachter: Prof. Leif-Alexander Garbe  
3. Gutachter: Dr. Heinz Ellerbrok

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.04.2013

Berlin 2013

D 83

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Heinz Ellerbrok für seine immer freundliche Betreuung bedanken. Er hat mir stets Freiraum gelassen und mir mit seiner unerschütterlichen Ruhe und streng logischen Betrachtungsweise aus so mancher Sackgasse herausgeholfen, ohne je Druck auszuüben.

Herrn Prof. Roland Lauster und Herrn Prof. Leif-Alexander Garbe danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit extern zu betreuen und zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Rüdiger Schade von der Charité für die gute Kooperation und seine große Unterstützung während des ungeahnt langwierigen Hühnerimmunisierungsprojektes.

Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig und Frau Dr. Kerstin Mätz-Rensing vom Deutschen Primatenzentrum danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Immunisierungsstudien mit Weißbüschelaffen und die fachlich bereichernden Diskussionen.

Besonders dankbar bin ich auch Frau Jung-Won Sim-Brandenburg, die sich in rührender Weise um mich gekümmert hat und deren Rat, große Unterstützung und geduldige Hilfe unendlich wertvoll für mich waren.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Kollegen, insbesondere Stephanie, Anke, Marco, Daniel S., Astrid sowie allen anderen Mitstreitern für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dankbar bin ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren und auf deren Rückhalt ich jederzeit zählen konnte.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Abbildungen sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Berlin, den 21.02.2013

# Abstract

Despite of the eradication of the highly pathogenic *variola virus* as a consequence of the WHO's global campaign there remains a risk of a criminal release of the smallpox pathogen which would encounter an immunologically almost unprotected human population by now. Since the cessation of the global immunization, the threat of zoonotic infections by *cowpox viruses*, *monkeypox viruses* and *vaccinia viruses* has increased. For this reason, vaccines and therapeutics are still being developed and their safety and efficacy are being evaluated. This study entails the investigation of both therapeutic approaches and immunization strategies in animal models.

In a first approach *orthopoxvirus*-specific IgY were generated by the immunization of laying hens with infectious as well as inactivated *orthopoxviruses*. The immunotherapeutic efficacy of these high-quality antibodies was tested in an *orthopoxvirus*/mouse model, in which the infection with *vaccinia virus western reserve* was performed by the intranasal route. IgY were administered intranasally at different time points before and accordingly after infection. The results of this study demonstrate the possibility to apply OPV-specific IgY prophylactic and therapeutic against OPV-infections.

In a second approach the efficacy of the vaccine IMVAMUNE was evaluated in the recently established *calpox virus*/marmoset model. This widely replication deficient live vaccine of the third generation reveals an extensive safety profile and received the FDA's fast track status for an accelerated approval procedure. The results presented here demonstrate that the vaccine does not protect the animals against a lethal dose of *calpox virus*. In this model the observed weak induction of antibodies better reflected the insufficient protection than other studies working with non-human primate models. In the latter, compared to traditional vaccines, the antibody induction by IMVAMUNE is also strong but the protection is weaker suggesting the safest application of IMVAMUNE in humans would be as a pre-vaccine.

# Zusammenfassung

Trotz der Ausrottung des hochpathogenen *Variola Virus* nach einer global angelegten Kampagne der WHO besteht das Restrisiko einer kriminellen Freisetzung des Pocken-Erregers, der dann auf eine inzwischen immunologisch weitgehend ungeschützte Bevölkerung treffen würde. Seit der Einstellung der flächendeckenden Impfungen steigt zudem die Gefahr von zoonotischen Erkrankungen durch *Kuhpocken-*, *Affenpocken-* und *Vaccinia Viren*. Daher werden weiterhin Impfstoffe sowie Therapeutika entwickelt und in Tiermodellen auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit geprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Therapieansätze als auch Immunisierungsstrategien in Tiermodellen untersucht.

In einem ersten Ansatz wurden durch die Immunisierung von Legehennen sowohl mit aktiven als auch mit inaktivierten *Orthopockenviren* spezifische IgY generiert. Die immuntherapeutische Wirksamkeit dieser qualitativ hochwertigen Antikörper wurde in einem *Orthopockenvirus*/Maus-Modell getestet, bei dem die Infektion mit *Vaccinia Virus Western Reserve* auf intranasalem Weg erfolgte. Die IgY wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Infektion ebenfalls intranasal verabreicht. Die Resultate dieser Studie belegen, dass es möglich ist, OPV-spezifische IgY prophylaktisch und therapeutisch gegen OPV-Infektionen einzusetzen.

In einem zweiten Ansatz wurde der Impfstoff IMVAMUNE auf seine Wirksamkeit im kürzlich etablierten *Calpox Virus*/Weißbüschelaffen-Modell untersucht. Diese weitgehend replikationsdefiziente Lebendvakzine der dritten Generation zeigt ein gutes Sicherheitsprofil und hat bereits von der FDA den sogenannten Fast Track-Status für ein beschleunigtes Zulassungsverfahren erhalten [1]. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der Impfstoff die Tiere nicht vor einer letalen Dosis *Calpox Virus* schützt. Dabei spiegelte in diesem Modell die schwache Antikörperinduktion die ungenügende Schutzwirkung besser wieder als bei anderen Studien in nicht-humanen Primatenmodellen, bei denen verglichen mit traditionellen Vakzinen die Antikörperantwort durch IMVAMUNE zwar ähnlich stark ausfällt, die Schutzwirkung aber schwächer ist, was den Einsatz von IMVAMUNE beim Menschen als Prävakzine als die sicherste Anwendungsform nahelegt.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Eidesstattliche Erklärung .....	II
Abstract .....	III
Zusammenfassung .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Geschichte der Pockenviren und ihrer Ausrottung .....	1
1.2 Bioterrorismus und Zoonosen .....	3
1.3 Orthopockenviren .....	6
1.3.1 Aufbau .....	7
1.3.2 Genom .....	8
1.3.3 Zyklus .....	9
1.4 Klinik und Pathogenese.....	11
1.5 Immunantwort.....	14
1.6 Prävention von Orthopockenvirus-Infektionen.....	16
1.7 Therapie von Orthopockenvirus-Infektionen.....	20
1.8 Tiermodelle.....	22
1.8.1 Maus/ <i>Vaccinia Virus</i> Modell.....	23
1.8.2 Marmosetten/ <i>Calpox Virus</i> Modell .....	24
2 Ziel.....	26
3 Materialien und Methoden .....	27
3.1 Verbrauchsmaterialien.....	27
3.2 Geräte .....	29
3.3 Viren und Zellen .....	30
3.4 Tierexperimente.....	31
3.4.1 Mäuse – Entwicklung eine Therapieansatzes mit IgY.....	31
3.4.2 Statistische Auswertung.....	32
3.4.3 Affen – Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE.....	32
3.5 Molekularbiologische Untersuchungen von Blut- und Gewebeproben .....	33
3.5.1 DNA- und RNA-Extraktion aus EDTA-Blut.....	33
3.5.2 DNA-Extraktion aus Blutkuchen.....	34
3.5.3 DNA-Extraktion aus Gewebe .....	34
3.5.4 cDNA-Synthese .....	35
3.5.5 Real Time-PCR.....	35
3.5.6 Herstellung der Plasmidstandards .....	37
3.5.6.1 Agarosegel-Elektrophorese .....	37
3.5.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte und Klonierung .....	38
3.5.6.3 Transformation .....	39
3.5.6.4 Plasmidpräparation .....	39
3.5.6.5 Sequenzierung der Inserts .....	40
3.6 Zellkultur.....	40

---

3.6.1	Kultivierung von Zellen.....	40
3.6.2	Isolierung von hühnerembryonalen Fibroblasten (CEF-Zellen).....	41
3.7	Virusanzucht und Virusinaktivierung.....	42
3.8	Plaque-Test.....	43
3.9	Generierung von IgY.....	44
3.9.1	Immunisierung von Hühnern.....	44
3.9.2	Isolierung von IgY aus Hühnereiern.....	44
3.9.3	IgY-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	45
3.9.4	Aufkonzentrierung der aufgereinigten IgY-Präparationen.....	46
3.9.5	Lyophilisierung von IgY.....	46
3.10	Charakterisierung von Antikörpern.....	47
3.10.1	Immunfluoreszenz-Assay (IFA).....	47
3.10.2	Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT <sub>50</sub> ).....	48
3.10.3	Western Blot mit IgY.....	49
3.10.4	ELISA.....	51
3.10.4.1	Untersuchung von Seren und Plasma mit Virus-Lysat.....	51
3.10.4.2	Untersuchung von Plasma und IgY mit rekombinanten Proteinen.....	52
3.10.5	Immunscreening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken.....	54
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Generierung und Charakterisierung von IgY.....	60
4.1.1	Immunisierung von Legehennen mit infektiösen und inaktivierten OPV.....	60
4.1.2	Isolierung von IgY aus Eidottern.....	61
4.1.3	Bindungstiterverläufe.....	61
4.1.4	Neutralisierungstiterverläufe.....	64
4.1.5	IgY-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	66
4.1.6	Spezifitätsnachweis von IgY.....	67
4.1.7	Immunscreening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken:.....	70
4.1.8	Lyophilisierung von IgY.....	73
4.2	Wirksamkeit von IgY in vivo.....	74
4.2.1	Infektion mit 10 <sup>6</sup> PFU und viermalige Behandlung mit IgY.....	74
4.2.2	Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU und viermalige Behandlung mit IgY.....	77
4.2.3	Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU und einmalige Behandlung mit IgY.....	81
4.3	Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE.....	86
4.3.1	Nachweis von viralen Nukleinsäuren und infektiösen Partikeln.....	87
4.3.1	Nachweis von OPV-spezifischen Antikörpern.....	90
5	Diskussion.....	95
5.1	Generierung von OPV-spezifischen IgY.....	96
5.2	Entwicklung einer Immuntherapie gegen Orthopockenviren.....	103
5.3	Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE.....	107
	Abkürzungsverzeichnis.....	116
	Tabellenverzeichnis.....	120
	Abbildungsverzeichnis.....	121
	Literaturverzeichnis.....	122

# 1 Einleitung

## 1.1 *Geschichte der Pockenviren und ihrer Ausrottung*

Schon in alten chinesischen und Sanskrit-Texten sind Berichte über Pockenepidemien zu finden, ab dem 6. Jahrhundert beschreiben historische Darstellungen Pandemien in Europa und Asien. Nach Amerika wurde die Krankheit wahrscheinlich erst im 15. Jahrhundert durch die spanischen und portugiesischen Eroberer und durch Sklavenschiffe aus Afrika eingeschleppt [2]. Allein im 20. Jahrhundert sind Schätzungen zufolge weltweit zwischen 300 und 540 Millionen Menschen an den Pocken gestorben [3]. Der Auslöser war das *Variola Virus*, von dem zwei unterschiedlich virulente Varianten kursierten: Bei *Variola major* betrug die Letalität zwischen 5 und 40%, bei *Variola minor* ca. 1-2%. Die Überlebenden waren durch entstellende Narben gekennzeichnet und viele von ihnen waren infolge einer Kornea-Infektion erblindet.

Erste Maßnahme gegen die Viruserkrankung war die Variolation, bei der Material aus den Pusteln von Pockenerkrankten in die Haut von Gesunden eingeritzt wurde. Bei dieser frühen Methode der Immunisierung verlief die Infektion in der Regel zwar milder als bei einer natürlichen Infektion über die Atemwege, dennoch waren die Patienten hoch kontagiös und es bestand ein immenses Risiko, eine neue Epidemie auszulösen. Zudem wurden auf diese Weise häufig andere Krankheiten wie Syphilis oder Tuberkulose mit übertragen [2, 4]. Eine sicherere Methode der Immunisierung wurde 1796 von dem Wissenschaftler und Mediziner Edward Jenner entdeckt, der in einem ersten Versuch einen acht Jahre alten Jungen zunächst mit dem Material einer Kuhpocke und sechs Wochen später mit *Variola* inokulierte. Seine Entdeckung beruhte auf der allgemein bekannten Beobachtung, dass Milchmägde, die Kuhpockenläsionen an den Händen entwickelt hatten, nicht an einer Pockeninfektion erkrankten [5]. Jenner nannte dieses infektiöse Material „Vaccine“, was sich von der lateinischen Vokabel „vacca“ für „Kuh“ herleitet. Wie das *Variola Virus* gehören auch die *Kuhpockenviren* und die später zur Immunisierung verwendeten *Vaccinia Viren* zur Gruppe der eng verwandten *Orthopockenviren*, gegen deren Mitglieder nach



Infektion stark kreuzprotektive Antikörper gebildet werden [6]. 1805 wurde in Italien die Vakzineproduktion auf Kälberhäuten entwickelt und dadurch die Co-Infektionsrate anderer Krankheiten reduziert.

1967 startete die WHO mit einem Budget von 2,5 Millionen Dollar pro Jahr ein global angesetztes Programm, um das *Variola Virus* auszurotten. Zu dieser Zeit war das Virus in 30 Ländern endemisch und forderte allein im Jahr 1967 geschätzt 10 Millionen Todesopfer [7]. Unter der Leitung von Donald A. Henderson wurden für jedes Land präzise Zielvorgaben entwickelt, logistische und administrative Unterstützung geleistet, Epidemiologen trainiert und die Vakzineproduktion standardisiert [8]. Ein Ansatz hatte die Massenimmunisierung der Bevölkerungen mit dem *Vaccinia Virus* zum Ziel. Ein anderer konzentrierte sich auf „surveillance and containment“, das heißt, er suchte durch Isolation der Patienten und Ringimpfungen in den Ausbruchszonen die Krankheitsherde einzudämmen und weitere Übertragungen zu verhindern [9-11]. 10 Jahre später trat der letzte, natürlich übertragene Pockenfall in Somalia auf und im Mai 1980 erklärte die WHO die Pocken offiziell für ausgerottet [7]. Der Erfolg dieser Kampagne ist vor allem den Tatsachen zu verdanken, dass der Mensch das einzige Reservoir für das *Variola Virus* darstellte, die Transmissionsrate mit 2-5 Übertragungen pro Patient relativ niedrig war und die durch Infektion oder Vakzinierung erworbene Immunität lange genug anhielt, um Re-Infektionen zu verhindern [12]. Auf Beschluss des höchsten Entscheidungsorgans der WHO, der WHA, wurden bis 1984 die Impfungen sukzessive eingestellt und die vorhandenen Virusbestände in allen Labors bis auf zwei Ausnahmen zerstört [13]. Offiziell lagern bis heute *Variola Virus*-Isolate nur noch unter WHO-Kontrolle in zwei Hochsicherheitslabors in den USA (CDC in Atlanta, Georgia) und in Russland (VECTOR in Koltsovo, Novosibirsk). Die Frage, ob auch die letzten Isolate vernichtet werden sollten, ist heiß umstritten [14-16] und die endgültige Entscheidung darüber wurde immer wieder vertagt und bis heute nicht gefällt [17, 18].

## 1.2 Bioterrorismus und Zoonosen

Trotz der Ausrottung des *Variola Virus* besteht die Sorge vor einem erneuten Auftreten der Pockenerkrankung aus mehreren Gründen weiterhin. Zum einen nimmt seit der Einstellung der Impfungen der Anteil der *Orthopockenvirus*-suszeptiblen Weltbevölkerung schnell zu, zum anderen existieren Berichte über ein extensives Biowaffenprogramm mit *Variola Viren* des sowjetischen Militärs [19] und es ist unklar, ob tatsächlich alle Virusbestände vernichtet wurden, da ihre Zerstörung praktisch kaum zu kontrollieren war.

Auf Grund seiner hohen Mortalität, schnellen Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch, Stabilität in der Umwelt, psychologischen Wirkung als jahrtausende-alte Geißel der Menschheit und nicht zuletzt wegen der einfachen Produzierbarkeit eignet sich das Virus hervorragend als biologische Waffe [20, 21]. Die CDC haben für biologische Agenzien, die potentiell als biologische Waffe nutzbar wären, eine priorisierende Liste erstellt, die in die Kategorien „A“ bis „C“ eingeteilt ist. In die höchste Kategorie „A“ sind neben dem *Variola Virus*, das *Clostridium botulinum* Toxin, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthrax* und einige hämorrhagische Fieber auslösende Viren eingruppiert. Definiert ist diese Kategorie durch hohe Mortalitätsraten und schnelle Übertragbarkeit bzw. Verbreitung der Erreger sowie durch die Auswirkungen eines Ausbruchs auf das Gesundheitssystem, das öffentliche Leben und die zu treffenden Maßnahmen. Die Kategorien „B“ und „C“ umfassen schlechter übertragbare Agenzien mit niedrigerer Mortalität und Morbidität wie einige *Salmonella*-Spezies und verschiedene Toxine [22].

Schon häufig haben Menschen biologische Waffen einschließlich des *Variola Virus* in kriegerischen Auseinandersetzungen verwendet - oder auch versehentlich oder beabsichtigt bei Tests freigesetzt [23, 24]. Seit 1971 gilt die Biowaffenkonvention, die die Herstellung und Verbreitung biologischer Waffen verhindern soll. Bis heute haben insgesamt 165 Staaten diesen völkerrechtlichen Vertrag unterschrieben. Neben staatlichen Biowaffenprogrammen besteht jedoch eine reelle Bedrohung durch terroristische Vereinigungen oder Einzeltäter, wie der Bioterroranschlag mit *Bacillus anthracis*-Sporen in den USA kurz nach den Anschlägen vom 11. September 2001 zeigt. Damals wurden mehrere Sporen-enthaltende Briefe an Nachrichtensender und Senatoren verschickt. Im Laufe von 2 Monaten sind insgesamt 22 Fälle von Haut- und Lungenmilzbrand identifiziert worden, 5 Menschen starben [25]. Laut den

Untersuchungen des FBI verübte ein Einzeltäter aus dem Forschungsbereich mit Zugang zu dem betreffenden Agens die Anschläge [26]. Das Thema ist noch immer relevant, da die molekularbiologische Untersuchung der seitdem angefallenen Verdachtsproben einen nicht unerheblichen Arbeits- und Kostenaufwand darstellt.

Neben der Gefahr durch bioterroristische Anschläge mit *Variola Viren* besteht die Gefahr zoonotischer Pockenerkrankungen. Die wichtigsten Zoonose-Erreger in der Gruppe der *Orthopockenviren* sind *Kuhpocken-*, *Affenpocken-* und *Vaccinia Viren* [6, 27-29]. Anders als das *Variola Virus* verfügen sie über ein breites Wirtsspektrum und können von verschiedenen Tierarten auf den Menschen übertragen werden, was die Ausrottung dieser Krankheitserreger unmöglich macht. *Affenpockenviren* sind in West- und Zentralafrika endemisch und wurden erstmals als Auslöser von Pockenerkrankungen bei captiven Affen 1958 im „State Serum Institute“ in Kopenhagen identifiziert [30]. In den folgenden Jahren wurden mehrere Ausbrüche bei in Gefangenschaft gehaltenen Affenpopulationen verzeichnet [31]. Seit der ersten Affenpocken-Infektion beim Menschen 1972 [32] wurden ca. 800 Zoonose-Fälle registriert [33]. Als Virusreservoir dienen vermutlich nur wildlebende Nagetiere, durch deren Bejagung es zu Übertragungen auf den Menschen kommen kann [34]. Besonders gefährdet sind offenbar junge Menschen in Regenwaldgebieten. Der Anteil der tödlich endenden Krankheitsfälle variiert je nach Studie und Region zwischen 1,5% und 17% [35-40]. Mit einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen gefolgt von Fieber, Hautausschlag und der Entwicklung von Läsionen ähnelt das klinische Bild der *Affenpockenvirus*-Infektion stark dem einer *Variola Virus*-Infektion, wobei die Transmissionsrate [41] und Mortalität weitaus geringer sind [33, 42]. Im Jahr 2003 führte in den USA der Handel von infizierten Präriehunden, die sich offenbar bei einer aus Ghana importierten Gambiaratte angesteckt hatten, bei 81 Menschen zu Affenpocken-Infektionen. Mit zum Teil asymptomatischen Verläufen verliefen die Erkrankungen jedoch ungleich milder als bei früheren Ausbrüchen auf dem afrikanischen Kontinent [43].

Ein weiterer Zoonose-Erreger ist das *Vaccinia Virus*, das seit 1999 vorwiegend im Südosten Brasiliens zu Ausbrüchen bei Milchkühen und Menschen führt [44-46]. Die Infektion äußert sich durch Hautläsionen, die beim Zuchtvieh an Eutern und Zitzen auftreten und mit einer substanziell geringeren Milchproduktion einhergehen [47]. Übertragen wird die Infektion auf säugende Kälber, die Läsionen am Maul und auf

der oralen Mucosa entwickeln, und auf Menschen, die mit den Tieren arbeiten [48]. Beim Menschen treten die Hautläsionen vor allem lokal umschrieben an Händen und Armen sowie seltener im Gesicht auf und sind begleitet von systemischen Symptomen wie Fieber, Muskel- und Kopfschmerzen und Lymphadenopathien [49]. Mittlerweile sind auch Infektionen bei Pferden beschrieben worden [50]. Obwohl Hinweise auf Nagetiere als Virusreservoir entdeckt wurden, ist der Zirkulationsweg des Virus noch ungeklärt [51-53]. Zunächst nahm man an, dass die fast 20 Jahre nach Beendigung der Impfkampagne auftretenden *Vaccinia Virus*-Ausbrüche durch einen an wildlebende Wirtspopulationen angepassten Impfstamm verursacht wurden. Neuere molekularbiologische und epidemiologische Untersuchungen belegen jedoch eine hohe Diversität der gesammelten Isolate und eine phylogenetische Distanz zu den damals eingesetzten Impfstämmen, was diese Hypothese nicht stützt [54, 55]. Wahrscheinlicher ist die Existenz einer bis dahin unentdeckten *Vaccinia Virus*-Population, die in ihrem bisher unbekanntem natürlichen Reservoir zirkuliert und gelegentlich zu Zoonosen führt [28].

In Europa treten vermehrt zoonotische Infektionen durch *Kuhpockenviren* auf [27], deren natürliches Reservoir vermutlich ebenfalls wildlebende Nagetiere darstellen [56, 57]. Die Infektion wird meist durch als Haustiere gehaltene Ratten und Katzen auf den Menschen übertragen [58-68] und äußert sich in schmerzhaften hämorrhagischen Pusteln oder schwarze Wundkruste meist an Händen oder im Gesicht. Die Läsionen können Ausmaße von mehreren Zentimetern im Durchmesser annehmen und treten zusammen mit Ödemen, Erythemen und Lymphadenopathien auf [69]. Bei den Fällen, in denen das Virus nachweislich durch Ratten übertragen wurde, zeigten sich die Läsionen an den Kontaktstellen zu den Tieren [58]. In der Regel sind die Infektionen selbst-limitierend und nur in seltenen Fällen lebensbedrohlich [61, 62, 69, 70]. Zoonotische Kuhpocken-Infektionen wurden aber auch bei einer Reihe von Tierspezies beschrieben, darunter Affen, Elefanten, Lamas und exotische Zootiere wie Mangusten und Jaguarundis, die mit generalisierten Verläufen häufig tödlich endeten [71-74].

### 1.3 Orthopockenviren

Die Familie der *Pockenviren* ist in zwei Subfamilien eingeteilt, von denen die eine Insekten (*Entomopoxvirinea*) und die andere Wirbeltiere (*Chordopoxvirinae*) infiziert [75]. Die weitere Klassifizierung der *Chordopoxvirinae* beruht auf der Kreuzhybridisierung ihrer genomischen DNA. Derzeit wird nach den Angaben der ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) zwischen 10 Genera unterschieden [76]. Im Allgemeinen ähneln sich Mitglieder desselben Genus hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften und Morphologie. Das Genus der *Orthopockenviren* bildet eine sehr homogene Gruppe, deren Spezies üblicherweise nach dem jeweiligen Wirt benannt sind, aus dem sie ursprünglich isoliert wurden (Tabelle 1). Alle zehn Spezies sind serologisch kreuzreaktiv und kreuzprotektiv. Der wichtigste Vertreter ist das *Variola Virus*, das ausschließlich für den Menschen pathogen ist und im Zuge einer Eradikationskampagne ausgerottet wurde. Weitere wichtige Spezies sind das als Impfvirus eingesetzte *Vaccinia Virus*, das *Kuhpocken-* und das *Affenpockenvirus*. Alle drei haben ein breites Wirtsspektrum und sind als Zoonose-Erreger bekannt [6].

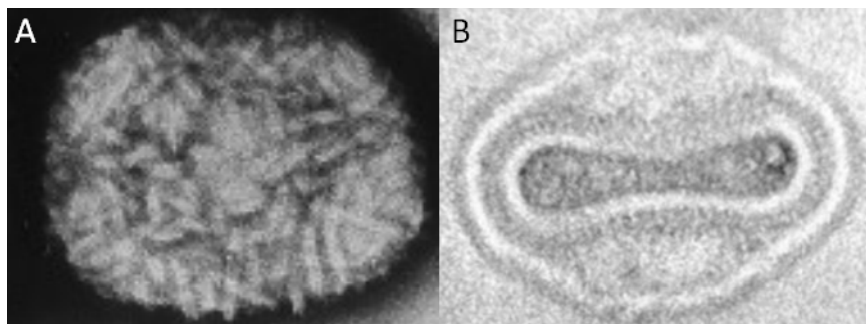
**Tabelle 1:** Spezies des Genus *Orthopockenvirus* und einige wichtige Vertreter

Spezies	Stämme	Wirtsspektrum/ natürlich infizierte Tiere	zoonotische Inf. beim Menschen	Geogr. Auftreten nat. Inf.
Variola Virus	Variola major Virus Bangladesch-1975 Variola minor Virus Garcia-1966	Mensch		Weltweit (vor der Eradikation)
Vaccinia Virus	Vaccinia Virus Lister-Elstree Vaccinia Virus Western Reserve Buffalopox Virus	Kuh, Pferd, Kaninchen, Schwein, Büffel etc.	Ja	Weltweit
Kuhpocken Virus	Kupocken Virus Brighton Red Calpox Virus	Kuh, Nager, Ratte, Katze, Elefant etc.	Ja	Europa
Affenpocken Virus	Affenpocken Virus Zaire 96- 1-16	Affe, Hörnchen, Präriehund, Nager	Ja	West- und Zentralafrika
Kamelpocken Virus	Kamelpocken Virus CMS	Kamel	Ja	Afrika, Asien
Ectromelie Virus	Ectromelie Virus Moscow	Maus	Nein	Europa
Waschbärpocken Virus	Waschbärpocken Virus	Waschbär	Nein	Nordamerika
Skunkpocken Virus	Skunkpocken Virus	Skunk	Nein	Nordamerika
Wühlmauspocken Virus	Wühlmauspocken Virus	Wühlmaus	Nein	Nordamerika
Taterapocken Virus	Taterapocken Virus	Gerbil	Nein	Westafrika

Information nach ICTV [76].

### 1.3.1 Aufbau

Pockenviren gehören mit Maßen von 400 x 230nm zu den größten bekannten Viren. Sie sind ziegelsteinähnlich geformt und besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom, das in einem Nukleoproteinkomplex in einem bikonkaven Capsid vorliegt. Das infektiöse Viruspartikel kann von nur einer, aber auch zwei Membranhüllen umgeben sein. Solange die infizierten Zellen noch intakt sind, werden Viruspartikel mit zwei Membranhüllen, die sogenannten „enveloped virions“ (EV), freigesetzt. Bei Lyse der infizierten Zellen werden vorwiegend Partikel mit nur einer Membranhülle freigesetzt, die als „mature virions“ (MV) bezeichnet werden [77]. Abhängig von der Integrität der Partikel und von der Präparation sind unter dem Elektronenmikroskop unterschiedliche Strukturen zu sehen. Abbildung 1A zeigt eine deutlich strukturierte, tubuläre Oberfläche eines ganzen Viruspartikels nach Aufreinigung und Negativkontrastierung [78], in Abbildung 1B ist die innere Struktur eines MVs mit Capsid und umliegender Membran in einem Gefrierschnitt zu sehen [79].



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vaccinia Viren.** A, Ganzes Viruspartikel nach Aufreinigung und Negativfärbung mit tubulärer Oberfläche [78]; B, Gefrierschnitt eines aufgereinigten, intrazellulären Partikels mit Capsidstruktur und innerer Membran [79].

Die Replikation der Pockenviren findet im Zytoplasma der Zelle in sogenannten „Virosomen“ oder „Virusfabriken“ statt. *Kuhpocken*-, *Waschbärpocken*- und *Ectromelieviren* formieren im Zytoplasma durch das *ati*-Gen codierte „A-type inclusion bodies“ (ATI), in die die reifen Partikel eingelagert werden [80].

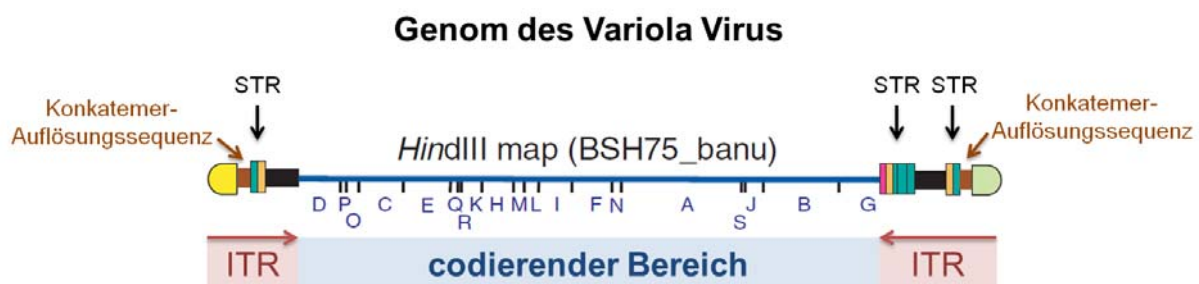
### 1.3.2 Genom

*Orthopockenviren* (OPV) besitzen lineare doppelsträngige DNA-Genome von 170–230 kb, die für ca. 200 Gene codieren. Die für Viren ungewöhnliche Größe ihres Genoms begründet sich in ihrer zytoplasmatischen Replikation. Da sie die Replikationsmaschinerie im Kern der Wirtszelle nicht nutzen können, codieren sie für sämtliche Funktionen ihres Replikationszyklus selbst, wie Polymerasen und RNA-Capping- und RNA-Modifikationsenzyme. Die Gene enthalten keine Introns, daher werden die viralen mRNAs nicht gespleißt. Beide DNA-Stränge sind codierend und enthalten dicht gepackt offene Leserahmen, die sich häufig überlappen. Die Gene sind in Gruppen frühen, intermediären oder späten Promotoren untergeordnet und werden dadurch reguliert zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert [75]. Innerhalb der Unterfamilie der *Chordopoxvirinae* zeigt sich eine hohe Homologie zwischen den Genomen. In der Mitte des Genoms liegt ein etwa 100kb umfassendes Set von 90 konservierten Genen [81]. Diese codieren für alle grundlegenden Funktionen des Replikationsprozesses, also Proteine für die Transkription, DNA-Replikation, das Assembly und die Partikelfreisetzung. An den Enden des Genoms liegen die nicht-konservierten Gene, die speziesspezifisch für „host range“-Faktoren und Immunmodulatoren codieren und die Pathogenität des jeweiligen Virus bestimmen [82, 83].

Die Telomere enthalten identische, gegenläufig orientierte Wiederholungssequenzen (ITR, inverted terminal repeats). Die Länge der ITRs variiert je nach Spezies und Stamm und ist bei *Variola Viren* mit einigen hundert Basen recht kurz und nicht-codierend [84]. Andere OPV Spezies hingegen, wie *Vaccinia Viren* und *Kuhpockenviren*, besitzen codierende ITRs von mehreren Kilobasen [83]. Die ITRs beginnen an den Enden mit kovalent geschlossenen Haarnadelstrukturen. An diese AT-reichen, ca. 100 bp langen Sequenzen schließt sich eine nicht-wiederholende konservierte Region an, die für die Auflösung der konkatemeren Replikationsintermediate essentiell ist [85]. Es folgen mehrere STRs (short tandem repeats) mit heterogener Länge zwischen verschiedenen OPV [83].

Die genetische Nomenklatur der *Orthopockenviren* entstand mit der ersten vollständigen Sequenzierung des *Vaccinia Virus Copenhagen* [86]. Die Benennung der Gene folgt gemäß ihrer Position nach einem Hind III-Verdau. Dabei werden die Restriktionsfragmente mit abnehmender Länge mit den Buchstaben „A“ bis „S“

versehen und die offenen Leserahmen der Reihe nach durchnummeriert. Zusätzlich wird die transkriptionelle Orientierung der Gene mit L (left) oder R (right) angegeben [87]. Mit der steigenden Zahl an sequenzierten Genomen beginnt sich eine neue und praktikablere Nomenklatur durchzusetzen, bei der die Gene schlicht über das gesamte Genom hinweg durchnummeriert werden. Ihnen vorangestellt wird die Bezeichnung des Virusstamms. Während nach der alten Nomenklatur das Gen für die DNA-Polymerase im *Vaccinia Virus Copenhagen* als „E9L“ bezeichnet wurde, heißt es nun „VV-Cop-E9L“ und im *Vaccinia Virus Western Reserve* „VACVWR065“.



**Abbildung 2: OPV-Genomstruktur mit Hind III-Kartierung am Beispiel des Variola Virus-Isolats BSH75\_banu.** Die inverted terminal repeats (ITR) bestehen aus Haarnadelstrukturen, Kokatemer-Auflösungssequenzen (braun), short tandem repeats (STR) (bunt) und nicht-Wiederholungssequenzen (schwarz). Der codierende Bereich ist mit den Fragmenten dargestellt, die sich aus dem Hind III-Verdau ergeben. Verändert nach [84].

### 1.3.3 Zyklus

Die meisten Informationen hinsichtlich des Eintritts von *Orthopockenviren* in die Wirtszelle wurden durch Studien mit *Vaccinia Viren* und Epithelzelllinien gewonnen. Bis heute konnte kein spezifischer zellulärer Rezeptor für die Bindung eines Viruspartikels an die Wirtszelle identifiziert werden. Da in die beiden Membranen der extrazellulären und intrazellulären Partikel jeweils unterschiedliche Proteine eingelagert sind, teilen MVs und EVs keine gemeinsamen Epitope. Wahrscheinlich nutzen sie unterschiedliche Rezeptoren und Mechanismen, um in die Zelle zu gelangen [88]. Für MVs konnte die Beteiligung verschiedener Glykosaminglykane (GAGs) nachgewiesen werden, darunter die Bindung an Heparansulfat durch die *Vaccinia Virus*-Proteine H3 und A27 [89, 90] und an Chondroitinsulfat durch das virale Protein D8 [91]. Ebenfalls konnte die Bindung an das extrazelluläre



Matrixprotein Laminin durch A26 und an einen noch unbekanntem zellulären Faktor durch L1 gezeigt werden [92, 93]. Bisher konnte für die EVs noch kein entsprechender zellulärer Faktor definiert werden.

Obwohl es Hinweise auf eine Fusion der Viruspartikel mit der Plasmamembran gibt [94, 95], scheint der Hauptmechanismus doch auf Endozytose (Makropinocytose) zu beruhen [96-98]. Es wird vermutet, dass der Makropinozytose-Mechanismus auf der Mimikry apoptotischer Körperchen beruht. Bei MVs ist dabei in der Virusmembran vorhandenes Phosphatidylserin als Auslöser identifiziert worden [99].

Die Fusion der viralen mit der endozytischen oder Plasmamembran führt zur Entlassung des viralen Capsids in das Zytoplasma. Daran beteiligt sind wenigstens zwölf transmembrane Virusproteine, von denen die meisten den „Entry/Fusion-Complex“ (EFC) bilden [100]. Die Transkription der viralen Gene erfolgt kaskadenartig zu einem frühen, einem intermediären und einem späten Zeitpunkt [101]. Im Viruscapsid sind alle erforderlichen Bestandteile der frühen Transkriptionsmaschinerie enthalten. Etwa die Hälfte aller viralen Gene unterliegen der Kontrolle früher Promotoren und werden in diesem frühen Stadium der Infektion transkribiert. Die entstehenden mRNAs werden wie eukaryontische mRNAs am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen und am 3'-Ende polyadenyliert [102]. Nach ihrem Transport aus dem Viruscapsid werden sie im Zytoplasma translatiert. Die frühen Proteine sorgen für die Freisetzung des Virusgenoms aus dem Capsid und für seine Replikation, zudem sind sie an Wirtsinteraktionen beteiligt und für die Transkription der intermediären Gene notwendig. Die Produkte der intermediären Gene lösen die Transkription der späten Gene aus, die für virale Strukturproteine und für Faktoren codieren, die die Morphogenese der Viruspartikel veranlassen.

Die DNA-Replikation findet in den sogenannten Virusfabriken oder Guarnierischen Einschlusskörperchen statt. Ein Replikationsursprung wie bei anderen DNA-Viren konnte bei Pockenviren bisher nicht gefunden werden. Eine virale Endonuklease verursacht Einzelstrangbrüche (nicks) an den AT-reichen Enden des Genoms. Von der freien 3'-OH-Gruppe aus wird die DNA repliziert, wobei jeweils einer der beiden DNA-Stränge verdrängt wird [103]. Es entstehen lange, konkatemere Genomstrukturen, die von den Produkten der späten Gene aufgelöst werden [104].

Der Prozess der Virusmorphogenese ist noch nicht geklärt, für die Entstehung der Membran und die Einlagerung der viralen Proteine ist jedoch das virale Protein A6 essenziell [105]. Die ersten unter dem Elektronenmikroskop sichtbaren Strukturen

bestehen aus Lipiden und Proteinen und formieren sich zu unreifen Partikeln, die die Viruscapsidkomponenten enthalten. Durch Verpackung des Genoms und proteolytische Spaltungen der Strukturproteine entstehen die ziegelsteinförmigen reifen Partikel (MVs) [106]. Ein Teil der MVs wird an den Mikrotubuli zur Zelloberfläche transportiert [107], Dieser Prozess wird vom Virusprotein A27 gesteuert [108]. Währenddessen werden die Viruspartikel von zwei weiteren Membranhüllen umgeben [109], die von Endosomen oder trans-Golgi-Netzwerken stammen [110], und nun als „wrapped virions“ (WVs) bezeichnet [110-112]. Die äußerste Membran geht bei der Partikelfreisetzung über Exozytose wieder verloren. Die extrazellulären Viren (EVs) liegen nun entweder als freie Partikel oder mit der Zellmembran assoziiert vor. Letztere induzieren die Bildung von langen Aktinfilamenten, an deren Enden sie zu den umliegenden Zellen transportiert werden [113]. Bei Infektionsversuchen in der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass die EVs nur einen kleinen Anteil aller infektiösen Partikel ausmachen. *In vitro* und *in vivo*-Versuche weisen darauf hin, dass MVs für die Verbreitung der Infektion zwischen den Wirten und EVs für die Ausbreitung der Infektion in einem Wirt verantwortlich sind [107, 114].

Pockenviren verfügen über Mechanismen, die eine Superinfektion bereits infizierter Zellen verhindern und dadurch eine schnelle Verbreitung der Infektion ermöglichen. Dafür verantwortlich sind die viralen Proteine A57 und K2 in der Membran von MVs [115] und die Proteine A33 und A36 von EVs [116].

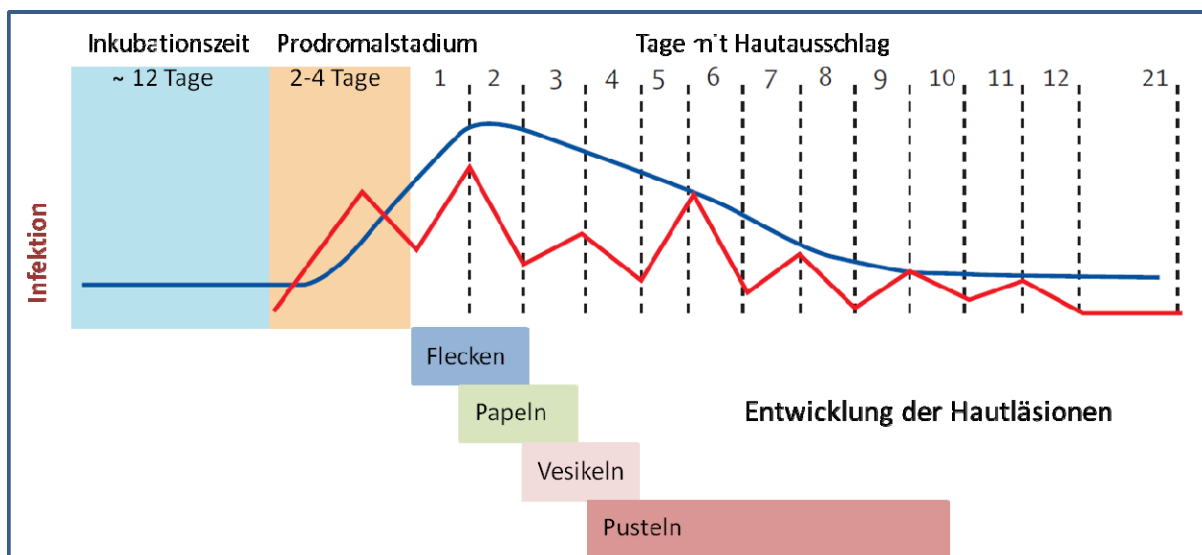
## **1.4 Klinik und Pathogenese**

Die Pockenerkrankung wurde von zwei verschiedenen Typen von *Variola Viren* ausgelöst: Das *Variola minor Virus* hatte eine vergleichsweise geringe Letalitätsrate von ca. 1%, das *Variola major Virus* hingegen verursachte eine Letalität von durchschnittlich 30% aller infizierten Individuen [117]. Auf Grund ihrer Ausprägung und Sterblichkeitsrate wurden von der WHO wiederum verschiedene Typen von *Variola major* unterschieden. Dazu gehören die am häufigsten aufgetretenen ordinären diskreten (<10% Letalität) und ordinären konfluenten (50-75% Letalität)

---

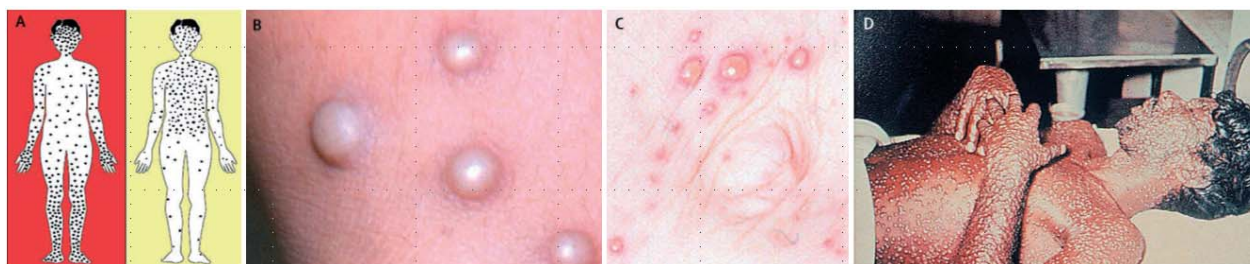
Verläufe und die selteneren flachen (<90% Letalität), hämorrhagischen (nahe 100% Letalität) und modifizierten Verläufe [118, 119].

Die meisten Informationen über die Pathogenese von *Variola Virus*-Infektionen wurden durch epidemiologische Untersuchungen damaliger Ausbrüche und durch artifizielle Infektion von Tieren mit verschiedenen *Orthopockenviren* gewonnen [120-122]. Das Virus dringt über die Schleimhäute der oberen Atemwege in den suszeptiblen Wirt ein. Nach lokaler Replikation geht es durch infizierte Makrophagen über die Lymphe auf die regionalen Lymphknoten über, in denen es sich weiterhin vermehrt und die B-Zell- und zytotoxische T-Zell-Antwort auslöst. Anschließend kommt es zu einer ersten Virämie und infolge dessen zur Invasion des retikuloendothelialen Systems. Nach weiterer Vermehrung im retikuloendothelialen System findet eine zweite, kurze Virämie statt, durch die das Virus zur Epidermis gelangt, dort repliziert und zum Hautausschlag führt. Nur bei den hämorrhagischen Verläufen ist das Virus bis zum Eintritt des Todes im Blut nachweisbar. Das Virus kann in den Läsionen, in Milz, Nieren, Leber, im Knochenmark und auch in anderen Organen nachgewiesen werden [117, 123]. Die Patienten sind erst ab Erscheinen des Hautausschlages infektiös, der gewöhnlich etwa zur gleichen Zeit wie die Läsionen auf den Schleimhäuten („Enanthemen“) in Mund und in der Oropharynx auftritt. Die Sekrete der Oropharynx sind die Hauptquelle für Kontaminationen von Gegenständen und verantwortlich für die Krankheitsübertragung per Tröpfcheninfektion. In der ersten Woche nach Auftreten des Hautausschlages ist die Kontagiosität am höchsten (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Krankheitsverlauf einer ordinären *Variola Virus*-Infektion.** Fieber (blaue Linie), virale Ausscheidung über die Atemwege (rote Linie) und die Entwicklung des Hautausschlags nach der Exposition. Verändert nach: Moore Z. S. et al., 2006 [124].

Die klinischen Symptome einer ordinären *Variola Virus*-Infektion umfassen nach einer Inkubationszeit von ca. 12 Tagen Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, Erschöpfung und, seltener, Erbrechen. Nach weiteren 3-5 Tagen bildet sich ein Windpocken-ähnlicher Hautausschlag, der sich von Maculae zu Papeln, Vesikeln und schließlich Pusteln entwickelt. Die höchste Dichte an Pusteln findet sich zentrifugal verteilt im Gesicht, an Unterarmen, Handflächen, Mund, Hals und den Fußsohlen (Abbildung 4)[124].



**Abbildung 4: Hautläsionen bei Pocken und Windpocken.** A, Verteilung der Läsionen bei Pocken (roter Hintergrund) und Windpocken (gelber Hintergrund). B, Pockenläsionen. C, Windpockenläsionen. D, Patient mit ordinärem Krankheitsverlauf nach einer *Variola Virus*-Infektion. Verändert nach: Moore Z. S. et al., 2006 [124].

Etwa 14 Tage nach Beginn der Symptome beginnen die Pusteln zu verschorfen. Innerhalb einer weiteren Woche fällt der Schorf ab und hinterlässt schwere Vernarbungen. Dies zeigt, dass nicht nur das Hautepithel, sondern auch die Basalmembran von der Infektion betroffen ist. Das Fieber sinkt, vermutlich infolge der Bildung von Antikörpern, mit Auftreten des Ausschlags und steigt wieder mit der

Entwicklung der Pusteln. Letzteres ist vermutlich auf die Absorption toxischer Produkte nekrotischer Zellen zurückzuführen. Während der ersten 8 Tage manifestiert sich bei einigen Patienten eine Konjunktivitis, die häufig zur Erblindung führt. Eine Reihe anderer Komplikationen wird durch staphylokokkale Sekundärinfektionen ausgelöst [118, 119]. Die Schwere der Erkrankung ist durch die Immunantwort des Wirts bestimmt, dabei hat man die Todesursache als solche bisher nicht verstanden. Diskutiert werden intravaskuläre Koagulation, massive Sekretion von Zytokinen und zytopathischer Effekt durch starke Virusreplikation in den Geweben, die in einem Multiorganversagen enden [123, 125, 126].

*Variola minor* hat eine ähnliche Pathogenese wie *Variola major*, verläuft aber klinisch milder. Die Hautläsionen sind kleiner, weniger zahlreich und die Patienten gesunden schnell wieder.

## **1.5 Immunantwort**

Bei ordinären Krankheitsverläufen sind neutralisierende Antikörper ca. 18 Tage nach der Infektion im Serum der Patienten nachweisbar [127]. Patienten mit hämorrhagischem Verlauf weisen dagegen einen niedrigeren oder gar keinen Antikörpertiter auf [11]. Die Immunisierung mit *Vaccinia Viren* führt gewöhnlich schon nach 12-14 Tagen zur Bildung neutralisierender Antikörper, die ihre höchsten Titer ca. zwei Wochen später erreichen. Bei revakzinierten Individuen steigt der Titer neutralisierender Antikörper bereits nach sieben Tagen [128, 129]. Die starken Homologien zwischen den Epitopen aller OPV-Spezies führen zu einer ausgeprägten Kreuzreaktivität der gegen verschiedene *Orthopockenviren* gebildeten Antikörper [130].

Die Dauer der protektiven Wirkung einer Immunisierung oder überstandenen Infektion ist auf Grund der Ausrottung des *Variola Virus* schwer abzuschätzen. In neueren Studien konnte jedoch bei über 90% der untersuchten Individuen eine stabile humorale Immunantwort bis zu 75 Jahre nach der Immunisierung nachgewiesen werden [131, 132]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Antikörpertiter von Nicht-Immunisierten, die eine *Variola Virus*-Infektion überlebt haben, und von Immunisierten ein vergleichbares Level haben [133, 134].

Tierversuche haben gezeigt, dass neutralisierende Antikörper essenziell und ausreichend für einen immunologischen Schutz sind [135, 136]. Als neutralisierende Determinanten wurden verschiedene Proteine der inneren und äußeren Membran des Viruspartikels identifiziert [128]. Von den neutralisierenden Determinanten der inneren Membran spielen A27, D8 und H3 bei der Bindung des Virus an die Wirtszelle eine Rolle [89-91]; A17, L1 und A28 sind an der Fusion von Virus- und Zellmembran beteiligt [137-139]. Die Proteine B5 und A33 der äußeren Membran lösen eine protektive Antikörperantwort aus, wobei aber nur die Bindung von Antikörpern an B5 neutralisierend wirkt [140, 141]. Der Neutralisationseffekt von Anti-B5-Antikörpern wird durch das Komplementsystem verstärkt (Opsonisierung) und ist Isotypen-spezifisch. Auch die Anti-B5-Antikörper-vermittelte Zellyse von infizierten Zellen, die B5 auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist vom Komplementsystem abhängig [142]. Gegen A33 gerichtete Antikörper wirken ebenfalls im Zusammenhang mit dem Komplement. Dabei wird die äußere Membran der Viruspartikel zerstört und damit die Bindung von Anti-MV-Antikörpern ermöglicht [143].

Durch eine Immunisierung bzw. Infektion wird auch eine langanhaltende zelluläre Immunantwort ausgelöst, die allerdings mit der Zeit abnimmt [131, 132]. Ähnlich wie Antikörper erkennen CD4(+)T-Zellen spät exprimierte Proteine, CD8(+)-T-Zellen dagegen eher frühe Proteine [144]. Versuche in Tiermodellen zeigen, dass die T-Zell-Antwort infolge einer Immunisierung nicht für den Schutz vor der Infektion ausreicht [135, 136]. Experimente mit Knockout-Mäusen und Makaken belegen, dass die T-Zellantwort eher in der frühen Phase primärer, akuter Infektionen eine bedeutende Rolle spielt [145, 146]. Auch die Entwicklung schwerer Impfkomplicationen wie progressiver Vaccinia bei Menschen mit gestörter zellulärer Immunität weist auf die wichtige Rolle der T-Zellen bei primären Infektionen hin [147].

Pockenviren verfügen über eine Vielzahl von immunevasorischen Mechanismen [148]. Sie codieren für Proteine, die die Funktion von Interferonen, Chemokinen, inflammatorischen Zytokinen und Antikörpern inhibieren und in die Apoptose eingreifen. Sie hemmen die Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten und natürlicher Killerzellen und stören das Komplementsystem [143, 149-155]. Außerdem wird die Synthese zelleigener Produkte weitgehend stillgelegt, wohingegen über die Inhibierung der zellulären Proteinkinase (PKR) die Aktivität des

Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  und damit die Proteinsynthese sichergestellt wird [156]. Dabei hat jedes Virus ein spezifisches Set an immunmodulatorischen Proteinen. Auf Grund der hohen Ähnlichkeit zwischen einigen dieser immunmodulatorischen viralen Gene und zellulären Gene wird vermutet, dass die Viren diese im Laufe der Koevolution mit ihrem Wirt durch horizontalen Gentransfer in ihr Genom integriert haben.

Der Schaden, den Pockenviren in ihren Wirten verursachen, wird jedoch nicht nur durch ihre Replikation im Gewebe und die Immunmodulation ausgelöst, sondern auch durch eine überschießende Reaktion des Immunsystems. Der sogenannte „Zytokinsturm“ wird für die Ursache vieler Symptome und des Todes schwerer *Variola Virus*-Infektionen gehalten [157].

## **1.6 Prävention von Orthopockenvirus-Infektionen**

Während der globalen Kampagne der WHO zur Ausrottung des *Variola Virus* wurde mit Lebendvakzinen der ersten Generation geimpft. Die Produktion dieser Impfstoffe erfolgte durch Infektion von Kälbern über die Haut und anschließende Virusernte aus der Lymphe. Bei der Impfkampagne kamen verschiedene *Vaccinia Virus*-Stämme zum Einsatz (Tabelle 2). Zur Immunisierung wurde eine zweizackige Impfnadel verwendet, mit der nach Aufnahme einer definierten Flüssigkeitsmenge mehrmals in den Oberarm gestochen wurde. In der Regel wurde an der Einstichstelle 3-4 Tage später eine Papel sichtbar, die sich im weiteren Verlauf bis zu einer Pustel mit umgebendem Erythem entwickelte. Nach insgesamt etwa 12 Tagen bildete sich eine dunkelbraune bis schwarze Kruste. Innerhalb einer weiteren Woche fiel der Schorf ab und hinterließ eine tiefe Narbe [158]. Alle verwendeten Impfstoffe waren sehr effektiv aber mit unterschiedlich hohem Risiko behaftet [159]. Neben einigen unbedenklichen Nebenwirkungen wie grippeartigen Symptomen, großflächigen Ödemen, Satellitenläsionen und lokalen Lymphadenopathien kam es auch zu schweren und lebensbedrohlichen Impfkomplicationen. Dazu gehören postvaccinale Enzephalitis, akute Myoperikarditis, Ekzema vaccinatum und progressive bzw. generalisierte *Vaccinia* [158, 160-162]. Ursachen für eine erhöhte Prädisposition sind jede Art von Immundefizienzen und Dermatosen [158].

Um die Sicherheit der Immunisierung zu erhöhen, wurde eine zweite und eine dritte Generation von Impfstoffen entwickelt (Tabelle 2). In erster Linie wurde der Herstellungsprozess durch sterile Virusanzucht in Zellkulturen verändert. Auf diese Weise wird bei der Immunisierung zumindest die Gefahr durch bakterielle Infektionen auf Grund von kontaminierten Präparationen vermieden. Die entscheidende Weiterentwicklung in der dritten Generation beinhaltet die Attenuierung verschiedener Impfstämme durch multiple Passagierung, Erzeugung temperatursensitiver Mutanten oder die gezielte Deletion von Genen. Die sichersten, aber wahrscheinlich nicht effektivsten Impfstoffe liefert die Beschränkung auf Vakzine-Untereinheiten durch die Konstruktion von Protein- und DNA-Vakzinen. Die Ausrottung des *Variola Virus* gelang jedoch, bevor die Wirksamkeit neuerer Impfstoffe durch flächendeckenden Einsatz belegt werden konnte.

Nach den Terroranschlägen 2001 wurde in den USA die Immunisierung von Militärangehörigen und Mitarbeitern des Gesundheitswesens veranlasst [163] und u.a. in Deutschland, Großbritannien und den USA wurden Vakzinevorräte angelegt [164]. 2004 tagte das „Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus infections“ der WHO in Genf und empfahl den Aufbau einer WHO Pockenvirus-Vakzine-Bank, um im Notfall möglichst schnell auf einen *Variola Virus*-Ausbruch reagieren zu können. Vorgeschlagen wurde, diesen strategischen Impfstoff-Vorrat unter Mithilfe der Mitgliedsstaaten durch Stiftung von jeweils 10% der nationalen Bestände aufzubauen [165].

Bis 2007 wurden über 1,2 Millionen Menschen in den USA mit einer Vakzine der ersten Generation (Dryvax) geimpft [163]. Ausgeschlossen von einer Impfung waren Menschen mit Risikofaktoren wie Hautkrankheiten, Immundefizienzen, Herzerkrankungen und Allergien gegen Bestandteile der Vakzine, zudem HIV-Positive, Immunsupprimierte und Schwangere [166]. Dennoch traten in 140 Fällen eine Myokarditis und in 44 Fällen eine generalisierte Vaccinia oder Ekzema Vaccinatum auf [167]. Erst im Jahr 2008, nach der Zulassung von ACAM2000 durch die Food and Drug Administration (FDA), wurde auf die Verwendung eines Impfstoffes der zweiten Generation umgestellt. Mittlerweile gehören 200 Millionen Impfdosen ACAM2000 zum nationalen Vakzinevorrat der USA [168]. Die Verwendung des Impfstoffes ist jedoch nur bei Personen mit einem hohen Risiko für eine *Variola Virus*-Infektion indiziert [169].



Von den Impfstoffen der dritten Generation wurde einer bereits klinisch erprobt und in Japan lizenziert [170], andere befinden sich noch in der Entwicklung oder werden hinsichtlich ihrer Immunogenität und Sicherheit in präklinischen und klinischen Versuchen evaluiert. Der in Japan zugelassene und bevorratete LC16m8 leitet sich von einem Lister-Stamm ab, der durch serielle Passagierung bei 30°C auf primären Kaninchenzellen attenuiert wurde. 1974 und 1975 wurden kurz vor der Einstellung der Impfungen über 50.000 Menschen in Japan mit LC16m8 immunisiert [171]. Aktuelle klinische Studien zeigen jedoch, dass nach einer Immunisierung mit LC16m8 ein signifikant niedrigerer Neutralisierungstiter gebildet wird als nach einer Immunisierung mit Dryvax [170]. dVV-L ist eine defekte Lister-Mutante, der die für die Replikation essenzielle Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) fehlt. Durch Kombination mit konstruierten UDG-exprimierenden Zelllinien kann der Defekt komplementiert und somit das Virus vermehrt werden [172]. Solche nicht-replizierenden Impfstoffe werden für den Gebrauch als Prävakzine bei Risikogruppen diskutiert.

Ein anderer Impfstoffkandidat mit gutem Sicherheitsprofil ist das von Bavarian Nordic produzierte IMVAMUNE [173]. IMVAMUNE stammt aus der 597. Passage des *Vaccinia Virus Ankara* auf hühnerembryonalen Fibroblasten und ist in den meisten Säugetierzellen replikationsunfähig. Einer seiner Vorgänger ist das *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA), von dem Isolate aus verschiedenen jüngeren Passagen existieren [174]. Das aus der 571. Passage abgeleitete MVA-571 wurde 1976 bei ca. 120.000 Individuen mit Risikofaktoren in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzt [175]. Eine im Rahmen eines Patents veröffentlichte Untersuchung zeigt, dass Isolate aus verschiedenen Passagen jeweils in ihren Eigenschaften differieren und offensichtlich aus einer Mischung von Varianten bestehen [176]. Ein genetischer Variantenreichtum wurde kürzlich auch für Dryvax nachgewiesen [177]. Es ist anzunehmen, dass in allen Lebendimpfstoffen mehrere Varianten existieren, es sei denn, sie wurden wie NYVAC und IMVAMUNE aus einem Einzelklon gewonnen.

Mehrere Studien belegen eine schützende Wirkung durch die Immunisierung mit MVA-Isolaten in verschiedenen Mausmodellen [135, 178-180] sowie in einem Affenmodell [181, 182]. Für IMVAMUNE existieren bis heute nur wenige Daten bezüglich der Wirksamkeit. Bei drei Untersuchungen in Tiermodellen erfolgte die Immunisierung mit IMVAMUNE mehrere Wochen vor der Infektion. Eine zeigte hohe Wirksamkeit in einem Kaninchen/Kaninchenpockenmodell [183] und die beiden anderen limitierte Wirksamkeit in einem Maus- bzw. Makakenmodell mit

*Affenpockenviren* [184, 185]. Der therapeutische oder zeitgleiche Einsatz von IMVAMUNE mit der Belastungsinfektion schützte in einem Mausmodell die Tiere vor einer letalen Dosis *Ectromelievirus* [186]. Nach klinischen Prüfungen der Phase I und II [173, 174] erhielt IMVAMUNE im Jahr 2010 von der FDA den sogenannten Fast-Track-Status für ein beschleunigtes Zulassungsverfahren [1].

Zu den Immunisierungsstudien mit Vakzine-Untereinheiten gehört bisher die Untersuchung der Oberflächenproteine H3, L1, A33 und B5 im Mausmodell [187-193] sowie der Einsatz verschiedener DNA-Vakzine in Maus- und Makakenmodellen [191-193].

Schon in frühen Untersuchungen wurde die Insuffizienz inaktiverter Impfstoffe gegen eine *Orthopockenvirus*-Infektion in Tiermodellen dokumentiert [194-197].

**Tabelle 2:** Einige Impfstoffe und Impfstoffkandidaten gegen Variola

Virus Stamm	Vakzine	Details
<b>Erste Generation</b>		
NYCBOH	Dryvax®, SPSV®	Verwendung in USA <sup>1</sup>
NYCBOH	EM-63	Verwendung in Russland <sup>1</sup>
Tian Tian	Temple of Heaven	Verwendung in China <sup>1</sup>
Lister	Lancy-Vaxina/ Elstree-RIVM	Verwendung u.a. in Europa <sup>1</sup>
<b>Zweite Generation</b>		
NYCBOH	ACAM2000	2008 von der FDA zugelassen, Teil des nationalen Vorrats der USA
Lister	Elstree-BN	Klinische Versuche
<b>Dritte Generation</b>		
Lister	LC16m8	Attenuiert, B5R deletiert, in Japan 1974-1975 eingesetzt <sup>1</sup> , zugelassen und bevorratet
Ankara	MVA	Attenuiert, aus 570. Passage, 15% des Genoms deletiert, in BRD 1976 eingesetzt <sup>1</sup>
Ankara	IMVAMUNE	Attenuiert, Einzelklon aus 597. Passage, 15% Genom deletiert, klinische Versuche
Copenhagen	NYVAC	Attenuiert, 18 ORFs deletiert, Einzelklon
Lister	dVV-L	Attenuiert, UDG-Gen deletiert
verschiedene	Vakzine- Untereinheiten	Rekombinante Proteine, Plasmid-DNA

<sup>1</sup> Impfstoff wurde im Laufe der von der WHO global angesetzten Kampagne verwendet. Daten zusammengestellt aus: [159, 162].

## 1.7 Therapie von Orthopockenvirus-Infektionen

Bis heute stehen keine zugelassenen Therapeutika für die Behandlung von *Orthopockenvirus*-Infektionen zur Verfügung. Es gibt nur wenige antivirale Substanzen, die bisher gegen *Orthopockenviren in vivo* getestet wurden und im Notfall für eine Behandlung in Frage kämen. Dazu gehören Vaccinia Immunglobulin [198, 199], ST-246 [200], Cidofovir [185, 201] und sein Derivat CMX001 [202-205].

Etwa ab dem Beginn der Eradikationskampagne wurde Vaccinia Immunglobulin (VIG) als Maßnahme gegen schwere Impfkomplicationen eingesetzt [206]. Die Idee der Verwendung von VIG aus dem Serum immunisierter Individuen stammt aus den 40er Jahren von dem Pädiater Henry Kempe. Er schloss den Nutzen durch die Gabe von Immunglobulinen aus der Beobachtung, dass Kleinkinder von geimpften Müttern keine Impfläsion entwickelten [207]. Die Wirksamkeit von VIG wurde jedoch nie in kontrollierten klinischen Studien belegt [206]. Zunächst wurde das VIG auf intramuskulärem Weg injiziert, neuere Präparationen erlauben die intravenöse Applikation mit verbesserter Pharmakokinetik [208]. Seit 2005 ist VIG von der FDA ausschließlich für die Behandlung schwerer Impfwischenfälle zugelassen [209].

Cidofovir ist ein Nukleotidanalogen, das ursprünglich gegen ein breites Spektrum von DNA-Viren entwickelt wurde [210]. Bei Cidofovir-behandelten Zellen ist die DNA-Replikation der viralen Polymerase drastisch verlangsamt und die proofreading-Aktivität der Exonuklease inhibiert [211]. In der Folge werden aberrante DNA-Moleküle gebildet und deren Einbau in Viruscapside verhindert [212]. Die Wirksamkeit *in vivo* ist gegen verschiedene Pockenviren bestätigt worden [201, 213]. Da die Behandlung mit Cidofovir nur intravenös erfolgen kann und mit einer starken Nephrotoxizität verbunden ist, wird es nur bei AIDS-Patienten gegen eine CMV-vermittelte Retinitis angewendet [214]. Die Derivatisierung durch die kovalente Bindung einer Alkoxyalkylgruppe an Cidofovir verringert die Akkumulation in den Nieren und verbessert seine Bioverfügbarkeit [215]. Im Gegensatz zu Cidofovir kann das Lipidkonjugat CMX001 oral appliziert werden und wirkt nicht nephrotoxisch [216]. Im Tiermodell zeigt CMX001 eine ebenso gute Wirksamkeit gegen *Orthopockenviren* wie Cidofovir [185, 202-205]. Derzeit wird die Substanz in klinischen Studien der Phase II für die Prophylaxe humaner CMV-Infektionen geprüft [216, 217].

Das Agens ST-246 wurde 2002 in einem high-throughput-Screening einer chemischen Bibliothek gegen *Vaccinia* und *Kuhpockenviren* entdeckt. Ca. 350.000 Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, in Zellkultur den virusinduzierten zytopathischen Effekt (CPE) zu inhibieren. ST-246 bindet spezifisch an das OPV-Protein F13 und hemmt dadurch die Bildung von extrazellulären Partikeln [218]. Nach extensiven präklinischen Studien, die die Unbedenklichkeit von ST-246 und seine hohe Wirksamkeit gegen *Orthopockenviren* belegen [219], wurde die Substanz kürzlich erfolgreich in ersten klinischen Studien überprüft [220].

In den Jahren 2007 und 2009 wurden kombiniert ST-246, Cidofovir bzw. CMX001 und VIG in zwei Fällen von lebensbedrohlichen Impfkomplicationen in den USA eingesetzt. Bei einem der beiden Patienten handelte es sich um das zwei Jahre alte Kind eines zuvor geimpften Militärangehörigen. Die schwere Ekzema vaccinatum, die das mit einer Neurodermitis vorbelastete Kind entwickelte, erforderte neben der antiviralen Therapie eine Behandlung, wie sie bei großflächigen Verbrennungen notwendig ist [221]. In dem anderen Fall wurde versehentlich ein Militärangehöriger mit akuter myeloischer Leukämie geimpft. Der junge Mann entwickelte eine schwere progressive *Vaccinia* und im Laufe der folgenden Wochen mehrere bakterielle Superinfektionen [219, 222]. Beide Patienten überlebten nur sehr knapp. In Israel wurde 2002 ein junger Mann nach Impfung wegen einer Ekzema vaccinatum nur mit VIG behandelt. Da bei ihm eine Neurodermitis bekannt war, hätte auch dieser Patient von der Immunisierung ausgeschlossen werden müssen. Er überstand die Komplikation schwer vernarbt [223].

Diese Impfwischenfälle zeigen den Bedarf an Therapeutika gegen OPV-Infektionen, der bis heute nicht gedeckt werden kann. Eine Ergänzung bzw. Alternative zu den nur limitiert zu beschaffenden und teuren VIG könnte durch die Verwendung OPV-spezifischer IgY geschaffen werden. IgY ist das IgG-Äquivalent von Vögeln, Amphibien und Reptilien und wird vom Serum des Muttertiers auf das Eidotter übertragen. Nach der Immunisierung von Legehennen können die Antikörper kostengünstig aus den Eiern isoliert werden [224]. Im Vergleich zu den üblicherweise immunisierten Nagetieren wie Kaninchen kann eine 5-15-fach größere Menge an Antikörpern pro Monat gewonnen werden [225]. Dies liegt nicht nur an der immensen Menge an IgY, die in das Eidotter transferiert wird, sondern auch daran, dass Säugetieren gemäß dem Tierschutzgesetz nur alle zwei Wochen maximal 10% des gesamten Blutvolumens abgenommen werden darf [226]. In der vorliegenden Arbeit

wurden die Möglichkeit der für die Tiere sehr schonenden Gewinnung von OPV-spezifischen Antikörpern überprüft und Therapieansätze evaluiert.

## 1.8 Tiermodelle

Nach dem Arzneimittelgesetz müssen neue Wirkstoffe in präklinischen Studien auf ihre Unbedenklichkeit, Wirksamkeit und pharmazeutische Qualität getestet werden. Die toxikologischen Prüfungen sind nach Leitlinien der FDA und EMA (European Medicines Agency) bzw. der ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), die die Beurteilungskriterien weltweit harmonisieren soll, vorgeschrieben. Diese umfangreichen Untersuchungen werden *in vivo* durchgeführt und haben nach den Angaben des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) im Jahr 2010 ca. 9% aller Tierversuche im Pharmabereich ausgemacht [227]. Dabei sollen Sicherheitsparameter identifiziert und eine sichere Anfangsdosis für die anschließenden klinischen Studien festgestellt werden. Die Wirksamkeit eines Wirkstoffes kann in geeigneten Krankheitsmodellen nachgewiesen werden und stellt im Zulassungsverfahren einen wichtigen Meilenstein für die Pharmaunternehmen dar. Da die Relevanz solcher Modelle jedoch häufig nicht eindeutig belegt werden kann, schreibt die EMA den Wirksamkeitsnachweis im Tiermodell nicht vor. Allerdings scheitern die weitaus meisten Wirkstoffe in klinischen Studien laut Daten des Centre for Medicines Research an mangelnder Wirksamkeit oder ungünstiger Pharmakokinetik [228]. Um im Vorfeld Hinweise auf die Wirksamkeit im Menschen zu bekommen, müssen daher Tests in Tiermodellen durchgeführt werden. Die US FDA erließ die „animal efficacy rule“ für solche Substanzen, die wie bioterroristisch relevante Agenzien aus ethischen oder praktischen Gründen nicht am Menschen getestet werden können. Diese Regel erleichtert bei nachgewiesener Wirksamkeit *in vivo* die Zulassung therapeutischer Strategien und Vakzine und fordert den Nachweis in wenigstens einer Tierspezies. Dabei muss das Modell ausreichend gut charakterisiert sein und die Antwort im Menschen voraussagen können [229].

Seit den 50er Jahren wurden diverse Nagetier- und nicht-humane Primatenmodelle mit *Orthopockenviren* etabliert. Im Idealfall sollte ein Tiermodell alle kritischen Eigenschaften der *Variola Virus*-Infektion beim Menschen abbilden. Jedes Modell birgt jedoch spezifische Vor- und Nachteile und die Tests können nur in einer Kombination aus verschiedenen Modellen der „animal efficacy rule“ gerecht werden. Zudem sind viele Aspekte von OPV-Infektionen beim Menschen noch nicht geklärt, was die Extrapolation zusätzlich erschwert. Es existieren verschiedene Nagetiermodelle mit Ziesel, Präriehunden, Bilchen, Mäusen und Kaninchen, die auf unterschiedlichen Wegen mit *Affen-*, *Kuh-*, *Kaninchenpocken-*, *Ectromelie* oder *Vaccinia Viren* infiziert werden (Tabelle 3). Die Primatenmodelle beinhalten verschiedene Makakenmodelle, bei denen die Inokulation mit *Variola Viren* oder *Affenpockenviren* erfolgt, und ein Marmosetten/*Calpox Virus*-Modell [230, 231]. Bei allen Tiermodellen hängen die Infektionsdosen von den Infektionsrouten und eingesetzten Virusstämmen ab. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Therapieversuche mit IgY das *Vaccinia Virus*/Maus-Modell und für die Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE das Marmosetten/*Calpox Virus*-Modell verwendet.

### 1.8.1 Maus/*Vaccinia Virus* Modell

Wegen des leichteren Handlings und der Möglichkeit, Tierzahlen einzusetzen, die eine statistische Auswertung ermöglichen, und nicht zuletzt aus Kostengründen kommen in der Forschung mit *Orthopockenviren* am häufigsten Mausmodelle zum Einsatz. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodell werden Balb/c-Mäuse mit dem *Vaccinia Virus Western Reserve* auf intranasalem Weg infiziert. Abhängig von der Dosis verläuft die Infektion unterschiedlich progressiv. Die Symptome sind Teil des klinischen Scores, eines Punktesystems von 1 bis 4, nach dem der Krankheitsverlauf bewertet wird. Erste Anzeichen der Infektion machen sich bei den Tieren durch gesträubtes Fell (Score = 1) bemerkbar, gefolgt von einem gekrümmten Rücken (Score = 2), Atemschwierigkeiten (Score = 3) und Apathie (Score = 4). Sukzessive verlieren die Tiere an Gewicht. Nach den Vorgaben des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGeSo), der für Tierexperimente

zuständigen Behörde in Berlin, darf als Maßstab aktuell nur noch die Gewichtsreduktion herangezogen werden. Bei einem Verlust von 20% des Initialgewichts müssen die Tiere unter Betäubung getötet werden.

Die Pathogenese ist nicht genau untersucht. Bekannt ist, dass die Tiere eine Virämie entwickeln, die, abhängig von der Virusdosis, einige Tage nach der Infektion auftritt [232]. Obwohl das *Vaccinia Virus Western Reserve* dafür bekannt ist, bei Mäusen neurovirulent zu wirken, korreliert der Gewichtsverlust der Tiere offenbar nicht mit der Virusreplikation im Gehirn, sondern mit der in der Lunge. In Milz und Leber ist das Virus hingegen in nur geringen Mengen nachweisbar [198].

### 1.8.2 Marmosetten/*Calpox Virus* Modell

Während bei den Altweltaffenmodellen mit Makaken zwischen  $10^4$  und  $10^9$  PFU *Variola Virus* bzw. *Affenpockenvirus* eingesetzt werden müssen, um eine Erkrankung der Tiere hervorzurufen, liegt die  $MID_{50}$  bei dem Neuweltaffenmodell mit Marmosetten bei nur  $8,3 \times 10^2$  infektiösen Einheiten. Dieses Modell wurde erst im Jahr 2010 in einer Kooperation zwischen dem Robert Koch-Institut und dem Deutschen Primatenzentrum etabliert. Es arbeitet mit dem Kuhpocken-ähnlichen *Calpox Virus*, dessen Namen von dem Wirt *Callithrix jacchus* (Weißbüschelaffe) herrührt, aus dem es erstmals isoliert wurde [231]. Die Eigenschaften des Modells sind umfassend beschrieben worden. Die Infektion ähnelt hinsichtlich Transmission, Symptomatik, Krankheitsverlauf und Letalität stark der *Variola*-Infektion beim Menschen. Die Symptome sind allerdings im Gegensatz zu den Makakenmodellen dosisunabhängig und treten erst kurz vor dem Tod auf. Es bilden sich nur wenige Hautläsionen aus, deren Anzahl bei anderen Modellen Teil des klinischen Scores ist. Weitere Merkmale sind eine späte Serokonversion im Gegensatz zu nicht-hämorrhagischen *Variola*-Infektionen und ein breiter Zelltropismus mit hohen Viruskopienzahlen im Gewebe. Es gibt anscheinend keine subletalen Infektionen, damit ist der Eintritt des Todes also die Grundlage der Bewertung. Wahrscheinlich ist die massive Replikation im gesamten Organismus der Grund für das Multiorganversagen. Als Infektionsmarker werden Antikörper und Virusgenomäquivalente im Blut herangezogen. Die Infektion der Tiere erfolgt physiologisch über die Schleimhäute der Atemwege (intranasal),

wobei es keinen Hinweis auf eine Transmission auf den Menschen gibt. Da das Virus bei den *Kuhpockenviren* eingruppiert wurde, kann unter BSL-2 Bedingungen gearbeitet werden. Im Gegensatz zu Makaken haben Marmosetten eine hohe Reproduktionsrate in Gefangenschaft und sind kostengünstiger in der Haltung.

**Tabelle 3:** Tiermodelle mit Orthopockenviren

Virus	Tier	Dosis (PFU)	Infektionsroute	BSL
Variola	Makaken	$5 \times 10^5 - 10^9$	i.v./ Aerosol	4
Affenpocken	Makaken	$10^4 - 5 \times 10^7$	i.v./ Aerosol /i.t.	3
	Ziesel	$10^2 - 2,5 \times 10^4$	i.n./ i.p./ s.c.	
	Präriehunde	$10^4 - 2,3 \times 10^4$	i.n./ i.p./ i.d.	
	Bilche	$2 \times 10^4$	i.n.	
	Mäuse **	$4,2 \times 10^4$	i.n.	
Kuhpocken	Mäuse	$10^4 - 5 \times 10^8$	i.n./ Aerosol/i.p.	2
	Marmosetten*	$8,3 \times 10^3 (10 \times \text{MID})$	i.n.	
Kaninchenpocken	Mäuse	$3 \times 10^4 - 10^7$	i.n.	2
	Kaninchen	$10^3 - 10^7$	i.d./Aerosol	
Ectromelie	Mäuse	$10^0 - 9 \times 10^3$	Fußsohle/Aerosol	2
Vaccinia	Mäuse	$2 \times 10^2 - 10^6$	i.n./ i.d./ Skarif.	2
	Kaninchen	$10^2 - 10^5$	i.d./ Aerosol/ i.t.	

Quelle nach [230], \*[231], \*\*[185]



## 2 Ziel

Das Ziel dieser Arbeit war, Ansätze zur Therapie und Prävention von *Orthopockenvirus*-Infektionen zu entwickeln.

Im ersten Teil sollten dafür spezifische IgY-Antikörper durch die Immunisierung von Legehennen generiert werden. Der Vorteil bei der Verwendung von Legehennen ergibt sich aus der kostengünstigen und für die Tiere schonenden Gewinnung der Antikörper aus den Eidottern. Durch extensive Charakterisierung der IgY *in vitro* sollte ihre Eignung für den Einsatz *in vivo* evaluiert werden.

Es existieren mehrere Tiermodelle, an Hand derer neue Substanzen und Impfstoffe gegen Orthopockenviren erprobt werden. Zur ersten Überprüfung werden aus ethischen und auch aus praktischen Gründen in der Regel Mausmodelle verwendet.

In dieser Arbeit sollte mittels des *Vaccinia Virus*/Mausmodells die Wirksamkeit der generierten IgY über eine Applikationsroute getestet werden, die zum einen früh das Infektionsgeschehen beeinflussen kann und zum anderen gut auf das humane System übertragbar ist.

Im zweiten Teil sollte der Pockenvirus-Impfstoff IMVAMUNE auf seine Wirksamkeit in einem nicht-humanen Primatenmodell untersucht werden. Diese weitgehend replikationsdefiziente Lebendvakzine der dritten Generation zeigt ein gutes Sicherheitsprofil und hat bereits von der FDA den sogenannten Fast Track-Status für ein beschleunigtes Zulassungsverfahren erhalten [1]. Da bisher aber nur wenige Daten über die Schutzwirkung von IMVAMUNE gegen *Orthopockenviren* existieren, sollte seine Wirksamkeit im kürzlich etablierten Weißbüschelaffen/*Calpox Virus*-Modell überprüft werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Verbrauchsmaterialien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, Seelze
Aceton >99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm™ECL	GE Healthcare
Amicon Ultra-15 Filter Units	Millipore
a-rabbit-IgG, HRP-linked Ab	Cell Signaling Technology
bActin Rabbit Ab	Cell Signaling Technology
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bottle-Top-Filter (0,22µm)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Carboxymethylcellulose	BDH Prolabo, Merck, Darmstadt
cDNA Synthese Kit	Ambion, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie (PageBlue)	Thermo Scientific, Schwerte
Deckgläschen, 24x60mm	Carl Roth, Karlsruhe
Dialysierschlauch Visking	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
D-MEM	Mediumküche, RKI
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze
Einmal-Skalpelle Cutoff®	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen, Omnifix®	B/BRAUN
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, >99%	Carl Roth, Karlsruhe
Evans Blue	Sigma-Aldrich, Seelze
Expand Long Range dNTPack	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Faltenfilter Typ 600P	Carl Roth, Karlsruhe
FITC donkey α-chicken IgY	Dianova GmbH, Hamburg
FKS	Gibco BRL®
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe

HRP goat $\alpha$ -human IgG	Life Technologies GmbH, Invitrogen™
HRP goat $\alpha$ -mouse IgM	Dianova GmbH, Hamburg
HRP goat $\alpha$ -mouse IgM	Dianova GmbH, Hamburg
HRP rabbit $\alpha$ -chicken IgY	Dianova GmbH, Hamburg
Isopropanol	Carl Roth, Darmstadt
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR, Darmstadt
Kanülen 23G	BD Microlance™ 3
KHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Lane Marker Sample Buffers	Thermo Scientific, Schwerte
L-Glutamin, 200mM	PAA the cell culture company
Mikro-Schraubröhren, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotitelplatten, MaxiSorp	Nunc, Langenselbold
Mounting Medium	Dako, Hamburg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9%	Mediumküche, RKI
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
Naphtol Blue Black	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Seelze
NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose-Membran	PALL Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA
NucleoSpin® QuickPure Kit	Macherey-Nagel
Objekträger, 12Well	Thermo Scientific, Schwerte
PagerRuler™ Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PBS	Mediumküche, RKI
Pen/Strep	PAA the cell culture company
<i>picoBlue</i> ™ Immunoscreening	Agilent Technologies, Inc.
Pierce ECL WB Substrate	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce Fast Semi-Dry T-Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Polyethylenglykol 6000	Carl Roth, Karlsruhe
Precellys-Keramik-Kügelchen	Peqlab, Erlangen
Precise™ Protein Gels, 8-16%	Thermo Scientific, Schwerte
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze
RIPA-Puffer	Thermo Scientific, Schwerte
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Saccharose, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Propiolacton	Ferak Berlin GmbH
Sterilfilter (0,22 $\mu$ m)	Whatman® Schleicher & Schuell
SuperScript II RT Kit	Life Technologies GmbH, Invitrogen™
Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, Seelze
Trehalose D (+)	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	PAA the cell culture company
Trypsin-EDTA, 0,5%	Gibco BRL®
TURBO DNA-free™ Kit	Ambion, Inc.
Tween®20	Carl Roth, Karlsruhe
Viral NA Small Volume Kit	Roche Applied Science
Whatman Gel Blotting Papier	GE Healthcare
ZAP Express® Predigested®	
Gigapack III Gold Cloning Kit	Agilent Technologies, Inc.
Zentrifugenröhrchen	VWR, Darmstadt

### 3.2 Geräte

Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5415C	Eppendorf, Hamburg
Rotator	Kiskar
Vortexer MS2 MiniShaker	IKA, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen
Mikroskop Axioskop 40cFL	Zeiss, Oberkochen
Laserscanning Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
NanoDrop Spektrophotometer	Thermo Scientific, Schwerte
pH-Meter QpH 70	VWR, Darmstadt

Äkta Explorer 100	GE Healthcare
ELISA Washer HydroFlex™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz,
ELISA Reader Infinite®200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz,
PIERCE Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Scientific, Schwerte
Gelkammer MiniProtean™ III System	BioRad
Power Supply ST304	GIBCO/BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Entwickler WB Curix 60	Agfa HealthCare GmbH, Bonn
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschrank -20°C	Bosch
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Extraktionsroboter, MagNA Pure	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Homogenisator FastPrep® FP120	MP Biomedicals, Heidelberg
Power Supply ST304	Gibco BRL, Eggenstein
Gelkammer Horizon 58	Gibco BRL, Eggenstein
Videodokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies, Inc., CA, USA
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft GmbH Dresden
Schüttler für Bakterienkulturen	Kühner, Schweiz
RealTime PCR System Mx3000P	Agilent Technologies, Inc.
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mastercycler® ep Gradient	Eppendorf, Hamburg

### 3.3 Viren und Zellen

<i>Calpox Virus</i>	<i>Calpox Virus</i> -Isolat eines infizierten <i>Callithrix jacchus</i> , 2002, RKI; ECACC Accession number: 06013101
VV LE-BN	<i>Vaccinia Virus Lister-Elstree</i> Bavarian Nordic, LELS-2003-007; Lot 120103, 2003, Bavarian Nordic GmbH, Martinsried
VV L-E	<i>Vaccinia Virus Lister-Elstree</i> ,
VV WR	<i>Vaccinia Virus Western Reserve</i> , ATCC-VR1354

---

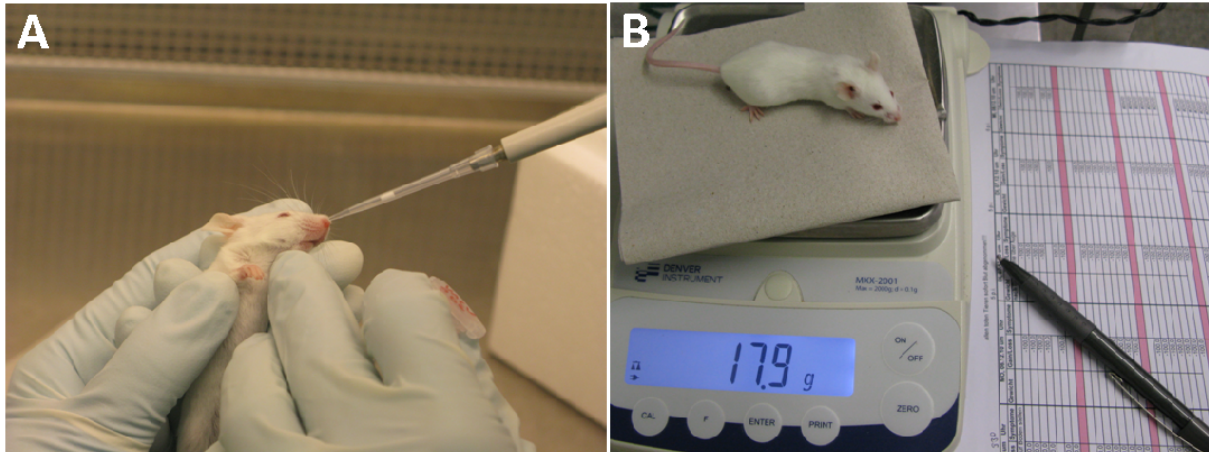
Vero C1008	Zelllinie von Nierengewebe einer grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ), ECACC 85020206
Hep2	Zelllinie aus humanem Cervixcarzinom, ECACC 86030501
CEF	primäre Fibroblasten, frisch aus bebrüteten Eiern isoliert

### **3.4 Tierexperimente**

#### **3.4.1 Mäuse – Entwicklung eines Therapieansatzes mit IgY**

Die Versuche mit den Mäusen wurden im Tierstall des Robert Koch-Instituts durchgeführt. Die Genehmigungsnummer des Landesamts für Gesundheit und Soziales für dieses Versuchsvorhaben lautete 0258/08. Die 5 Wochen alten Balb/c-Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen und in Typ III Käfigen mit Papierwolle als Nistmaterial, Mäusehaus und Nagehölzern in Gruppen von je 6 Tieren gehalten. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere einer Gruppe wurden durch Ohrlochmarkierungen unterschieden. Alle Manipulationen wie Blutabnahme, Infektion und Behandlung wurden unter Betäubung mit Isofluran vorgenommen. Die Infektion mit *Vaccinia Virus Western Reserve* erfolgte auf intranasalem Weg mit je 10µl in PBS verdünnter Virussuspension pro Nasenloch. Die Behandlungen erfolgten ebenfalls über die intranasale Route in einem Volumen von je 25µl je Nasenloch (Abbildung 5A). Zur Kontrolle wurde eine Gruppe mit PBS mock-infiziert und mit IgY „behandelt“, und zwei Gruppen mit Virus infiziert, von denen die eine mit unspezifischen IgY und die andere mit PBS „behandelt“ wurde, um einen negativen Effekt durch die Manipulation selbst ausschließen zu können bzw. den Behandlungserfolg auf die Spezifität der IgY zurückführen zu können. Zusätzlich wurde in den ersten beiden Versuchen je eine Gruppe mit *Vaccinia* Immunglobulin (VIG) behandelt. Die Tiere wurden täglich zweimal gewogen und die Symptome bewertet (Abbildung 5B). Die Beurteilung der Symptome folgt dabei einem Punktesystem von 0 bis 4 (0 = gesund, 1 = gesträubtes Fell, 2 = 1 + gekrümmter Rücken, 3 = 2 + Atmungsschwierigkeiten, verminderte Motilität, 4 = 3 + geringe Motilität). Eine Woche nach der Infektion wurde

allen Tieren ca. 50µl Blut abgenommen, um eine eventuelle Virämie und Antikörper nachzuweisen. Am Ende des Experiments oder bei einem Verlust von 20% des Initialgewichts wurden die Tiere unter Betäubung durch Genickbruch getötet und Blut, Leber, Niere und Milz entnommen. Die Organe wurden sofort nach der Entnahme im Ganzen in Flüssigstickstoff eingefroren und weiterhin bei -80°C gelagert.



**Abbildung 5: Manipulation und Überwachung/Kontrolle von Balb/c-Mäusen.** A) Intranasale Infektion einer mit Isofluran betäubten Maus. B) Bewertung des Krankheitsverlaufs durch tägliches Wiegen jedes Tieres.

### 3.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Gewichtsverläufe erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism durch One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die Signifikanzwerte beziehen sich dabei auf die Unterschiede zwischen nicht-infizierter Kontrollgruppe und infizierten Gruppen (\*\* $p = 0,001$ , \*\*  $p = 0,01$ , \*  $p = 0,05$ ).

### 3.4.3 Affen – Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE

Die Tierexperimente wurden gemäß dem Tierschutzgesetz in Kooperation mit Dr. C. Stahl-Hennig und Dr. K. Mätz-Rensing im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in

Göttingen durchgeführt. Die Genehmigungsnummer für das Versuchsvorhaben lautet 33.42502-04-019/07. Die Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) wurden im DPZ gezüchtet. Tiere verschiedenen Alters wurden unter L3-Bedingungen immunisiert und infiziert. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen (130cm x 53cm x 80cm) mit visuellem und akustischem Kontakt zueinander gehalten (25°C, 60% Luftfeuchtigkeit). Die Infektion wurde unter Narkose durch Injektion von 0,1ml Göttinger Mischung II (GMII) pro 200g Körpergewicht in den Oberschenkelmuskel durchgeführt, die Immunisierung und Blutabnahme mit 10mg Ketamin. Immunisiert wurde intramuskulär in den Oberarm mit 0,5ml IMVAMUNE® ( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) und infiziert intranasal mit je 50µl Calpox Virus pro Nasenloch. Der Krankheitsverlauf nach Infektion wurde täglich überwacht. Zu vorher definierten Zeitpunkten wurden Rachenabstriche gemacht und Blut (Vacutainer® Plus und Vacutainer® system K2E 4.5 ml, Becton Dickinson, Heidelberg) entnommen. Bei starken Symptomen bzw. am Ende des Experiments wurden die Tiere eingeschläfert und Organproben entnommen, die sofort in Flüssigstickstoff eingefroren wurden. Die weitere Lagerung der Organproben erfolgte bei -80°C.

Narkotisierungslösung (1 ml GMII):

- 10 mg Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Germany)
- 50 mg Atropin (Boehringer, Ingelheim, Germany)
- 50 mg Ketamin (Ketalar®, Parke-Davis, USA)

### **3.5 Molekularbiologische Untersuchungen von Blut- und Gewebeproben**

#### **3.5.1 DNA- und RNA-Extraktion aus EDTA-Blut**

Das EDTA-Blut der Affen wurde 10min bei 200g zentrifugiert und das Plasma abpipettiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die DNA-Extraktion wurden 100µl Blut mit 100µl PBS auf 200µl Probenvolumen aufgefüllt und mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit die DNA nach den



Herstellerangaben extrahiert. Der Rest des Blutes wurde für die RNA-Extraktion verwendet. Dazu wurden zunächst die Erythrozyten in der Blutprobe durch Zugabe von 10ml RCLB und 10min Inkubation lysiert. Anschließend wurde bei 200g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden durch Zugabe von 5ml PBS gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 350µl RLT-Puffer resuspendiert. Die RNA wurde dann gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits extrahiert und die enthaltene DNA mittels TURBO DNA-free™ Kit verdaut.

Red cell lysis buffer (RCLB):

8,29g NH<sub>4</sub>Cl

1g KHCO<sub>3</sub>

0,372g EDTA

ad 1l ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, autoklaviert

### **3.5.2 DNA-Extraktion aus Blutkuchen**

Das Blut der Mäuse wurde 10min bei 200g zentrifugiert und das Plasma abpipettiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der geronnene Blutkuchen wurde für die DNA-Extraktion verwendet, die mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Kits erfolgte. Dazu wurde der Blutkuchen zunächst mit 20µl Proteinase K und 200µl Puffer AL versetzt und bei 56°C bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Nach der Zugabe von 200µl Ethanol wurde das Gemisch dann auf die Säulen gegeben und die DNA gemäß den Angaben des Kit-Herstellers extrahiert.

### **3.5.3 DNA-Extraktion aus Gewebe**

Das nach der Organentnahme in Flüssigstickstoff eingefrorene Affengewebe wurde auf Eis aufgetaut und ca. 1mg Gewebe mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und zerkleinert. Die Homogenisierung erfolgte in 400µl PBS mit Keramikkügelchen in einem Homogenisator 2x20s bei 6m/s.

Die Organe der Mäuse wurden auf Eis aufgetaut und in 1ml PBS mit Keramikkügelchen im Homogenisator 2x20s bei 6m/s homogenisiert.

Alle Homogenate wurden mit Hilfe der Proteinase K und Lysepuffern aus dem DNeasy Blood and Tissue Kit lysiert. Dazu wurden 100µl der Homogenate mit 180µl ATL und 20µl Proteinase K vermischt, anschließend mit 200µl AL versetzt und bei 56°C inkubiert. Nach 10min wurden 200µl Ethanol zugegeben, gemischt und 3min bei 20.000g zentrifugiert. 200µl des Überstands wurden in eine 96-Well-Platte von Roche überführt und in einem Extraktionsroboter (Roche MagNA Pure 96-System) mit dem Viral NA Small Volume Kit prozessiert. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgte bei -20°C.

### **3.5.4 cDNA-Synthese**

Für den Nachweis viraler RNA in Blutproben wurde zunächst die extrahierte RNA mit dem SuperScript II Reverse Transkriptase Kit in cDNA in einem Gesamtvolumen von 20µl umgeschrieben. Zuerst wurden 10,3µl der RNA auf Eis mit 1µl Oligo d(T)<sub>16</sub> Primern (Applied Biosystems, Weiterstadt) gemischt und 5min bei 65°C zum Annealing inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 15min auf 4°C gekühlt und dann der Mastermix für die reverse Transkription nach den Vorgaben des Herstellers zugegeben. Als Kontrolle für den vollständigen DNA-Verdau wurde jede Probe einmal ohne die reverse Transkriptase mitgeführt. Die Proben wurden 60min bei 42°C inkubiert, dann 7min auf 95°C erhitzt und schließlich auf 4°C gekühlt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

### **3.5.5 Real Time-PCR**

Der quantitative Nachweis viraler Nukleinsäuren aus Blut- und Gewebeproben erfolgte über eine Real Time PCR mit spezifischen, Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden. Es wurden drei bereits etablierte Assays verwendet. Einer weist spezifisch *Kuhpockenvirus*-DNA nach (Referenz-Sequenz: AF482758, Gen CPXV-BR\_084 bzw. VV-Cop-I3L) und wurde für den Nachweis von *Calpox Virus*-

DNA eingesetzt [231]. Ein *Orthopockenvirus*-spezifischer Assay, der jedoch das *Calpox Virus* nicht mit erfasst, wurde für den Nachweis von IMVAMUNE®-DNA in den Affenproben und für den Nachweis von *Vaccinia Virus Western Reserve*-DNA in den Mausproben eingesetzt ([233], Kramski et al., in Vorbereitung). Bei dem dritten Assay handelte es sich um einen c-Myc-spezifischen Assay, der als Referenz diente [181]. Die Quantifizierung erfolgte für jeden Assay über Plasmid-Standards und die Normalisierung auf die Gewebemenge über das „housekeeping“ Gen c-Myc. Die Messungen wurden mit einem Stratagene Mx3005P und die Auswertungen mit Hilfe der Software MxPro (Agilent Technologies, Inc.) vorgenommen.

Primer und Sonden:

Calpox DNA-Nachweis (Amplikonlänge 138bp):

Cal foreward (sense):	gTCTTTCTCgTTTACCAAgTgC
Cal reverse:	ACAgAgAAAACATTTAAggATgAATCTATA
Cal TMGB:	F-ATAgCTCCgTTTATTTTgTTA NQF MGB

OPV-DNA-Nachweis (Amplikonlänge 140bp):

OPV foreward:	gCCAATTgTCTTTCTCTTTTACTgA
OPV reverse:	gAAAACATTTAAggATgAATCCATCT
OPV TMGB:	F-CCTTCTATAgATCTgAgAAT NQF MGB

c-myc-DNA-Nachweis (Amplikonlänge 80bp):

c-myc foreward:	gCCAgAggAggAACgAgCT
c-myc reverse:	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA
c-myc TM:	F-TgCCCTgCgTgACCAgATCC-T

F = FAM, T = TAMRA, TM = Hybridisierungssonde, TMGB = MGB-Hybridisierungssonde (minor groove binder), NFQ = nichtfluoreszierender Quencher

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25µl angesetzt:

10x Puffer	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5µl
dNTPs (2,5mM)	1µl
Primer F (10µM)	0,75µl
Primer R (10µM)	0,75µl
Sonde (10µM)	0,25µl

---

Taq-Polymerase	0,25µl
DNA/cDNA	5/2µl
Wasser	12/15µl

Platinum® Taq DNA-Polymerase, 10x Puffer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs (Invitrogen™)  
DNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich, Seelze)

Die Primer und Hybridisierungs-Sonden wurden bei TIB Molbiol (Berlin, Germany), die TMGB-Sonden bei Applied Biosystems (Weiterstadt) synthetisiert.

Reaktionsbedingungen:

$$45x \begin{cases} 95^{\circ}\text{C} & 10' \\ 95^{\circ}\text{C} & 15'' \\ 60^{\circ}\text{C} & 35'' \end{cases}$$

### 3.5.6 Herstellung der Plasmidstandards

Für die absolute Quantifizierung viraler Nukleinsäuren aus Affen- und Mausproben wurden Standardgeraden mit Plasmiden verwendet, die die entsprechende nachzuweisende Sequenz enthielten. Für die Herstellung dieser Plasmidstandards wurden die jeweiligen PCR-Produkte der drei bereits unter 3.5.5 beschriebenen PCR-Assays auf einem Agarosegel aufgetrennt, nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in einen Vektor ligiert. Zur Vermehrung wurden die Plasmide dann in E.coli-Zellen transformiert, positive Klone selektiert und in Schüttelkulturen angezogen. Nach der anschließenden Plasmidpräparation aus den Zellen wurden die Inserts zur Bestätigung sequenziert.

#### 3.5.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

2%ige Agarose wurde in der Mikrowelle geschmolzen und 3µl Ethidiumbromid zugegeben (3µl/100ml) und in eine Gelkammer gegossen. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden diese mit einem 6x Ladepuffer versetzt und in die Probestasche

des erhärteten Gels aufgetragen. Innerhalb 1h wurden die Produkte in Laufpuffer bei 90V ihrer Größe nach aufgetrennt und durch die Interkalierung des fluoreszierenden Farbstoffs in die doppelsträngige DNA unter UV-Licht detektiert. Die Größe des PCR-Produktes wurde an Hand eines Größenstandards bestimmt.

Ethidiumbromid, 1% (10mg/ml), Carl Roth, Karlsruhe

6x DNA loading dye (Fermentas)

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)

PeqGOLD Universal Agarose (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

TAE-Puffer (50x) pH 8:

242g Tris Base (Merck)

57,1g Eisessig (Merck)

100ml 0,5M EDTA (Sigma-Aldrich, Seelze)

ad 1l ddH<sub>2</sub>O

TAE-Puffer (1x):

20ml TAE-Puffer 50x

ad 1l ddH<sub>2</sub>O

### 3.5.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte und Klonierung

Die PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels eines Geextraktionskits (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend wurden die Produkte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen®) in einen pCR 2.1 Vektor ligiert.

PCR-Produkt            0,5 - 4µl

pCR 2.1 Vektor        0,5µl

Salt-Solution           1µl

H<sub>2</sub>O                        ad 6µl

Inkubation für 20min auf Eis

### 3.5.6.3 Transformation

Der Ligationsansatz wurde zu 25µl kompetenten E. coli-Zellen (TOP10, Invitrogen™) in ein 1,5ml Schraubdeckelröhrchen gegeben, vorsichtig gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock (30s bei 42°C im Wasserbad) wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt, 250µl SOC-Medium zugegeben und 60min bei 37°C inkubiert. Jeweils 75µl wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (100µg/ml), X-Gal (40µg/ml) und IPTG (0,5mM) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiße Kolonien wurden unter sterilen Bedingungen gepickt und in 3ml Flüssig-LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

LB-Platten (Luria-Bertani):

- 10g Bacto-Trypton
- 5g Bacto-Hefe-Extrakt (Gibco BRL® Eggenstein, Germany)
- 10g NaCl
- 15g Agar (Merck, Darmstadt, Germany)
- ad 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 7, autoklaviert
- 500µl 1M IPTG (BTS-Biotech, St. Leon-Rot, Germany)
- 1ml 40 mg/ml X-Gal (BTS-Biotech)
- 1ml 100 mg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Seelze)

LB-Amp-Medium:

- 10g Bacto-Trypton
- 5g Bacto-Hefe-Extrakt (Gibco BRL®)
- 10g NaCl (Merck)
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 7, autoklaviert
- 1ml 100mg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Seelze)

### 3.5.6.4 Plasmidpräparation

Die Plasmide wurden aus 1,5ml einer Übernachtskultur mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit

(Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, während die Anzahl der Kopien pro Volumen folgendermaßen berechnet wurde:

Molekulargewicht/bp = 660g/mol

Plasmidgröße [bp] = Vektorgröße [bp] + Insertgröße [bp]

Avogadro-Konstante: 1 mol DNA =  $6,02 \times 10^{23}$  /mol

Molarität [g/mol] = Plasmidgröße [bp] x 660 g/ml

Molarität [g/mol] /  $6,02 \times 10^{23}$  /mol = Gewicht [g/Plasmid]

DNA-Konzentration [ng/μl] / Gewicht [ng/Plasmid] = Anzahl Plasmide [Plasmide/μl]

### 3.5.6.5 Sequenzierung der Inserts

Um sicherzustellen, dass die aufgereinigten Plasmide die korrekten Sequenzen enthielten, wurden sie nach der Kettenabbruchmethode von Sanger sequenziert. Die Reaktionen wurden wie bereits beschrieben mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) für jeden Primer separat angesetzt und mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software SeqMan (DNASTar Lasergene 7.2.1, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) ausgewertet.

## 3.6 Zellkultur

Die verwendeten Zellkulturmethoden beinhalten die Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien sowie die Isolierung von primären Zellen.

### 3.6.1 Kultivierung von Zellen

Sowohl die Hep2-Zellen als auch die Vero-Zellen wurden gemäß den Empfehlungen der ECACC (European Collection of Cell Cultures) kultiviert. Es wurde für alle

kultivierten Zellen D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 5% FKS und 1% Glutamin verwendet. Bei ca. 90% Konfluenz wurden die Zellen 1:5 geteilt und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Für die Passagierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Für das Umsetzen der CEF-Zellen wurde Trypsin ohne EDTA verwendet, für die Vero- und Hep2-Zellen wurde Trypsin-EDTA eingesetzt.

### **3.6.2 Isolierung von hühnerembryonalen Fibroblasten (CEF-Zellen)**

Die Schale von zehn Tage bebrüteten Hühnereiern wurde nach 3-4h bei 4°C an der Luftkammer geöffnet und die Allantoismembran mit einer Pinzette beseitigt, um den Embryo zu entnehmen. Nach dem Abschneiden von Kopf und Extremitäten sowie dem Entfernen der Innereien wurde der Rumpf mit einer Schere zerkleinert und das Gewebe anschließend in 15ml Trypsin aufgenommen und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen und das Pellet mit 10ml Trypsin vermischt, in einen 200ml Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Magnetrührer 30min langsam gerührt, um das Gewebe weiter zu zerkleinern. Danach wurde die Zellsuspension in ein 50ml Falconröhrchen gegeben, nach 5min Wartezeit der Überstand mit den Einzelzellen abgenommen, in ein neues Falconröhrchen überführt und 5min bei 200g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen, das Zellpellet in frischem Medium (D-MEM, 5% FKS, 1% Glutamin) aufgenommen, mittels einer Neubauer-Kammer gezählt, jeweils ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen pro 175cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät und 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen weiterhin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und bei Konfluenz nach 2-3 Tagen zur weiteren Vermehrung in einem Verhältnis von 1:2 umgesetzt.



### 3.7 Virusanzucht und Virusinaktivierung

Für die Immunisierung der Hühner wurden die Virusstocks auf CEF-Zellen angezogen, um eine Bildung von Antikörpern gegen Wirtszellbestandteile zu vermeiden. Für die Infektion von Mäusen und Affen und zur Antigenherstellung für die ELISAs wurden die Viren auf Hep2-Zellen angezogen. Die Zellen wurden bei ca. 75% Konfluenz mit 10ml frischem Medium versehen und mit *Vaccinia Virus Western Reserve* bzw. *Vaccinia Virus Lister-Elstree* mit einer MOI von 0,1 oder mit *Calpox Virus* mit einer MOI von 0,2 infiziert und 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde 25ml frisches Medium zugegeben und 3-4 Tage bis zur Entwicklung eines ausgeprägten zytopathischen Effekts weiterhin inkubiert. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgeschabt und die Zellsuspension in 50ml Falconröhrchen überführt. Nach Zugabe steriler Glaskügelchen wurden die Zellen durch Vortexen aufgebrochen. Nach der Lyse der Zellen wurden die Zelltrümmer bei 200g 10min abzentrifugiert und der Überstand in 250ml-Ultrazentrifugenbechern (Beckman Coulter, Hamburg) auf ein 36%iges Saccharosekissen (ca. 40ml) geschichtet. Nach 3h Ultrazentrifugation in einem Beckman Typ 19 Rotor bei 18.000 rpm ( $3,4 \times 10^3 g$ ) und 4°C wurde der Überstand abgegossen und das Viruspellet für die Infektion der Affen und Immunisierung der Hühner in 0,5ml PBS bzw. für die Infektion der Mäuse in 0,5ml 10mM Tris (v/v, pH9) aufgenommen und über Nacht bei 4°C zum Quellen stehen gelassen. Am Folgetag wurden die Virussuspensionen in insgesamt 1ml Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. 100µl der Virussuspensionen wurden abgenommen, um die Anzahl Plaque-bildender Einheiten mittels Plaque-Test zu bestimmen.

Die für die Immunisierung der Hühner zu inaktivierenden Viruspräparationen wurden mit  $\beta$ -Propiolacton in einer Endkonzentration von 0,25% über Nacht bei 4°C inkubiert. Um restliches  $\beta$ -Propiolacton zu entfernen, wurden die Gemische anschließend für 4h auf 37°C erwärmt, bevor mittels Plaque-Test die Inaktivierung bestätigt wurde.

36% Saccharose:

144g Saccharose

ad 400ml PBS, sterilfiltriert

Optima™ L-100K Ultracentrifuge, Beckman Coulter

### 3.8 *Plaque-Test*

Zur Bestimmung der Zahl infektiöser Partikel (plaque forming units, PFU) in den Virussuspensionen, Rachentupfern und Gewebeproben wurden jeweils  $8 \times 10^4$  Vero-Zellen pro Well in einer 48-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und  $100\mu\text{l}$  frisches Medium zugegeben. Die Rachentupfer wurden in  $300\mu\text{l}$  D-MEM (5% FKS, 1% Glutamin, +1x Pen/Strep) resuspendiert.

Von den zu testenden Gewebekomogenaten, Rachentupfer- und Virussuspensionen wurden Verdünnungsreihen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  im Zellkulturmedium angelegt. Je  $100\mu\text{l}$  jeder Verdünnungsstufe wurden in Doppelansätzen in die 48-Well-Platte gegeben und 4h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde mit je  $200\mu\text{l}$  1,6% CMC überschichtet und vier Tage lang unter denselben Bedingungen inkubiert. Für die Auswertung wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen mit je 1ml 3,7% Formaldehyd pro Well 30min bei Raumtemperatur fixiert sowie die Viren inaktiviert. Schließlich wurde mit 0,5ml Naphtol Blue Black 20min gefärbt und einmal mit Leitungswasser gewaschen. Die Plaques pro Well wurden gezählt. Der Virustiter wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Titer/ml} = (n \times f)/v$$

$n = \Sigma$  gezählter Plaques aller Verdünnungsstufen

$f =$  Verdünnungsfaktor, bei dem Plaques auszählbar sind

$v = \Sigma$  des eingesetzten Volumens

1,6% Carboxymethylcellulose (CMC):

3,2g CMC in 200ml Zellkulturmedium gelöst

Naphtol Blue Black:

1g Naphtol Blue Black

13,6g Natriumacetat

60ml Eisessig

ad 1l ddH<sub>2</sub>O

3,7% Formaldehyd:

100ml 37% Formaldehyd in 900ml PBS

## **3.9 Generierung von IgY**

### **3.9.1 Immunisierung von Hühnern**

Es wurden acht 16-Wochen alte Legehennen (ISA Brown and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb GmbH, Bestensee, Germany) immunisiert, die im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) unter S2-Bedingungen in Edelstahlkäfigen (Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) gehalten wurden. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Immunisierungen erfolgten mit frischen, nicht-inaktivierten oder inaktivierten Viruspräparationen, die zuvor 1:1 mit „Freund’s complete Adjuvans“ (FCA, Sigma-Aldrich, Seelze) gemischt wurden. Jeweils 200µl wurden in den linken und rechten Brustmuskel injiziert. Die Booster-Injektionen wurden im Abstand von drei bis fünf Wochen mit „Freund’s incomplete Adjuvans“ (FIA) durchgeführt. Die Versuche erfolgten gemäß den Richtlinien des Landesamts für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) (Genehmigungsnummer: H 0069/03). Die Eier wurden täglich gesammelt, markiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **3.9.2 Isolierung von IgY aus Hühnereiern**

Die Isolation der IgY aus den Eidottern erfolgte im Wesentlichen nach der Extraktionsmethode mittels PEG6000 [234]. Die Eier wurden aufgeschlagen, das Eigelb vom Eiweiß getrennt und durch Rollen auf einem Papiertuch möglichst viel vom Eiweiß entfernt. Das Eigelb wurde mit einer sterilen Pipettenspitze angestochen, in ein 50ml Falkonröhrchen überführt und das doppelte Volumen an PBS hinzugegeben. Um die fetthaltigen Bestandteile durch Präzipitation zu entfernen, wurde anschließend mit 3,5% (w/v) PEG6000 10min bei Raumtemperatur auf einem

Rotator inkubiert. Die gefällten, fetthaltigen Bestandteile wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 14.000g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde filtriert und das Pellet verworfen. Durch erneute Zugabe von 8,5% PEG6000 wurden nun die Proteine während einer 10-minütigen Inkubation auf dem Rotator gefällt und 20min bei 14.000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Proteinpellet in 10ml PBS mit Hilfe eines Glasstabs gelöst und 12% PEG6000 zugegeben. Wiederum wurde 10min auf dem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert, 20min bei 14.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das auf diese Weise gereinigte Proteinpellet wurde in 1,2ml PBS mit Hilfe eines Glasstabs gelöst. In der Proteinlösung verbliebenes PEG wurde durch Dialyse entfernt. Dazu wurden die Proben in Visking-Dialyseschläuche (Typ 27/32, Ausschlussgröße 14kDa) gefüllt, die an beiden Enden zugeklammert wurden. Die Dialyse erfolgte bei 4°C zunächst über Nacht gegen 0,1% NaCl und anschließend 4h gegen PBS. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung bei 280nm am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

### 3.9.3 IgY-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die IgY-Präparationen mit den höchsten Neutralisierungstitern (siehe 3.10.2) wurden vereinigt und chromatographisch über eine IgY-spezifische Säule (HiTrap IgY Purification HP, GE Healthcare) in 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemäß den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei erfolgten die erforderlichen Wasch-, Bindungs-, Elutions- und Reinigungsschritte automatisch durch Programmierung des ÄKTAexplorers<sup>TM</sup>. Es wurden 5ml-Fraktionen gesammelt, die zwei höchstkonzentrierten Fraktionen vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE durch Vergleich der IgY vor und nach der Gelfiltration überprüft. Dafür wurden 10µg der Proben mit einem 5x Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und bei 95°C 5min aufgekocht. Die Proteine wurden auf ein 8-16%iges Gradientengel (Precise<sup>TM</sup> Protein Gel, Thermo Scientific) aufgetragen und zunächst ca. 5min bei 80V im Sammelgel und dann ca. 50min bei 140V im Trenngel aufgetrennt. Die Färbung des Gels erfolgte durch einstündige Inkubation in Coomassie-Lösung (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific). Um

überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurde das Gel anschließend in bidestilliertem Wasser auf dem Schüttler 3h bei Raumtemperatur gewaschen. Dabei wurde das Wasser einmal stündlich gewechselt.

Elutionspuffer:

20mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

Bindepuffer:

20mM Natriumphosphatpuffer, 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,5

Reinigungspuffer:

20mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 30% Isopropanol

HEPES-Laufpuffer:

121g Tris, 238g HEPES, 10g SDS, ad 1l ddH<sub>2</sub>O

### **3.9.4 Aufkonzentrierung der aufgereinigten IgY-Präparationen**

Zur Aufkonzentrierung der IgY-Präparationen wurden Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units mit einer Ausschlussgröße von 100kDa verwendet. Jeweils 15ml der Proben wurden dafür 20min bei 4°C und 4.000g zentrifugiert, wonach der Filterrückstand sofort abgenommen, sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert wurde.

### **3.9.5 Lyophilisierung von IgY**

Zur Optimierung der Lagerungsbedingungen wurden die IgY in 1ml Aliquots in 0,1M Trehalose (D(+)-Trehalose, Sigma-Aldrich, Seelze) lyophilisiert. Dafür wurden die Präparationen zunächst mit Trehalose versetzt, bei -20°C in Schraubdeckelröhrchen eingefroren und dann für 24h in den Gefriertrockner (FreezeDryer Heto PowerDry PL1500) gestellt. Die Gefriertrocknung mit stabilisierenden Substanzen ist für die zu lagernden Komponenten ein sehr schonender Prozess, da nicht-reduzierende Zucker, wie Trehalose, dabei die Hydrathülle der Proteine ersetzen und die

Proteinstruktur während der Dehydratisierung schützen [235]. Zudem ist die schützende Wirkung von Trehalose auf die Aktivität von lyophilisierten IgY bei mehrwöchiger Lagerung bei 37°C gezeigt worden [236]. Die lyophilisierten IgY wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch wieder in 1ml bidestilliertem Wasser gelöst.

### **3.10 Charakterisierung von Antikörpern**

Die Charakterisierung von Antikörpern erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Assay, Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test, Western Blot, verschiedener ELISA-Formate und mittels eines Immunscreenings gegen OPV-Expressionsbibliotheken.

#### **3.10.1 Immunfluoreszenz-Assay (IFA)**

Die Bestimmung des Titers der IgY-Präparationen erfolgte durch einen indirekten Immunfluoreszenz-Assay auf mit infizierten Hep2-Zellen beschichteten Objektträgern (Diagnostika, 12 Kammern, Thermo Scientific). Dafür wurden zunächst jeweils  $3 \times 10^6$  Hep2 Zellen mit *Calpox Virus*, *Vaccinia Virus Western Reserve* (VV WR) oder *Vaccinia Virus Lister-Elstree* (VV L-E) mit einer MOI von 1,5 in einem 15ml Falconröhrchen versetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zellaliquots ohne Viruszugabe dienten als Negativkontrolle. Nach 1h wurden die Zellen 5min bei 200g zentrifugiert, das Pellet im Zellkulturmedium resuspendiert und wiederum zentrifugiert, um ungebundene Viruspartikel zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 15ml Zellkulturmedium aufgenommen und jeweils 30µl ( $8 \times 10^4$  Zellen) pro Kavität auf den Objektträgern ausgesät. Nach einer Inkubation von 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Überstand abgenommen und die Objektträger nach Trocknung 1h in Aceton bei Raumtemperatur fixiert. Die Objektträger wurden beschriftet und bei -20°C gelagert.

Die zu testenden IgY-Präparationen wurden in einer 96-Well Platte in IFA-Puffer ab 1:2.000 in Verdünnungsstufen von 1:5 verdünnt. Die Auftragung der IgY auf die

Objektträger erfolgte durch Pipettieren von jeweils 20µl jeder Verdünnungsstufe. Als Positivkontrolle diente eine bereits vorhandene, *Orthopockenvirus*-spezifische IgY-Präparation (Zhang#25, 1:2.000) [237]. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in einer Feuchtkammer wurden die Objektträger 2x 5min in PBS gewaschen. Zur Detektion gebundener IgY wurde ein FITC-markierter Anti-IgY-Antikörper 1:80 verdünnt eingesetzt und zur Gegenfärbung nicht-infizierter Zellen zusammen mit Evans Blue (1:60) zugegeben. Nach der Inkubation von 1h bei 37°C in einer Feuchtkammer wurden die Objektträger wiederum mit PBS gewaschen und mit Einbettmedium und Deckgläschen versehen. Die Analyse erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40cFL, ZEISS) oder unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany).

IFA-Puffer:

2% BSA

0,2% NaN<sub>3</sub>, in PBS, sterilfiltriert

Evans Blue:

0,1g Evans Blue in 100ml PBS, sterilfiltriert

FITC-conjugated donkey anti-chicken IgY (IgG) (H+L), Dianova GmbH, Hamburg

### 3.10.2 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT<sub>50</sub>)

Zuerst wurden jeweils  $8 \times 10^4$  Vero-Zellen pro Well in einer 48-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Plasmaproben wurden zunächst 1:5 in PBS verdünnt und 45min bei 65°C im Wasserbad inaktiviert. Die Proben (Serum, Plasma oder IgY-Präparationen) wurden in einer 96-Well-Platte in Medium vorverdünnt und in zweifachen seriellen Verdünnungsstufen mit demselben Volumen einer vorgetesteten Virusverdünnung vermischt, welche in der Negativkontrolle ohne Antikörper ca. 20 infektiöse Partikel pro Well ergab. Je nach Spezifität der zu testenden Antikörper wurde ortholog der jeweilige Virusstock (*Calpox Virus*, *Vaccinia Virus Western Reserve* oder *Vaccinia Virus Lister-Elstree*) verwendet. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium, das mit der jeweiligen Virusverdünnung

gemischt wurde, und als Positivkontrolle diente eine bereits vorhandene, OPV-spezifische IgY-Präparation (Zhang#25) [237]. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden je 100µl im Doppelansatz auf die ausgesäten Zellen gegeben, zu denen vorher 100µl frisches Zellkulturmedium hinzugefügt wurde, und für weitere 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde mit je 200µl 1,6% CMC überschichtet und vier Tage lang unter denselben Bedingungen inkubiert. Für die Auswertung wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen mit je 1ml 3,7% Formaldehyd pro Well 30min bei Raumtemperatur fixiert und die Viren inaktiviert. Schließlich wurden die Zellen mit 0,5ml Naphtol Blue Black 20min gefärbt und einmal mit Leitungswasser gewaschen. Die Plaques pro Well wurden gezählt und 50% Plaque-Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet.

### 3.10.3 Western Blot mit IgY

Zum Spezifitätsnachweis der aufgereinigten IgY wurden die Präparationen im Western Blot überprüft. Dafür wurden 10µg von RIPA-Lysaten infizierter CEF-Zellen (*Calpox Virus* bzw. *Vaccinia Virus Western Reserve*) und nicht infizierter CEF-Zellen mit 5x Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und bei 95°C 5min aufgeköcht. Anschließend wurden sie auf ein 8-16%iges Gradientengel (Precise™ Protein Gel, Thermo Scientific) aufgetragen und zunächst ca. 5min bei 80V im Sammelgel und dann ca. 50min bei 140V im Trenngel aufgetrennt. Um das SDS zu entfernen, wurde das Gel 15min in bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend im Transferpuffer 15min äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde 15min in Methanol vorbehandelt, um eine Bindung der Proteine an die Membran zu gewährleisten. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere in den Fast Semi-Dry Blotter platziert. Der Proteintransfer erfolgte 20min bei 25V.

Die Übertragung wurde durch eine reversible Färbung mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde die Membran 1min in der Färbelösung inkubiert und überschüssige Farbe unter Leitungswasser wieder entfernt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen und bewerten zu können. Nach anschließender vollständiger Entfernung des



Ponceau S durch weiteres Waschen wurde die Membran 1h in Blockpuffer inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für 5min wurde die Membran mit dem jeweils zu testenden Primär-Antikörper in einer Konzentration von 4ng/μl über Nacht bei 4°C inkubiert. Den unspezifischen IgY wurde als Kontrolle ein Anti-β-Actin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 zugegeben. Nach Waschen der Membran wurde der entsprechende Sekundär-Antikörper mit der Membran 1h inkubiert (Anti-IgY-HRP 1:10.000, Anti-human IgG-HRP 1:4.000, Anti-rabbit IgG-HRP 1:2.000). Der Nachweis der Bindung des Sekundär-Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit dem Pierce ECL Western Blotting Substrate für 5min und Belichtung (1s) eines Röntgenfilms, der abschließend entwickelt wurde.

Gelkammer MiniProtean™ III System, BioRad

Lane Marker Sample Buffers, Thermo Scientific

PagerRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10x), ThermoScientific

Whatman Gel Blotting Papier, GE Healthcare

Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Scientific

Ponceau S, Sigma-Aldrich, Seelze

β-Actin Rabbit mAb, Cell Signaling Technology

Anti-rabbit-IgG, HRP-linked Ab, Cell Signaling Technology

Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific

Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminescence film, GE Healthcare

HEPES-Laufpuffer:

121g Tris, 238g HEPES, 10g SDS, ad 1l ddH<sub>2</sub>O

Blockpuffer:

5g Milchpulver

1ml Tween

100ml PBS

Waschpuffer:

1ml Tween

100ml PBS

## 3.10.4 ELISA

### 3.10.4.1 Untersuchung von Seren und Plasma mit Virus-Lysat

Für den Nachweis von OPV-spezifischen Antikörpern in Tierseren wurden zunächst die Fänger-Antigene hergestellt. Dazu wurden Virus-infizierte Hep2-Zellen (siehe Kapitel 3.7 Virusanzucht) mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die Suspension 5min bei 200g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml RIPA-Puffer (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers aufgenommen. Nach dreimaliger Ultraschallbehandlung in einem mittels Eis kühl gehaltenen Wasserbad für 30s wurde die Suspension 30min auf Eis stehen gelassen und anschließend 15min bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Wasserbad bei 60°C 1,5h inaktiviert und die Inaktivierung im Plaque-Test überprüft. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop® ND-1000. Die RIPA-Lysate wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Untersuchung der Affenseren wurde ein *Calpox Virus*-RIPA-Lysat und für die Mausseren ein *Vaccinia Virus Western Reserve*-RIPA-Lysat verwendet, als Negativkontrolle diente ein *Bat/Adenovirus 2*-RIPA-Lysat (Bt AdV-2, ). 96-Well-Platten (Maxisorp) wurden mit 400ng Protein pro 100µl und Kavität beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Waschen der beschichteten Platten mit Waschpuffer am ELISA-Washer (4x jeweils 300µl pro Kavität) wurden die Platten durch 200µl Blockpuffer pro Kavität 1h bei Raumtemperatur blockiert. Die Tierseren wurden ab 1:100 seriell 1:2 in Antikörperpuffer verdünnt und nach erneutem Waschen der blockierten Platten in Doppelansätzen in die Kavitäten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C wurden die Platten gewaschen und mit 100µl des entsprechenden Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörpers (goat anti-mouse-IgG/-IgM 1:5.000 bzw. goat anti-human-IgG 1:10.000) pro Kavität versehen. Die Inkubation erfolgte wieder 1h bei 37°C. Anschließend wurden die Platten gewaschen und das Substrat gemäß den Herstellerangaben zugegeben. Dafür wurde je eine TMB-Tablette (Sigma-Aldrich, Seelze) pro Platte in 1ml DMSO gelöst und anschließend 9ml Phosphat-Citrat-Puffer zugegeben. Nach Zugabe von 2µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden 100µl des Gemisches pro Kavität

verteilt. Nach 30min Inkubation in einer dunklen Kammer wurde die enzymatische Reaktion mit 100µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Kavität gestoppt. Die optische Dichte wurde am ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

HRP-goat anti-mouse IgM, µ chain specific, Dianova GmbH, Hamburg

HRP-goat anti-mouse IgM, Fc<sub>γ</sub> Fragment specific, Dianova GmbH, Hamburg

HRP-goat anti-human IgG, gamma chain specific, Invitrogen™

### 3.10.4.2 Untersuchung von Plasma und IgY mit rekombinanten Proteinen

Zur weiteren Charakterisierung der Plasmaproben bzw. der aufgereinigten und konzentrierten IgY-Präparationen wurden die Bindung an verschiedene, rekombinant hergestellte, membranständige Orthopockenproteine mittels ELISA nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinstocks (A27, L1, B5, A33, D8 und H3) in Coatingpuffer verdünnt, 200ng pro 100µl und Kavität auf 96-Well-Platten verteilt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die beschichteten Platten wurden mit Waschpuffer am ELISA-Washer (4x jeweils 300µl pro Kavität) gewaschen und durch 200µl Blockpuffer pro Kavität 1h bei Raumtemperatur blockiert. Die Plasmaproben wurden 1:100 bzw. 1:1.000 verdünnt. Die IgY wurden ab einer Vorverdünnung von 1:500 seriell 1:2 verdünnt. Je 100µl der Antikörperverdünnungen wurden nach erneutem Waschen der Platten aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei Kapitel 3.10.4.1 beschrieben. Die POD-markierten Sekundär-Antikörper (rabbit anti-chicken IgY, H+L bzw. goat anti-human IgG) wurden in einer Verdünnung von 1:5.000 eingesetzt. Für die IgY-Präparationen wurden die Dissoziationskonstanten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism über eine nicht-lineare Regressionsanalyse berechnet.

rabbit anti-chicken IgY-HRP, H+L  
A27, L1, B5, A33

Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

VV WR, aus Baculovirus,

BEI Resources, Manassas, Virginia, USA

D8, H3

VV WR, aus E.coli,

GenExpress, Berlin

Coatingpuffer:

8,4g  $\text{NaHCO}_3$  in 800ml ddH<sub>2</sub>O, pH mit 1M NaOH auf 9,6 einstellen  
ad 1l ddH<sub>2</sub>O

Waschpuffer (TBS-T):

100ml 10x Trispuffer pH 7,5  
900ml ddH<sub>2</sub>O  
1ml Tween-20

10x Trispuffer:

121g Tris Base  
90g NaCl, pH auf 7,5 mit konzentrierter HCl einstellen  
ad 1l ddH<sub>2</sub>O

1x Trispuffer (TBS):

100ml 10x TBS  
900ml ddH<sub>2</sub>O

Blockpuffer:

3g BSA  
ad 100ml TBS-T

Antikörperpuffer:

0,25g BSA  
ad 100ml TBS-T

Citronensäure, 0,1M:

2,1g Citronensäure Monohydrat  
ad 100ml ddH<sub>2</sub>O

Phosphatpuffer, 0,2M:

2,76g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
ad 100ml ddH<sub>2</sub>O

Phosphat-Citrat-Puffer:

24,3ml 0,1M Citronensäure  
25,7ml 0,2M Phosphatpuffer

ELISA-Washer: HydroFlex™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz, Crailsheim

ELISA-Reader und Software: Infinite® 200, Magellan™, Tecan Group Ltd.,

Männedorf, Schweiz, Crailsheim

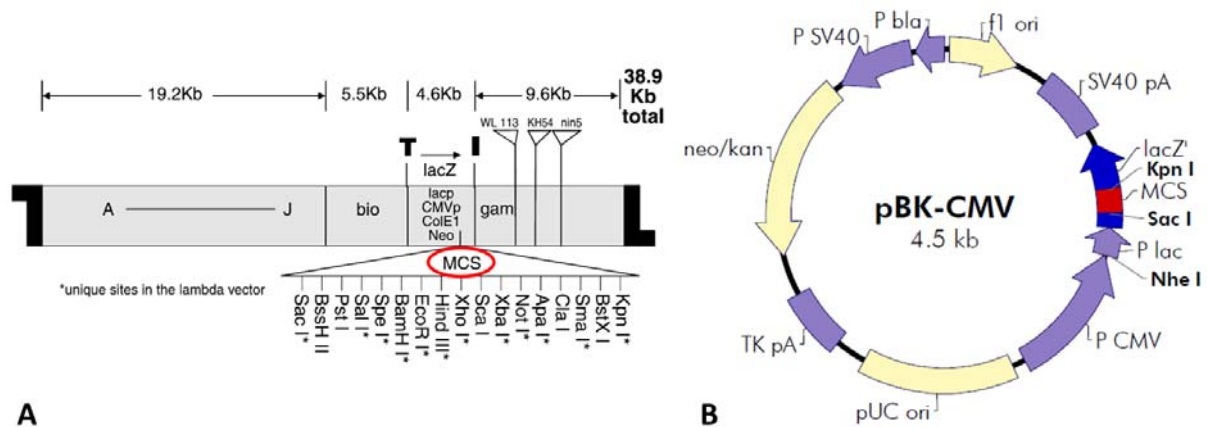
### 3.10.5 Immunscreening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken

Für eine weitere Bestimmung der Spezifitäten der IgY-Präparationen wurden die IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken gescreent. Dafür wurden zwei bereits vorhandene Expressionsbibliotheken verwendet, die durch Klonierung von 0,2-3kb großen Fragmenten eines *Kuhpockenvirus*-Stamms (CPXV GuWi, isoliert aus einem Kuhpockenvirus-infizierten Elefanten [72] bzw. von 3-12kb großen Fragmenten eines *Vaccinia Virus* (NYCBH; VR-1536™) in einen  $\lambda$ -basierten Vektor (ZAP Express) generiert wurden [238]. Das Screening der Antikörperpräparationen erfolgte mit Hilfe des *picoBlue*™ Immunoscreening Kits. Im Prinzip wurden zunächst 200 $\mu$ l einer bis zu einer OD von 0,5 verdünnten Flüssigkultur XL1-Blue MRF' Bakterienzellen mit  $7 \times 10^3$  PFU rekombinanten Phagen infiziert und 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Bakteriengemisch in 3ml 50°C heißen Top Agar gegeben, gemischt und unmittelbar auf einer 100mm-Agar-Platte verteilt. Nach Erkalten des Top Agars wurden die Platten ca. 4h bei 42°C inkubiert, bis die Plaques im Bakterienrasen deutlich sichtbar wurden. Durch die Replikation der Phagen in den Bakterien wurden die in den Phagengenomen enthaltenen Pocken-DNA-Segmente exprimiert und durch die Phagen-induzierte Lyse der Bakterien nun auf der Platte exponiert. Die Plaques wurden auf eine in 10mM IPTG getränkte Nitrocellulose-Membran innerhalb von 3-4h bei 37°C transferiert. Die Membranen wurden 5x 15min in PBS-T (PBS, 0,05% Tween 20) gewaschen und dann mit Blockpuffer (PBS, 1% BSA) 1h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die zu testenden Antikörperpräparationen wurden dann 1:1.000 in Blockpuffer verdünnt mit den Membranen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Membran erfolgte der Nachweis von spezifischen Bindungen der Antikörper an exprimierte Pockenvirusproteine durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers (Anti-IgY-HRP), der 1:4.000 verdünnt 1h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert wurde. Die enzymatisch katalysierte Umsetzung des präzipitierenden Substrats AEC wurde im Dunkeln bis zur deutlichen Farbentwicklung durchgeführt und die Reaktion durch Waschen der Membran mit Leitungswasser gestoppt.

Mit Hilfe der Membranen wurden die immunpositiven Plaques auf den Agarplatten identifiziert, unter sterilen Bedingungen gepickt und in 500 $\mu$ l SM-Puffer

aufgenommen. Auf Grund der hohen Dichte an Plaques auf den Agarplatten musste zur Vereinzelung der gepickten Phagen ein Rescreening durchgeführt werden. Dabei wurde wie oben beschrieben verfahren, nur dass nun mehrere Verdünnungsstufen der gepickten Plaque-Suspensionen für die erneute Infektion von Bakterien eingesetzt wurden (1:10, 1:100, 1:1.000).

Nach erneutem Picken von immunpositiven Plaques, die nun aber als Einzelklone auf der Platte vorlagen, wurde das im pBK-CMV Phagemid-Vektor enthaltene OPV-Fragment unter Zuhilfenahme des ZAP Express<sup>®</sup> Predigested Vector Kits aus dem Phagen genom ausgeschnitten. Dies ermöglicht eine Fragmentcharakterisierung in einem Plasmidsystem (Abbildung 6). Dabei wurde im Wesentlichen nach dem „Single-clone excisions“-Protokoll vorgegangen: 200µl einer bis zu einer OD von 1 gewachsenen XL-1-Blue MRF'-Bakteriensuspension wurden mit 250µl der immunpositiven Phagenlösung ( $< 1 \times 10^5$  PFU) und mit 1µl ExAssist Helfer-Phagen ( $< 1 \times 10^6$  PFU) infiziert und nach dem Excisions-Protokoll weiter bearbeitet. Der Excisions-Schritt wurde 3h bei 37°C in LB-Medium durchgeführt und 20min lang auf 70°C erhitzt, um die Zellen und Phagen zu lysieren. Nach 15min Zentrifugation bei 1.000g wurde der Überstand mit den ausgeschnittenen pBK-CMV Phagemiden in ein 15ml Falkonröhrchen überführt und zur Amplifikation in XL0LR-Bakterien transformiert. Dazu wurden je 200µl von bis zu einer OD von 1 gewachsenen XL0LR-Bakterien mit zwei verschiedenen Verdünnungsstufen der Phagemidlösungen (1:10 und 1:100) vermischt und 15min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 300µl NZY-Medium und 45min Inkubation bei 37°C zur Kanamycinresistenzgen-Expression wurden jeweils 200µl des Gemisches auf LB-Kanamycin (50µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Blau-weiß-Selektion erlaubte die Unterscheidung zwischen Bakterienzellen mit und ohne Fremd-DNA im Vektor.



**Abbildung 6: ZAP-Express® Vektor-System.** Schematische Darstellung des lambda ZAP Express® Vektors (A) und des ausgeschnittenen Phagemids pBK-CMV (B). (Referenz: ZAP Express® Predigested Vector Kit and ZAP Express® Predigested Gigapack Cloning Kit - Instruction Manual [239615]. 2008, Agilent Technologies, Inc.)

Einige weiße Kolonien wurden gepickt und in 2ml LB-Kanamycin-Medium wiederum über Nacht kultiviert. Die Plasmide wurden mit dem NucleoSpin® QuickPure Kit isoliert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Da die in den Plasmiden enthaltenen DNA-Sequenzen bis zu 12kb lang sein können, wurde für die Amplifikation des Fragments das Expand Long Range dNTPack PCR Kits verwendet. Für die PCR wurden zwei Primer verwendet, die an Vektorsequenzen zu beiden Seiten des Inserts (T3 und T7 Promotorregion) hybridisieren. Die Reaktionen wurden in einem Mastercycler® ep Gradient durchgeführt.

Primer:

T7: GTAATACGACTCACTATAGGGCG

T3: ATTAACCCTCACTAAAGGGA

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25µl angesetzt:

5x Puffer+MgCl <sub>2</sub>	5µl
DMSO 100%	0,75µl
dNTPs (10mM)	1,25µl
Primer T7/T3 (10µM)	1,5µl
Polymerase	0,35µl
Template	500ng
Wasser	ad 25µl

## Reaktionsbedingungen:

	92°C	120''
10x	{	92°C 10''
		57°C 30''
		68°C 600''
20x	{	92°C 10''
		57°C 30''
		68°C 600''+20''/Zyklus
	68°C	420''
	4°C	Stopp

Ein Aliquot des PCR-Ansatzes wurde auf einem Agarosegel wie in 3.5.6.1 beschrieben aufgetrennt und die Größe des Amplikons bestimmt. Der Rest des Ansatzes wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und anschließend nach der Kettenabbruchmethode von Sanger sequenziert [239]. Die Reaktionen wurden mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit für jeden Primer separat angesetzt und mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer analysiert.

## Sequenzierreaktion:

T7 oder T3 Primer	0,5µl
BigDye	1µl
5x Puffer	1,5µl
DNA	300ng
Wasser	ad 10µl

## Reaktionsbedingungen:

45x	{	96°C	2'
		96°C	10''
		60°C	5''
		60°C	4'

Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software SeqMan Pro (DNASTAR Lasergene 7.2.1, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) und mit dem Programm BLASTN (megablast) analysiert. Um die Virusproteinsequenzen zu



identifizieren, für die die DNA-Fragmente codieren, wurde für die die *Vaccinia Virus*-DNA enthaltende Expressionsbibliothek mit der Referenzsequenz von *Vaccinia Virus Western Reserve* (GenBank Acc.No.: AY243312) und für die die *Kuhpockenvirus*-DNA enthaltende Expressionsbibliothek mit der Referenzsequenz des *Kuhpockenvirus Brighton Red* (GenBank acc.no.: AF482758) abgeglichen.

## 4 Ergebnisse

Dieses Kapitel beschreibt im ersten Teil die Entwicklung eines Therapieansatzes mit OPV-spezifischen IgY gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen. Zunächst sind die Ergebnisse der Generierung OPV-spezifischer IgY, ihrer *in vitro*-Charakterisierung und schließlich der Untersuchung ihrer Wirksamkeit in einem Mausmodell dargestellt. Zur Produktion OPV-spezifischer IgY wurden Legehennen immunisiert und die IgY aus den Eidottern isoliert. Die Charakterisierung der gewonnenen IgY erfolgte über verschiedene immunologische Tests, wie PRNT<sub>50</sub>, IFA, ELISA, Western Blot und Immunoscreening gegen OPV-Expressionsbibliotheken. Um einen möglichen Einsatz von IgY als Therapeutikum gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen zu überprüfen, wurden die IgY in einem Maus-Infektionsmodell getestet. Die Belastungsinfektion der Tiere erfolgte auf intranasalem Weg, was den physiologischen Übertragungsweg des *Variola Virus* widerspiegelt. Um das Risiko von Nebenwirkungen zu minimieren und die Antikörper möglichst nahe am ersten Infektionsgeschehen zu applizieren, sind sie ebenfalls über die intranasale Route verabreicht worden. Zunächst wurden mehrfache Behandlungen gegen eine Infektionsdosis im Bereich der LD<sub>50</sub> und gegen eine hochletale Infektionsdosis getestet. Auf Grund des Behandlungserfolgs gegen eine Infektion mit der LD<sub>50</sub> wurde anschließend die Wirkung einer einzelnen IgY-Applikation gegen die gleiche Infektionsdosis überprüft.

Im letzten Teil des Kapitels wird eine Immunisierungsstudie mit der noch nicht zugelassenen Pockenvakzine IMVAMUNE in einem Affenmodell vorgestellt. Bei dem Impfstoff handelt es sich um eine noch in der Entwicklung befindlichen *Variola Virus*-Vakzine der dritten Generation, die als sicherer Nachfolgeimpfstoff der in der Impfkampagne eingesetzten *Vaccinia Viren* gilt [1]. Momentan befindet sich IMVAMUNE noch in der zweiten Phase klinischer Studien. Das Immunisierungsexperiment erfolgte im kürzlich etablierten Weißbüschelaffen/*Calpox Virus*-Modell [231]. Die Tiere wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen intramuskulär immunisiert und nach 4 bzw. 10 Wochen mit einer 10xMID<sub>50</sub> *Calpox Virus* intranasal infiziert.

## 4.1 Generierung und Charakterisierung von IgY

Zur Generierung von OPV-spezifischen IgY wurden zunächst Legehennen mit aktivem oder inaktiviertem Virus durch Injektion in den Brustmuskel immunisiert. Um eine Immunantwort der Tiere auf Zellkulturbestandteile zu reduzieren, wurden die verwendeten *Orthopockenviren* (*Calpox Virus*, *Vaccinia Virus Lister-Elstree* und *Vaccinia Virus Western Reserve*) auf hühnerembryonalen Fibroblasten angezogen. Die Charakterisierung der aus den Eiern mittels PEG-Präzipitation isolierten IgY erfolgte über die Bestimmung der Bindungs- und Neutralisationstiter mittels IFA und PRNT<sub>50</sub>. Nach der chromatographischen Aufreinigung über eine IgY-spezifische Säule wurde die Spezifität der IgY in einem Western Blot gegen komplette Viruspartikel und im ELISA gegen ausgewählte, rekombinante Oberflächenvirus-Proteine nachgewiesen. Ein Immunoscreening gegen OPV-Expressionsbibliotheken von Lambdaphagen sollte Aufschluss darüber geben, ob in den IgY-Präparationen Reaktivität gegen weitere OPV-Proteine vorhanden ist.

### 4.1.1 Immunisierung von Legehennen mit infektiösen und inaktivierten OPV

In einem ersten Immunisierungsexperiment wurden acht Legehennen mit aktiven Viruspartikeln ( $10^6$  PFU/Tier) alle 3-8 Wochen über einen Zeitraum von 7,5 Monaten immunisiert. Unabhängig vom zur Immunisierung verwendeten Virusstamm entwickelten 3 der 8 Tiere infolge der ersten Immunisierung bzw. Booster-Immunisierung an der Injektionsstelle Granulome von 0,5-1cm Größe. Bei 1 dieser Tiere und 2 weiteren Hennen war nach der ersten Immunisierung bzw. nach der zweiten Booster-Immunisierung eine mäßige bis starke Schwellung des Brustmuskels sichtbar. Sowohl die Granulome als auch die Schwellungen bildeten sich bis zur jeweils nächsten Booster-Immunisierung zurück. Über den gesamten Versuchszeitraum waren bei keinem Tier offensichtliche Anzeichen einer Infektion, etwa in Form von Läsionen oder Verhaltensauffälligkeiten, zu beobachten.

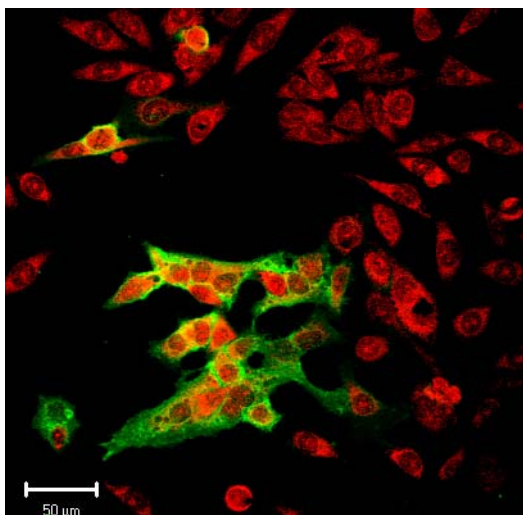
Abhängig vom Typ des Antigens und seiner Verträglichkeit kann die Legeleistung von Hennen beeinträchtigt werden [225]. In diesem Experiment ließ die Legeleistung der Tiere zu keinem Zeitpunkt auf eine Beeinträchtigung durch die Immunisierung schließen. Bei dem zweiten Immunisierungsexperiment wurden je 2 Hennen über 4 Monate mit aktivem bzw. inaktiviertem *Calpox Virus* und mit inaktiviertem *Vaccinia Virus Western Reserve* immunisiert ( $10^6$  PFU aktives Virus,  $10^7$  PFU inaktiviertes Virus). Die Booster-Injektionen erfolgten alle 3-5 Wochen. Es konnten keinerlei Beeinträchtigungen infolge der Injektionen beobachtet werden.

#### 4.1.2 Isolierung von IgY aus Eidottern

Die Isolierung der Antikörper aus den Eidottern erfolgte durch dreimalige Fällung mit PEG in aufsteigenden Konzentrationen [234]. Im Durchschnitt betrug die Proteinmenge etwa 45mg pro Eidotter. Nur bei einem Tier (Huhn 8) konnte aus allen präparierten Eidottern mit durchschnittlich 4mg Protein nur knapp 9% der Proteinmenge isoliert werden, die aus den Dottern aller anderen Tiere gewonnen werden konnte.

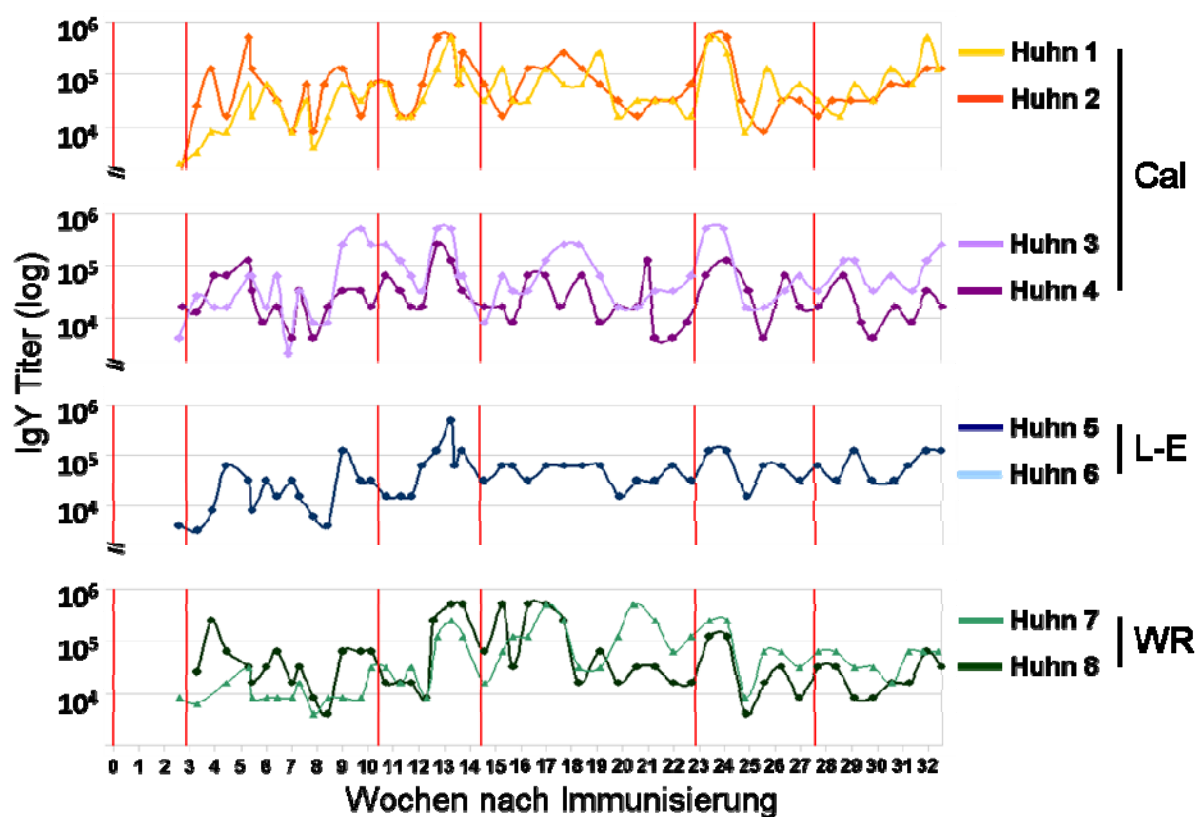
#### 4.1.3 Bindungstiterverläufe

Um den Verlauf der Immunantwort gegen die OPV zu verfolgen, wurden von jedem immunisierten Tier die IgY aus 1-3 Eiern pro Woche mittels PEG-Präzipitation isoliert und die Antikörpersuspensionen mittels IFA untersucht. Dabei wurden die Titer gegen das jeweilige Virus ermittelt, das zur Immunisierung verwendet wurde. Auf jedem Objektträger wurde eine Positivkontrolle mit vorgetesteten OPV-spezifischen IgY und eine Negativkontrolle durch Auftragung der zu testenden IgY in 2 Kavitäten mit nicht-infizierten Hep2-Zellen mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht (Abbildung 7).



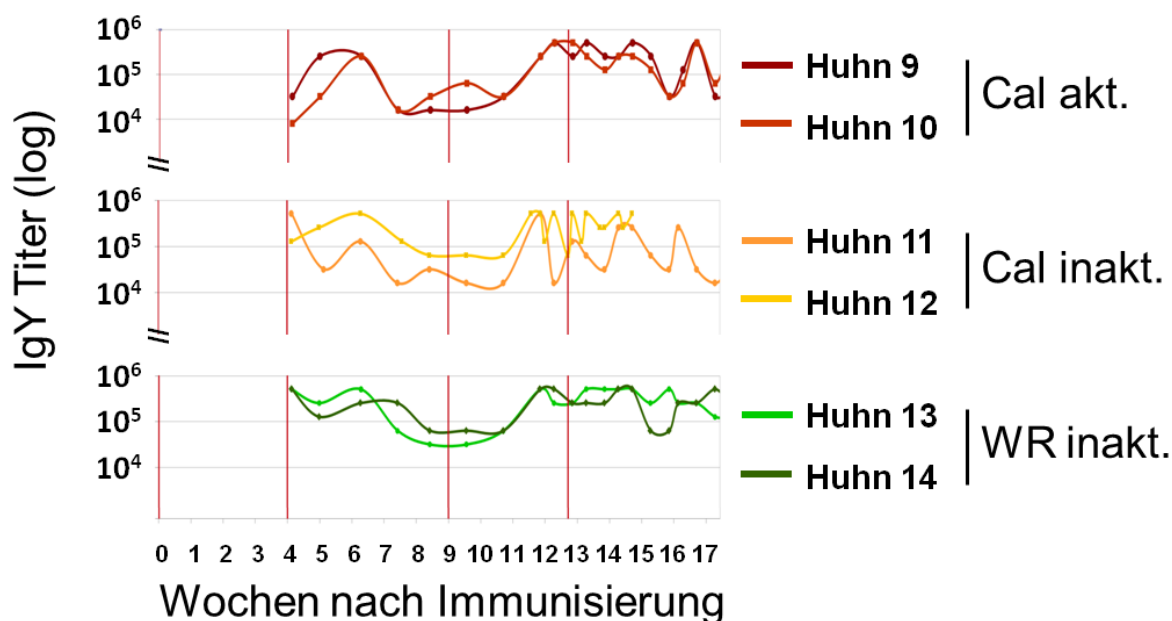
**Abbildung 7: Bestimmung des Titers von OPV-spezifischen IgY aus Eiern immunisierter Hühner.** *Calpox Virus*-infizierte Hep2-Zellen wurden mit aufsteigenden Verdünnungsstufen der autologen IgY-Präparationen inkubiert und mit einem FITC-konjugierten Anti-IgY Antikörper detektiert. Infizierte Zellen erscheinen grün, nicht-infizierte Zellen durch die Gegenfärbung mit Evans Blue rot. Die Aufnahme erfolgte unter einem konfokalen Laserscanning Mikroskop mit einer 20-fachen Vergrößerung.

Im ersten Immunisierungsexperiment konnten bei 7 von 8 Tieren ab Tag 18 nach der ersten Immunisierung bindende Antikörper in den IgY-Präparationen nachgewiesen werden. Die Titer schwankten anschließend über den ganzen Immunisierungszeitraum um 1:100.000, wobei Maxima von 1:512.000 und Minima von 1:4.000 erreicht wurden und sich die Verläufe sehr ähnelten (Abbildung 8). Nur bei Huhn 6 konnten keine OPV-spezifischen IgY nachgewiesen werden. Die in einer Serumprobe im Dot Blot nachgewiesenen OPV-spezifischen IgY zeigten jedoch, dass die Immunisierung dieses Tieres erfolgreich war (Daten nicht gezeigt). Offenbar war der Transportmechanismus des IgY vom Serum in das Eidotter gestört.



**Abbildung 8:** Titerverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem Virus immunisierter Hühner im Immunfluoreszenz-Test. Huhn 1-4 wurde mit *Calpox Virus (Cal)*, Huhn 5+6 mit *Vaccinia Virus Lister-Elstree (L-E)* und Huhn 7+8 mit *Vaccinia Virus Western Reserve (WR)* immunisiert. Die roten Balken markieren die Immunisierungs- und Boosterinjektionen.

Auch in dem zweiten Immunisierungsexperiment mit aktivem und inaktiviertem Virus konnten OPV-spezifische IgY generiert werden. Unabhängig davon, ob aktive oder inaktivierte Viruspräparationen verwendet wurden, erreichten die Titer die gleichen Werte wie im ersten Experiment (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Titerverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem oder inaktiviertem Virus immunisierter Hühner im Immunfluoreszenz-Test. Huhn 9+10 wurde mit aktivem *Calpox Virus* (Cal akt.), Huhn 11+12 mit inaktiviertem *Calpox Virus* (Cal inakt.) und Huhn 13+14 mit inaktiviertem *Vaccinia Virus Western Reserve* (WR inakt.) immunisiert. Die roten Balken markieren die Immunisierungs- und Boosterinjektionen.

#### 4.1.4 Neutralisierungstiterverläufe

Um die präparierten IgY auch auf neutralisierende Antikörper zu untersuchen, wurde ein Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test durchgeführt und im Vergleich zur Viruskontrolle der Titer berechnet, bei dem die Anzahl der Plaques um 50% reduziert war. Die beiden Immunisierungsexperimente zeigten, dass neutralisierende IgY sowohl gegen aktives als auch gegen inaktiviertes Virus ca. 3 Wochen nach der ersten Injektion gebildet wurden. Die Neutralisierungstiter aller Legehennen des ersten Immunisierungsexperiments verliefen sehr ähnlich, jedoch unabhängig von den im IFA bestimmten Verläufen der Bindungstiter. Erst nach der zweiten Booster-Injektion stiegen die Titer bei 6 von 8 Tieren kurzzeitig auf bis zu 1:4.000. Die höchsten Neutralisierungstiter von bis zu 1:4.800 wurden erst nach der dritten Immunisierung gebildet, sie fielen jedoch trotz der vierten und fünften Booster-Immunisierung wieder ab (Abbildung 10). Die längsten Zeiträume mit hochtitrigen IgY waren bei den mit *Vaccinia Virus Western Reserve* immunisierten Tieren zu beobachten.

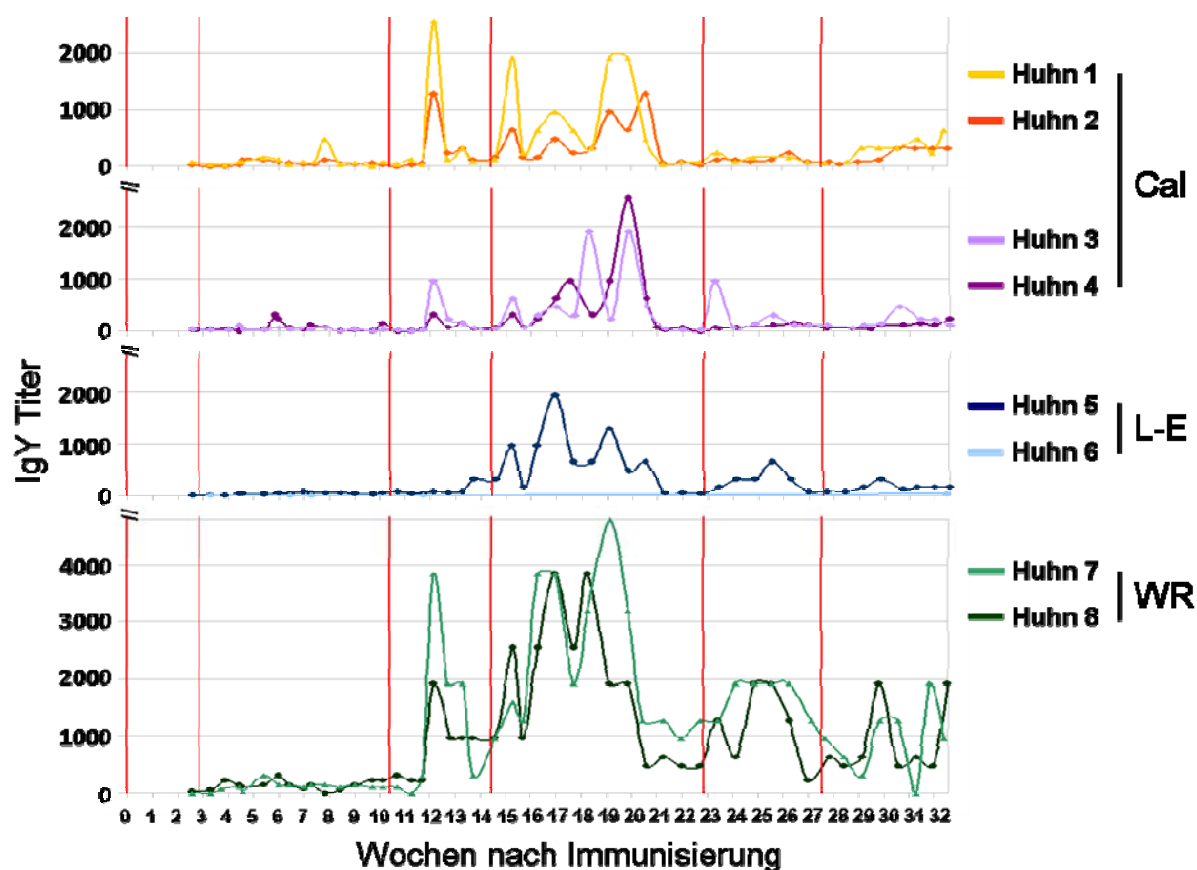
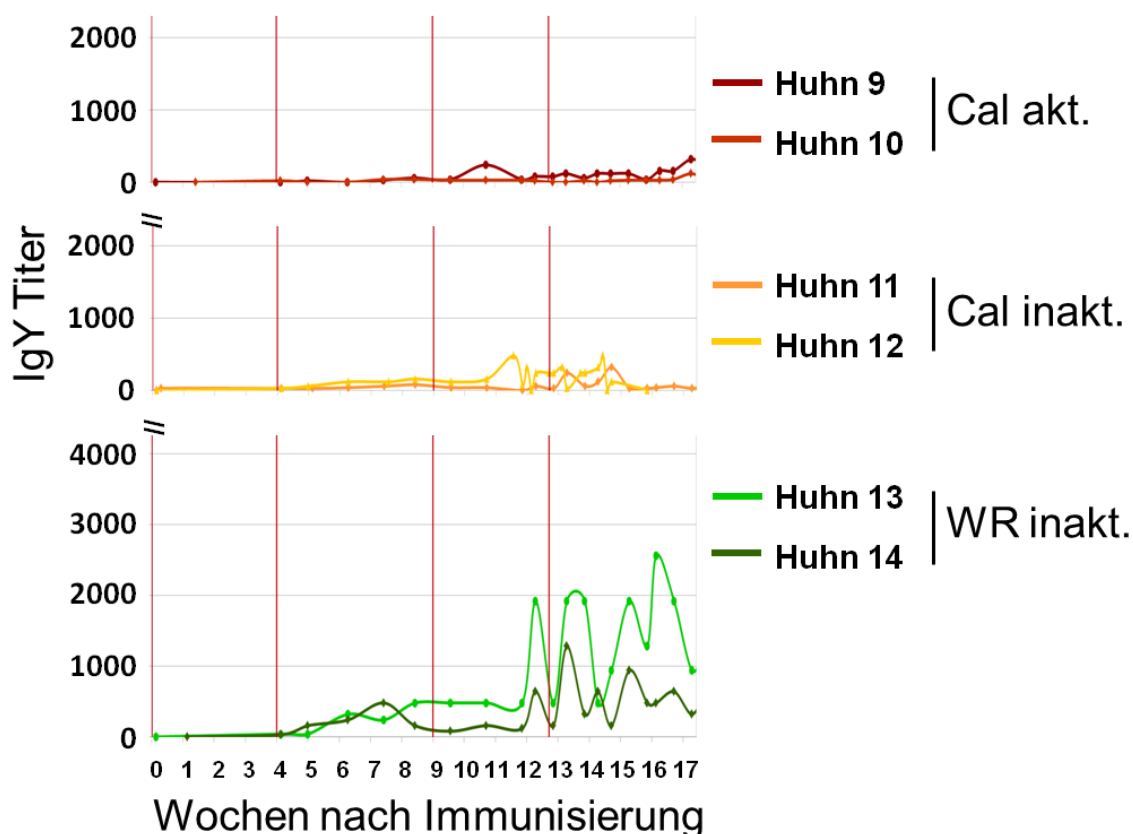


Abbildung 10: Neutralisierungstiterverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem Virus immunisierter Hühner (bestimmt mit PRNT<sub>50</sub>). Huhn 1-4 wurde mit *Calpox Virus* (Cal), Huhn 5+6 mit *Vaccinia Virus Lister-Elstree* (L-E) und Huhn 7+8 mit *Vaccinia Virus Western Reserve* (WR) immunisiert. Die roten Balken markieren die Immunisierungs- und Boosterinjektionen.

Im zweiten Immunisierungsexperiment, das nur über 17 Wochen durchgeführt wurde, wurden im Vergleich zum ersten Experiment viel geringere Neutralisierungstiter gebildet, wobei die *Calpox Virus*-immunisierten Tiere maximale Titer von nur 1:480 entwickelten. Im Verlauf war kein Unterschied zwischen der Immunisierung mit aktivem oder inaktiviertem *Calpox Virus* zu beobachten. Die Neutralisierungstiter der beiden mit inaktiviertem *Vaccinia Virus Western Reserve* immunisierten Tiere stiegen wie im ersten Experiment nach der ersten Booster-Injektion und erreichten Maxima in der 12. Woche und nach der dritten Booster-Immunsierung (Abbildung 11).

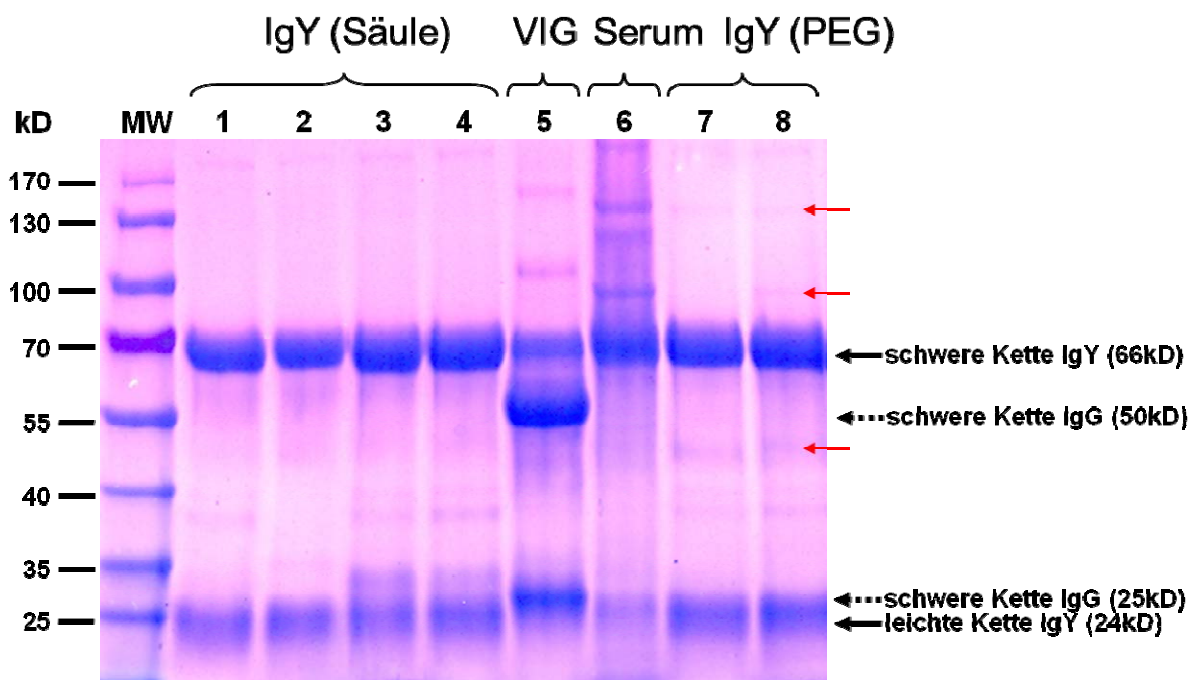




**Abbildung 11: Neutralisierungstiterverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem oder inaktiviertem Virus immunisierter Hühner (bestimmt mit PRNT<sub>50</sub>).** Huhn 9+10 wurde mit aktivem *Calpox Virus* (*Cal akt.*), Huhn 11+12 mit inaktiviertem *Calpox Virus* (*Cal inakt.*) und Huhn 13+14 mit inaktiviertem *Vaccinia Virus Western Reserve* (*WR inakt.*) immunisiert. Die roten Balken markieren die Immunisierungs- und Boosterinjektionen.

#### 4.1.5 IgY-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Nach der Bestimmung der Neutralisationstiterverläufe wurden die IgY aus den Eiern der hochtitrigen Zeiträume isoliert und mittels Affinitätschromatographie über eine IgY-spezifische Säule aufgereinigt, um noch vorhandene Dotterproteine zu entfernen. Die thiophile Adsorption der IgY an die mit 2-Mercaptopyridin-gekoppelte Sepharose beruht laut Herstellerangaben vermutlich auf einer Kombination aus Elektronenaufnahme und -abgabe des Liganden oder auf hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen. Das Ergebnis der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Nach der Gelfiltration waren 3 schwache Banden weniger auf dem Gel zu sehen (Abbildung 12).



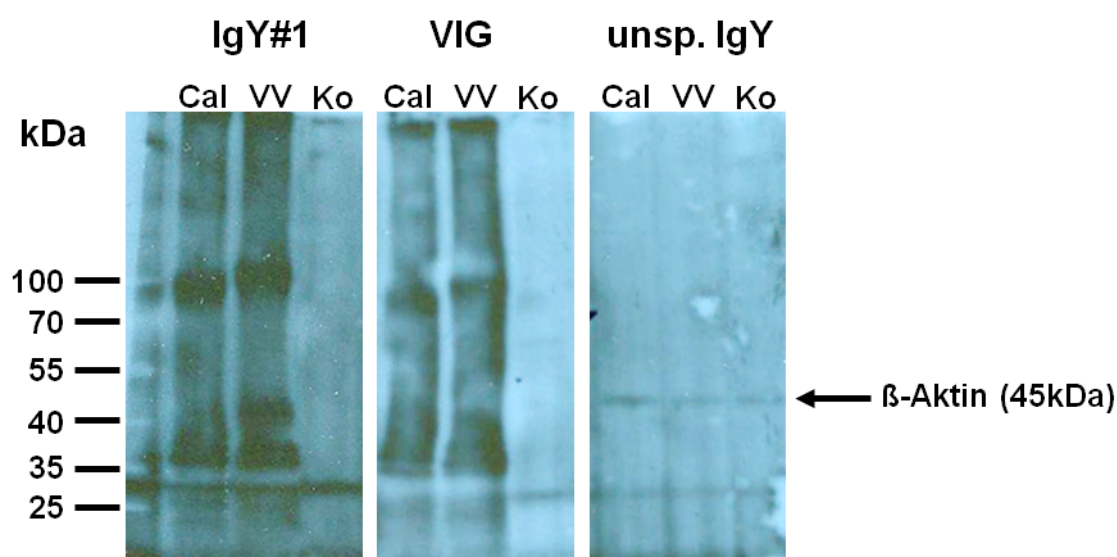
**Abbildung 12: SDS-PAGE exemplarisch von IgY-Präparationen nach Isolierung mit PEG und nach Aufreinigung über Gelfiltration im Vergleich zur Reinheit von VIG und Serumproteinen.** Es wurden jeweils 10µg Protein/Spur auf das 8-16% Gradientengel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Spur 1, prä-immun-IgY; Spur 2, IgY  $\alpha$ -VV WR inaktiviert; Spur 3, IgY  $\alpha$ -*Calpox Virus* inaktiviert; Spur 4, IgY  $\alpha$ -VV WR aktiv; Spur 5, VIG; Spur 6, Serum  $\alpha$ -VV WR aktiv, Spur 7; prä-immun-IgY, Spur 8; IgY  $\alpha$ -*Calpox Virus*. Die Dotter-IgY sind entweder nur über Fällung mit PEG (Spur 7+8) oder zusätzlich über die Affinitätsäule (Spur 1–4) aufgereinigt worden. Die schweren und leichten Ketten der IgY bzw. IgG sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die vor der Aufreinigung über die IgY-spezifische Säule vorhandenen Proteinbanden sind mit roten Pfeilen markiert.

Nach dem Aufreinigungsschritt wurden alle IgY-Präparationen der jeweils mit gleichen Viruspräparationen immunisierten Tiere vereinigt. Weiterhin charakterisiert wurden nur die 3 Präparationen, von denen die größten Mengen vorhanden waren. Im Folgenden werden die vereinigten Antikörper-Präparationen als IgY#1 ( $\alpha$ -VV WR inaktiviert), IgY#2 ( $\alpha$ -*Calpox Virus* inaktiviert) und IgY#3 ( $\alpha$ -VV WR aktiv) bezeichnet.

#### 4.1.6 Spezifitätsnachweis von IgY

Der Spezifitätsnachweis der aufgereinigten IgY-Präparationen gegen verschiedene Virusproteine wurde mittels Western Blot und ELISA durchgeführt. Für den Western Blot wurden RIPA-Lysate OPV-infizierter CEF mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Nachgewiesen wurde die Bindung verschiedener IgY-

Präparationen im Vergleich zu VIG. Abbildung 13 zeigt exemplarisch den Western Blot für IgY#1. Sowohl das VIG als auch die IgY-Präparationen haben spezifisch an die Proteine des Vaccinia Virus und des *Calpox Virus* gebunden. Bei allen Lysaten, einschließlich dem von nicht-infizierten Zellen, war eine Bande unklaren Ursprungs bei ca. 30kDa zu sehen, die entweder von allen getesteten Primär-Antikörpern (OPV-spezifische IgY, unspezifische IgY und VIG) oder vom Sekundärantikörper unspezifisch erkannt wurde. Das Fehlen sonstiger Banden im Kontrollzelllysat wies darauf hin, dass in den IgY-Präparationen kaum Wirtszell-spezifische Antikörper vorhanden waren.

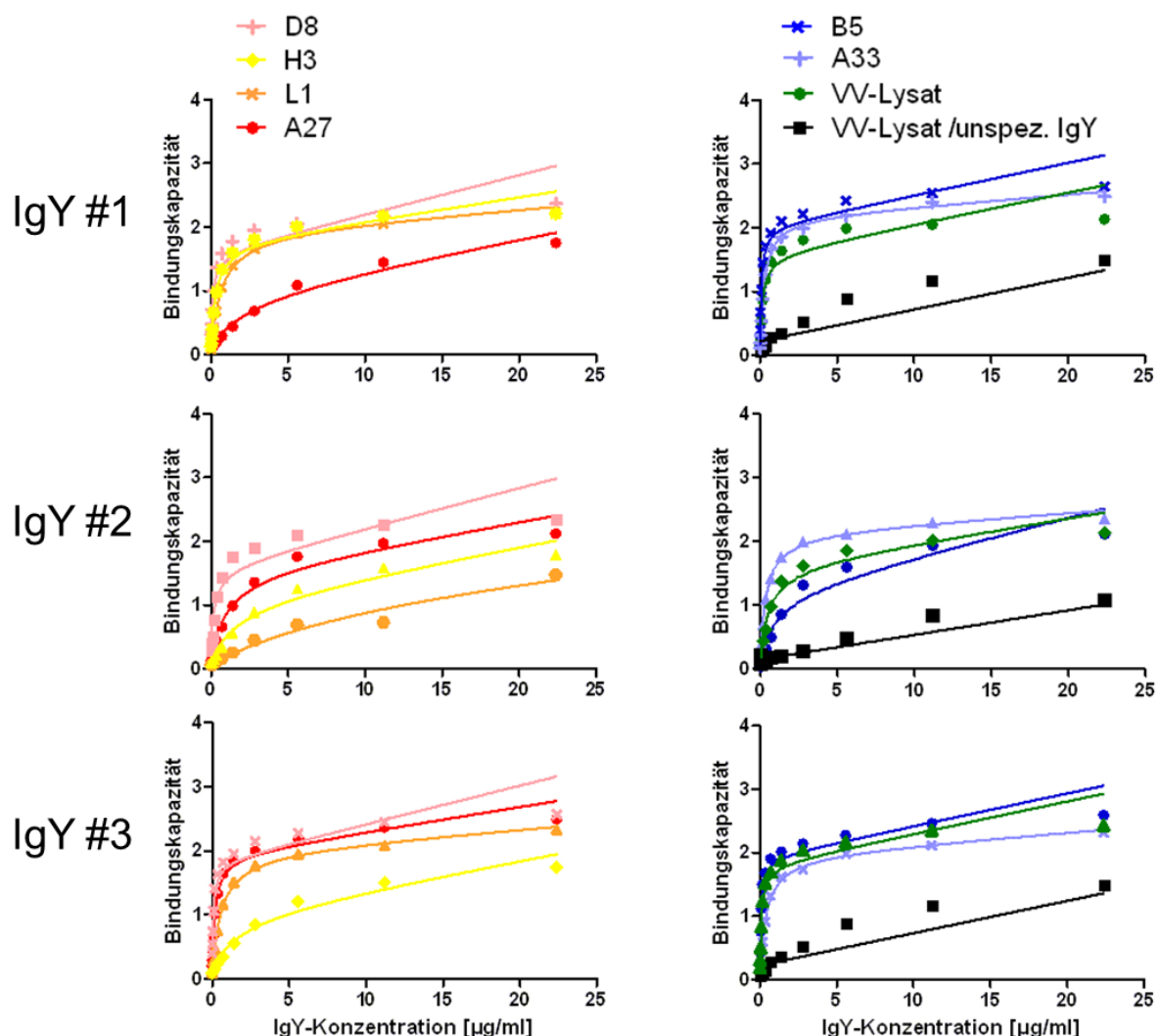


**Abbildung 13: Western Blot mit spezifischen IgY, VIG und unspezifischen IgY.** Aufgetragen sind RIPA-Lysate infizierter CEF-Zellen (Cal, *Calpox Virus* bzw. VV, *Vaccinia Virus WR*) und nicht infizierter CEF-Zellen (Ko, Kontrolle). Der Nachweis der Bindung des Primärantikörpers (exemplarisch IgY#1, VIG, unsp. IgY) erfolgte durch einen Peroxidase-markierten Anti-chicken- bzw. Anti-human-Antikörper. Als Blot-Kontrolle bei den unspezifischen IgY diente  $\beta$ -Aktin. (IgY#1,  $\alpha$ -VV WR inaktiviert; VIG, Vaccinia Immunglobulin; unsp. IgY, unspezifische IgY).

Einige der OPV-Membranproteine bieten für Antikörper zugängliche Epitope und führen zur Generierung neutralisierender bzw. protektiver Antikörper. Als neutralisierende Determinanten der inneren Membran sind A27, D8, H3, A17, A28 und L1 bekannt, während von den Proteinen der äußeren Membran B5 und A33 eine neutralisierende bzw. protektive Antikörperantwort auslösen [128].

Im ELISA wurde die Bindungskapazität der IgY-Präparationen gegen verschiedene rekombinante OPV-Oberflächenproteine getestet, für deren Herstellung die jeweilige Sequenz von *Vaccinia Virus Western Reserve* verwendet wurde. Als Antigene wurden die Proteine D8, H3, L1 und A27 der inneren Membran, B5 und A33 der

äußeren Membran sowie ein *Vaccinia Virus*-Lysat eingesetzt. Spezifische Bindungen ergeben eine Sättigungskurve, bei unspezifischen Bindungen ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen Antikörper-Konzentration und Bindungskapazität (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Bindungskapazitäten von IgY-Präparationen gegen einzelne *Orthopockenvirus*-Proteine.** Die Bestimmung erfolgte im ELISA gegen Virusproteine der inneren (D8, H3, L1 und A27; links) und äußeren Membran sowie *Vaccinia Virus*-Lysat (B5, A33 und VV-Lysat; rechts) und anschließende Detektion durch einen HRP-markierten Anti-chicken-Antikörper. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Die Bindung spezifischer IgY ergibt eine Sättigungskurve, unspezifische IgY ergeben ein lineares Verhältnis zwischen IgY-Konzentration und Bindungskapazität (VV-Lysat / unspez. IgY, rechts). (IgY#1,  $\alpha$ -VV WR inaktiviert; IgY#2,  $\alpha$ -*Calpox Virus* inaktiviert; IgY#3,  $\alpha$ -VV WR aktiv).

Als Maß für die Bindungskapazität der IgY-Präparationen wurden die scheinbaren  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism berechnet (Tabelle 4). Die Präparationen IgY#1 und IgY#3 hatten vergleichbar niedrige Dissoziationskonstanten zwischen 0,07 und 0,69  $\mu\text{g/ml}$  für D8, L1, B5, A33 und das

*Vaccinia Virus*-Lysat. Bei H3 hatte die Präparation IgY#1, bei A27 die Präparation IgY#3 einen niedrigeren  $K_D$ -Wert. Erwartungsgemäß wies die gegen das *Calpox Virus* generierte Präparation IgY#2 höhere  $K_D$ -Werte gegen *Vaccinia Virus*-Bestandteile auf als die gegen *Vaccinia Virus WR* generierten IgY#1 und #3.

**Tabelle 4:** Scheinbare  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte verschiedener IgY-Präparationen gegen unterschiedliche OPV-Oberflächenproteine und *Vaccinia Virus*-Lysat [ $\mu\text{g/ml}$ ]

VV Proteine	IgY #1 $K_D$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]/ $B_{max}$	IgY #2 $K_D$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]/ $B_{max}$	IgY #3 $K_D$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]/ $B_{max}$
D8	0,21/ 1,05	0,34/ 1,06	0,12/ 1,24
H3	0,33/ 1,6	1,91/ 0,97	1,75/ 0,89
L1	0,69/ 1,88	11,88/ 1,29	0,59/ 1,93
A27	2,63/ 0,84	1,07/ 1,39	0,19/ 1,76
B5	0,09/ 1,84	1,0/ 1,1	0,07/ 1,74
A33	0,27/ 2,12	0,37/ 2,09	0,41/ 1,92
VV-Lysat	0,19/ 1,35	0,57/ 1,48	0,12/ 1,58

#### 4.1.7 Immunscreening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken:

Eine weitere Charakterisierung von Bindungsspezifitäten der IgY-Präparationen erfolgte durch ein Screening gegen  $\lambda$ -Phagen-Expressionsbibliotheken. Dazu wurde eine bereits im Fachgebiet erstellte Bibliothek mit 0,2-3kb großen *Kuhpockenvirus*-Fragmenten und eine mit 3-12kb großen *Vaccinia Virus*-Fragmenten eingesetzt. Das Screening erfolgte durch den Bindungsnachweis von IgY an eine Membran, auf die zuvor der Zellrasen mit den Plaques transferiert worden war (Abbildung 15). Die immunreaktiven Sequenzen wurden durch Sequenzierung des DNA-Inserts in den rekombinanten Phagen und anschließenden Abgleich mit dem entsprechenden Referenzgenom (*Vaccinia Virus* Acc.No.: AY243312 bzw. *Kuhpockenvirus* Acc.No.: AF482758) identifiziert. Die Namen der Gene, ihrer Produkte nach der herkömmlichen Nomenklatur (*Vaccinia Virus Copenhagen*-homologe Proteine) und der zugehörigen Funktionen wurden mittels der Datenbank des „Poxvirus Bioinformatics Resource Centers“ (PBR) ermittelt [240].

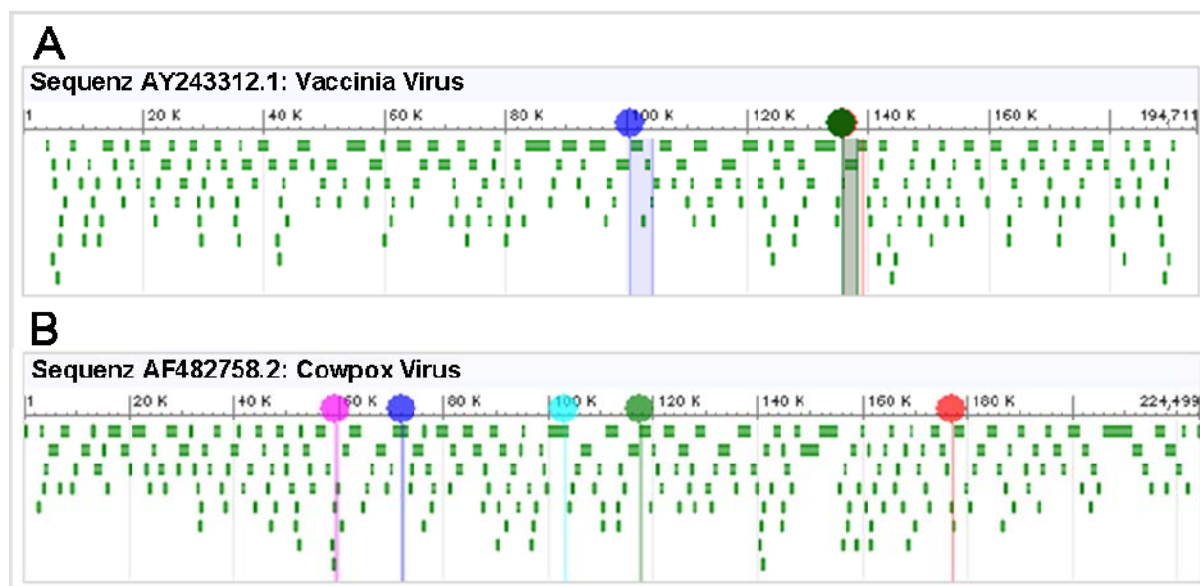


**Abbildung 15: Screening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken.** Nitrocellulosemembranen mit Phagenplaques wurden mit IgY-Präparationen inkubiert und Bindungen mittels eines Peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörpers und eines präzipitierenden Substrats nachgewiesen. Immunpositive Signale sind durch einzelne rote Punkte auf der Nitrocellulosemembran erkennbar.

Bei der Erstellung der Expressionsbibliotheken wurden OPV-DNA-Fragmente in einen Vektor ligiert, die aus auf humanen Zelllinien angezogenen Viruspräparationen stammten. Aus diesem Grund enthielten die Expressionsbibliotheken auch humane DNA-Sequenzen. Idealerweise sollten die Expressionsbibliotheken den gesamten Virusgenombereich abdecken und nur zu einem kleinen Teil nicht-virale DNA enthalten. Eine vorherige Evaluierung der Expressionsbibliotheken ergab jedoch für die *Vaccinia Virus*-Bibliothek 6,7% Vektor-DNA, 40% humane DNA und 53,3% virale DNA (n=30) sowie für die *Kuhpockenvirus*-Bibliothek 56,8% humane DNA und 43,2% virale DNA (n=44). Dabei stammten die OPV-Fragmente aus allen Bereichen des Genoms [238].

Insgesamt wurden 46 immunpositive, rekombinante Klone sequenziert, von denen 34 nur Vektor-DNA, 4 humane DNA und 8 virale DNA enthielten. Die erhaltenen Virussequenzen stammten aus verschiedenen Bereichen des Genoms (Abbildung 16).





**Abbildung 16: Verteilung der durch Screening mit IgY gefundenen immunogenen Fragmente in OPV-Expressionsbibliotheken.** Die sequenzierten DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Referenzsequenzen (A: *Vaccinia Virus*, B: *Kuhpockenvirus*) abgeglichen und im Genom durch farbige Punkte und vertikale Balken markiert. Die horizontalen grünen Balken kennzeichnen die offenen Leserahmen im jeweiligen Genom. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Nukleotidbank von NCBI erstellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

In der folgenden Tabelle 5 sind die immunogenen Sequenzen aufgelistet, die mit den verschiedenen IgY-Präparationen identifiziert wurden. Die Bezeichnung der gefundenen Gene entspricht den allgemeinen Konventionen für die Benennung von *Vaccinia Virus*-Genen oder ORFs und folgt einem Buchstaben- und Zahlencode. Nach diesem werden die aus einem HindIII-Verdau erhaltenen OPV-Fragmente mit absteigender Länge von A-S bezeichnet, die in den Buchstaben-Fragmenten enthaltenen ORFs erhalten eine Nummer und abschließend die Orientierungsangabe des ORF mit L oder R [87].

Da immer mehrere Proteinsequenzen in einem sequenzierten DNA-Fragment enthalten waren, war zwar eine Eingrenzung, aber keine exakte Bestimmung des antigenen Proteins möglich. In den immunogenen Fragmenten waren Sequenzen verschiedener Enzyme (D5, D7, D9, J6, E9), Membranproteine (D8, F13), eines Transkriptionsfaktors (D6), des A-type inclusion-Proteins (A25), des ATI-formierenden Proteins P4c (A26) und von immunevaskulären Proteinen (A52, A53) enthalten (Tabelle 5).

Zu den bereits vorher als Antigen identifizierten Proteinen aus der Liste gehören A25, A26 [241], A53 [238], E9 [238, 242], D5 [242, 243], J6 [242], F13 [241, 243, 244], D8 [241-245], D6 [245] und A52 [244]. Bisher nicht in der Literatur als Antigene

beschrieben sind die in der vorliegenden Arbeit als möglicherweise immunreaktiv erkannte Fragmente von D7, D9, F14 und eines hypothetischen Proteins („Unknown“). Es wurden Sequenzen gleichermaßen von früh wie von spät exprimierten Genen identifiziert.

Das Kontroll-Screening mit unspezifischen IgY ergab keine immunpositiven Signale.

**Tabelle 5:** Identifizierte Vaccinia Virus- und Kuhpockenvirus-Antigene

VV-Cop Homolog*	Expr.- Bibl.	Gen Name	Accession	Funktion	IEDB-Treffer**
<b>IgY #1</b>					
A25L	VV	VV WR-146	AAO89425	A-type inclusion protein	-
A25L	VV	VV WR-147	AAO89426	A-type inclusion protein	+
A25L	VV	VV WR-148	AAO89427	A-type inclusion protein	+
A26L	VV	VV WR-149	AAO89428	P4c precursor	-
D5R	VV	VV WR-110	AAO89389	NTPase and replication protein	+
D6R	VV	VV WR-111	AAO89390	Viral early transcription factor small subunit	+
<b>D7R</b>	VV	VV WR-112	AAO89391	RNA polymerase 18 subunit	+
D8L	VV	VV WR-113	AAO89392	Carbonic anhydrase	+
<b>D9R</b>	VV	VV WR-114	AAO89393	NTP-PPH containing mutT motif	-
<b>IgY #2</b>					
A25L	VV	VV WR-146	AAO89425	A-type inclusion protein	-
A25L	VV	VV WR-147	AAO89426	A-type inclusion protein	+
A25L	VV	VV WR-148	AAO89427	A-type inclusion protein	+
<b>IgY #3</b>					
D5R	CV	CV BR-126	AAM13564	NTPase and replication protein	+
D6R	CV	CV BR-127	AAM13565	Viral early transcription factor small subunit	-
J6R	CV	CV BR-112	AAM13552	RNA polymerase 147 subunit	+
F13L	CV	CV BR-062	AAM13506	EV Phospholipase	-
<b>F14L</b>	CV	CV BR-063	AAM13507	Unknown	-
<b>Unknown</b>	CV	CV BR-064	AAM13508	Unknown	-
E9L	CV	CV BR-077	AAM13520	DNA-Polymerase	+
A52R	CV	CV BR-196	AAM13630	Intracellular TLR and IL-1 signaling inhibitor	-
A53R	CV	CV BR-197	AAM13631	Tumor necrosis factor receptor (CrmC)	-

\* Erstmals identifizierte Immunepitope sind fett gedruckt

\*\* Orthopoxvirus Immune Epitope Database-Treffer (IEDB, [www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)) für das in dieser Arbeit als immunreaktiv identifizierte Fragment

#### 4.1.8 Lyophilisierung von IgY

Um einen Aktivitätsverlust der Antikörper durch die Lagerung zu vermeiden, wurden die aufgereinigten und charakterisierten IgY-Präparationen lyophilisiert. Als



Stabilisator diente Trehalose, die sowohl während des Gefriertrocknungsprozesses die Proteinstruktur schützt [235], als auch bei längerer Lagerung einen Aktivitätsverlust der IgY vermindert [236]. Die Lagerung der in 0,1M Trehalose lyophilisierten IgY-Präparationen erfolgte bei 4°C. Nach 2, 4, 6 und 12 Monaten der Lagerung wurde je ein Aliquot in bidestilliertem Wasser gelöst und im PRNT<sub>50</sub> auf die Funktionalität hin überprüft. Nach einem Jahr war, im Vergleich zum Ausgangstiter, bei den lyophilisiert gelagerten IgY im Gegensatz zu den in PBS bei 4°C gelagerten Kontroll-Präparationen kein Aktivitätsverlust festzustellen.

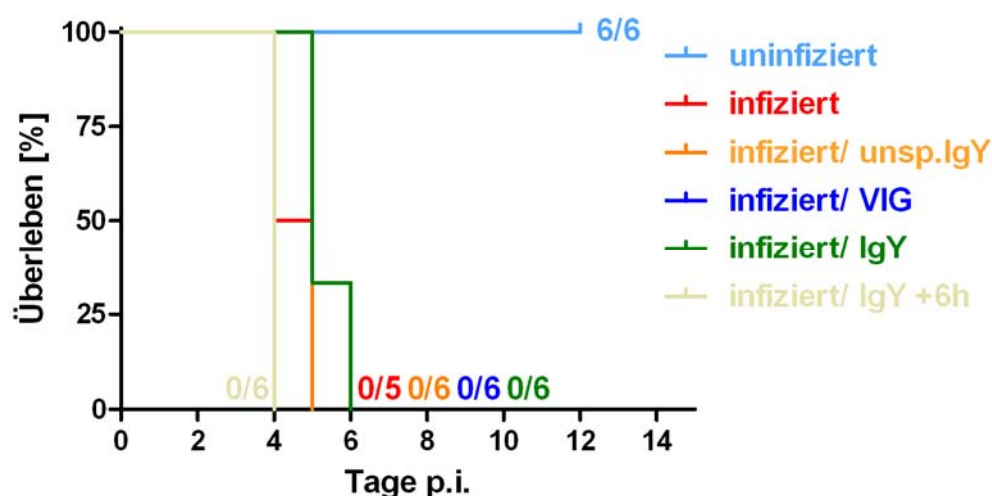
## **4.2 Wirksamkeit von IgY *in vivo***

Die *in vitro* charakterisierte IgY-Präparation wurde in einem Mausmodell auf ihre Wirksamkeit gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen getestet. In einem ersten Versuch wurden Mäuse mit 2 verschiedenen infektiösen Dosen infiziert ( $10^6$  und  $10^4$  PFU *Vaccinia Virus Western Reserve*) und viermal intranasal behandelt. Auf Grund des Therapieerfolgs bei einer Infektion mit  $10^4$  PFU wurde in dem zweiten Versuch mit der gleichen Infektionsdosis der Effekt einer einmaligen Behandlung getestet. Alle Manipulationen erfolgten unter kurzzeitiger Betäubung mit Isofluran. Die Tiere wurden täglich mindestens einmal gewogen, zudem wurden die Symptome bewertet. Bei einem Gewichtsverlust von 20% mussten die Tiere nach den Richtlinien des LAGeSo unter Betäubung getötet werden.

### **4.2.1 Infektion mit $10^6$ PFU und viermalige Behandlung mit IgY**

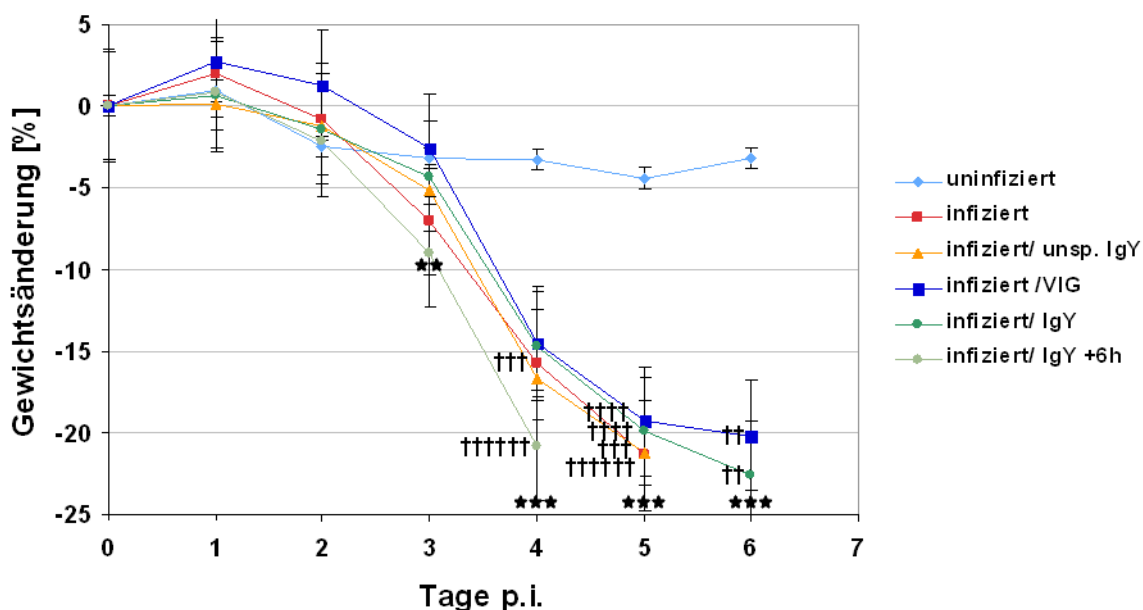
Es wurden 5 Gruppen von Mäusen mit  $10^6$  PFU *Vaccinia Virus* intranasal infiziert. Einer zusätzlichen Gruppe wurde zur Manipulationskontrolle PBS intranasal appliziert. Bis auf eine der Kontrollgruppen (infiziert), die aus nur 5 Tieren bestand, enthielten alle anderen Gruppen 6 Tiere. 2 der infizierten Gruppen wurden mit OPV-spezifischen IgY alle 24h entweder ab 6h vor der Infektion oder ab 6h nach der Infektion insgesamt viermal intranasal behandelt. Die übrigen 3 infizierten Gruppen

wurden zur Kontrolle der Wirksamkeit der OPV-spezifischen IgY entweder mit VIG oder mit unspezifischen IgY oder mit PBS alle 24h ab 6h vor der Infektion intranasal behandelt. Der uninfizierten Kontrollgruppe wurden OPV-spezifische IgY zu denselben Zeitpunkten intranasal appliziert. Die Überlebenszeitanalyse der Tiere nach der Infektion ist in Abbildung 17 dargestellt. Alle infizierten Tiere mussten unabhängig von der Behandlung zwischen 4 und 6 Tagen nach der Infektion getötet werden.



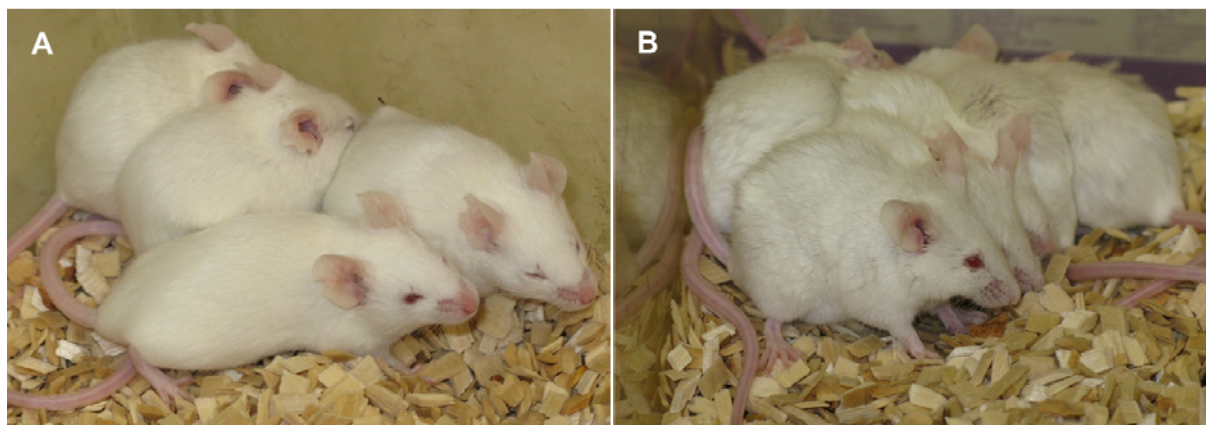
**Abbildung 17: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer letalen Infektionsdosis von  $10^6$  PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Dargestellt ist das Überleben der einzelnen Gruppen in Prozent über die Zeit nach Infektion (p.i.). Die Tiere wurden infiziert und viermal intranasal im Abstand von 24h behandelt. Die Kontrollgruppen (uninfiziert, infiziert, infiziert/ unsp. IgY, infiziert/ VIG) und die erste IgY-Behandlungsgruppe (infiziert/ IgY) wurden ab dem Zeitpunkt 6h vor der Infektion behandelt, die Behandlung der zweiten IgY-Gruppe (infiziert/ IgY +6h) erfolgte ab dem Zeitpunkt 6h nach der Infektion.

Um den Krankheitsverlauf zu bewerten, wurden die Tiere täglich mindestens einmal gewogen. Die arithmetischen Mittelwerte des Gewichts aller Tiere (n=6) einer Gruppe und der zugehörige Standardfehler sind in Abbildung 18 dargestellt. Alle infizierten Tiere verloren ab dem dritten Tag nach der Infektion rapide an Gewicht, bis sie wegen zu hohen Gewichtsverlusts zwischen 4 und 6 Tagen p.i. getötet werden mussten.



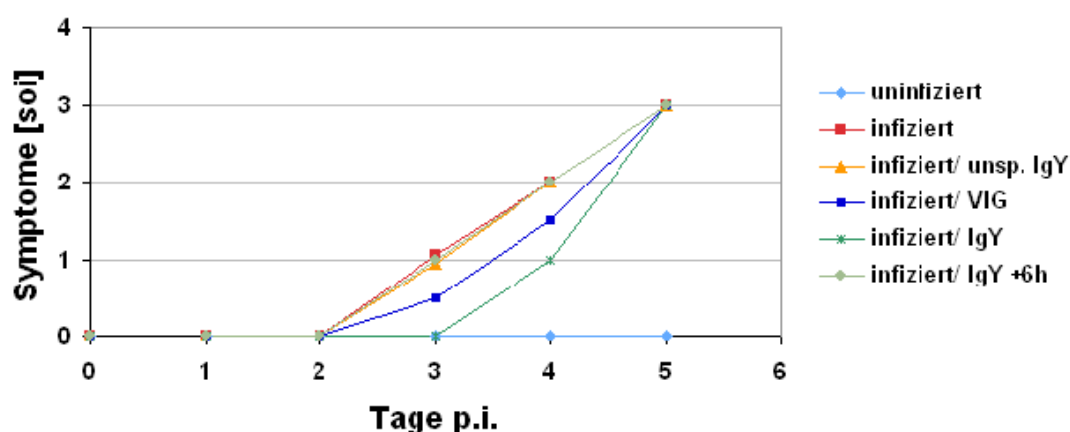
**Abbildung 18: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion (p.i.) mit 10<sup>6</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Gewichtsänderung in Prozent jeder Gruppe  $\pm$  Standardfehler bezogen auf das Initialgewicht. Die statistische Auswertung erfolgte durch One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die Signifikanzwerte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen uninfizierter und infizierten Gruppen. Sie gelten für den Koordinatenpunkt der Kurve, unter der die Sterne jeweils platziert sind, bzw. für die Koordinatenpunkte aller Kurven, wenn die Sterne direkt über der x-Achse positioniert sind (\*\*\* p = 0,001, \*\* p = 0,01, \* p = 0,05). Getötete Tiere sind durch ein Kreuz (†) markiert. Alle infizierten Tiere haben unabhängig von der Behandlung ab dem 3. Tag p.i. rapide an Gewicht verloren.

Zusätzlich zur Bestimmung des Gewichts jedes Tieres erfolgte täglich eine Beurteilung der Symptome (*signs of illness, soi*), die einem festgelegten Punktesystem von 0 bis 4 folgt. 0 Punkte wurden bei einem gesunden Erscheinungsbild vergeben. 1 Punkt wurde für gestäubtes Fell und 2 Punkte für gestäubtes Fell und einen gekrümmten Rücken gegeben. Zeigte ein Tier zusätzlich Atmungsschwierigkeiten und eine verminderte Motilität, erhielt es 3 Punkte. Gesunde Tiere waren deutlich von erkrankten Tieren zu unterscheiden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Balb/c-Mäuse.** A) Gesunde Tiere der nicht-infizierten Kontrollgruppe, B) Erkrankte Tiere der infizierten und unbehandelten Kontrollgruppe.

Entsprechend der Gewichtsverläufe zeigten die infizierten Tiere ab Tag 3 nach Infektion stärker werdende Symptome (Abbildung 20).

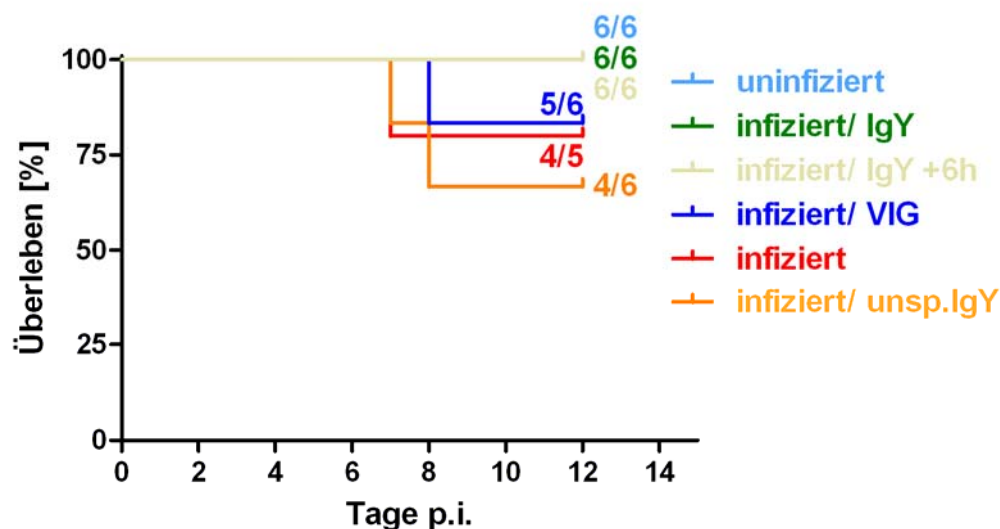


**Abbildung 20: Symptome von Mäusen nach Infektion mit  $10^6$  PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Arithmetische Mittelwerte der soi jeder Gruppe (soi = signs of illness, 0 = gesund, 1 = gesträubtes Fell, 2 = 1 + gekrümmter Rücken, 3 = 2 + Atmungsschwierigkeiten, verminderte Motilität). Alle infizierten Tiere zeigten ab dem dritten Tag nach Infektion (p.i.) Symptome, die sich verstärkten, bis die Tiere getötet werden mussten.

#### 4.2.2 Infektion mit $10^4$ PFU und viermalige Behandlung mit IgY

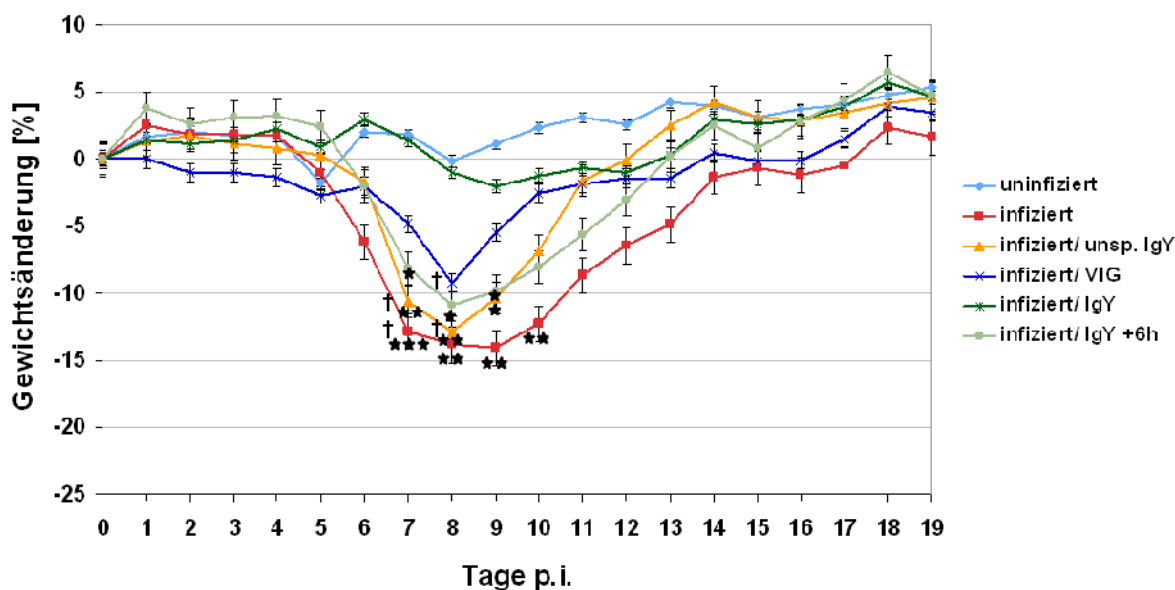
Es wurden 5 Gruppen von Mäusen mit  $10^4$  PFU *Vaccinia Virus* intranasal infiziert. Einer zusätzlichen Gruppe wurde zur Manipulationskontrolle PBS intranasal appliziert. Bis auf eine der Kontrollgruppen (infiziert), die aus nur 5 Tieren bestand, enthielten alle anderen Gruppen 6 Tiere. Die Tiere wurden wie im vorhergehenden Experiment viermal mit OPV-spezifischen IgY oder VIG bzw. zur Kontrolle mit

unspezifischen IgY oder PBS intranasal behandelt. Die Überlebenszeitanalyse der Tiere nach der Infektion ist in Abbildung 21 dargestellt. Alle mit IgY behandelten Tiere überlebten die Infektion, während 1 von 6 mit VIG behandelten Tieren und 3 von 11 Kontrolltieren 7 bzw. 8 Tage nach der Infektion getötet werden mussten.



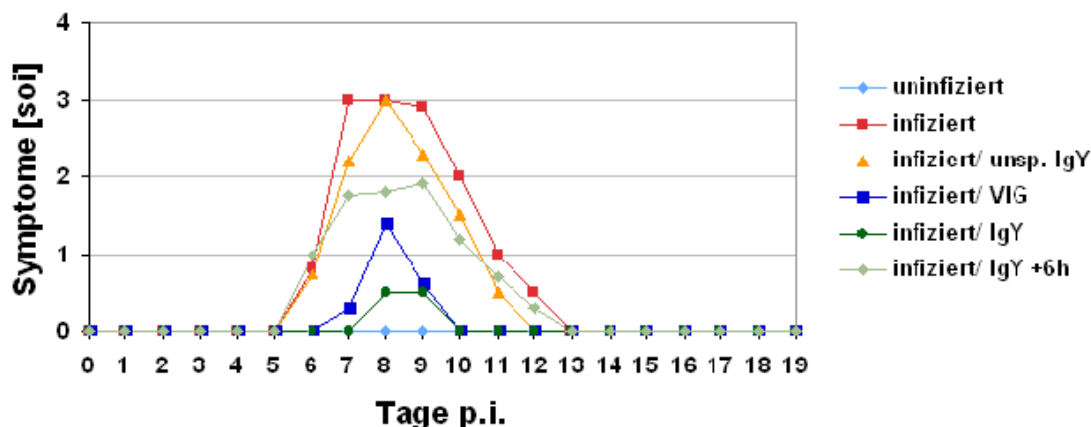
**Abbildung 21: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer Infektionsdosis von  $10^4$  PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Dargestellt ist das Überleben der einzelnen Gruppen in Prozent über die Zeit nach Infektion (post infection = p.i.). Die Tiere wurden am Tag 0 infiziert und viermal intranasal im Abstand von 24h behandelt. Die Kontrollgruppen (uninfiziert, infiziert, infiziert/ unsp. IgY, infiziert/ VIG) und die erste IgY-Behandlungsgruppe (infiziert/ IgY) wurden ab 6h vor der Infektion behandelt, die Behandlung der zweiten IgY-Gruppe (infiziert/ IgY +6h) erfolgte ab 6h nach der Infektion.

Genaueren Aufschluss über den Erfolg der Behandlung geben die durchschnittlichen Gewichtsverläufe (Abbildung 22). Während die Gewichtskurve der prophylaktisch 6h vor der Infektion mit IgY behandelten Gruppe (infiziert/IgY) ähnlich zu der der uninfizierten Kontrollgruppe verlief, war bei der therapeutisch mit IgY behandelten Gruppe (infiziert/IgY +6h) kein signifikanter Behandlungseffekt zu verzeichnen. Der Gewichtsverlust war wie bei den beiden infizierten Kontrollgruppen (infiziert, infiziert/unsp. IgY) ab Tag 7 p.i. signifikant höher als bei der uninfizierten Kontrollgruppe. Nach 9 bzw. 10 Tagen p.i. erholten sich die überlebenden Tiere jedoch wieder und erreichten 4 Tage später wieder ihr Initialgewicht. Die mit VIG behandelte Gruppe verlor zwar ebenfalls an Gewicht, der durchschnittliche Verlust war aber nicht signifikant niedriger als bei der uninfizierten Kontrollgruppe.



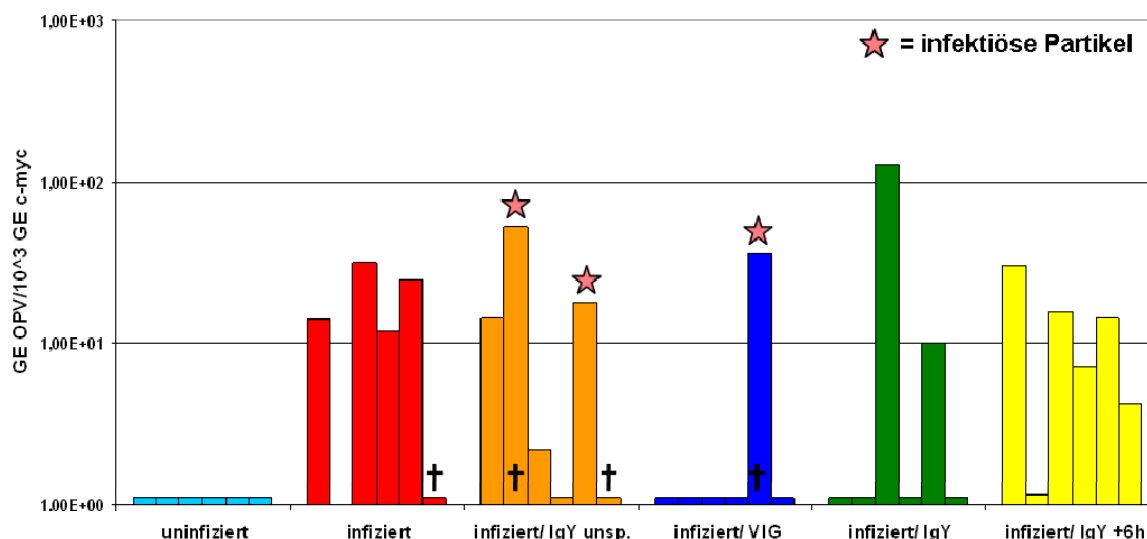
**Abbildung 22: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion mit  $10^4$  PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Gewichtsänderung in Prozent jeder Gruppe  $\pm$  Standardfehler bezogen auf das Initialgewicht. Die statistische Auswertung erfolgte durch One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die Signifikanzwerte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen uninanzierten und infizierten Gruppen (\*\*\*)  $p = 0,001$ , \*\*  $p = 0,01$ , \*  $p = 0,05$ ). Getötete Tiere sind durch ein Kreuz (†) markiert, das jeweils links von dem zugehörigen Koordinatenpunkt steht.

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Ausprägung der Symptome (Abbildung 23). Bei den infizierten Kontrollgruppen zeigten sich die ersten Symptome am Tag 6 p.i., sie verschwanden jedoch bei den überlebenden Tieren bis Tag 13 p.i. wieder vollständig. Die mit IgY therapeutisch behandelten Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolltiere. Die prophylaktisch mit VIG behandelte Gruppe zeigte 1 Tag später, die mit IgY behandelte Gruppe zeigte 2 Tage später und auch schwächer ausgeprägte Symptome als die Kontrollgruppen.



**Abbildung 23: Symptome von Mäusen nach Infektion mit  $10^4$  PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.** Arithmetische Mittelwerte der soi jeder Gruppe (soi = signs of illness, 0 = gesund, 1 = gesträubtes Fell, 2 = 1 + gekrümmter Rücken, 3 = 2 + Atmungsschwierigkeiten, verminderte Motilität). Der prophylaktische Behandlungseffekt durch IgY ist stärker als der durch VIG, während eine therapeutische Behandlung mit IgY nahezu keinen Einfluss auf den Beginn und die Stärke der Symptome hat.

Eine Woche nach der Infektion und am Ende des Experiments wurde allen Tieren Blut abgenommen, um das Serum mittels ELISA auf Antikörper und mittels Plaque-Test auf infektiöse Partikel zu untersuchen sowie den Blutkuchen mit Real Time PCR auf eine Virämie hin zu testen. Auf Grund des geringen Probenvolumens wurde die DNA aus dem Blutkuchen extrahiert und die Quantifizierung der viralen Genomäquivalente zur Standardisierung auf  $10^3$  Kopien c-myc bezogen. Die Untersuchung der Blutproben vom Tag 7 p.i. ergab, dass bei 7 von 11 infizierten Kontrolltieren virale DNA im Blut von durchschnittlich etwa 10 Kopien OPV/ $10^3$  Kopien c-myc nachgewiesen werden konnte, in 2 Serumproben konnten zusätzlich infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Auch im Blut der mit IgY therapeutisch behandelten Gruppe konnten bei 5 von 6 Tieren OPV-Genomäquivalente nahe der Nachweisgrenze detektiert werden. Bei den prophylaktisch mit IgY bzw. mit VIG behandelten Gruppen wurde bei weniger Tieren (2 von 6 bzw. 1 von 6) virale DNA nachgewiesen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Nachweis von OPV-Kopien im Blut einzelner Tiere an Tag 7 nach Infektion.** Angegeben sind die mit Real Time-PCR ermittelten Genomäquivalente (GE) bezogen auf  $10^3$  Kopien c-myc. Die Tiere wurden mit  $10^4$  PFU VV WR infiziert und vier Mal intranasal behandelt. Sterne markieren im Plaque-Test nachgewiesene infektiöse Partikel, Kreuze markieren wegen zu hohen Gewichtsverlusts an Tag 7 und 8 getötete Tiere. Bei den beiden prophylaktisch mit VIG bzw. mit IgY behandelten Gruppen ist bei weniger Tieren virale DNA im Blut nachweisbar als bei den infizierten Kontrolltieren und bei der mit IgY prophylaktisch behandelten Gruppe.

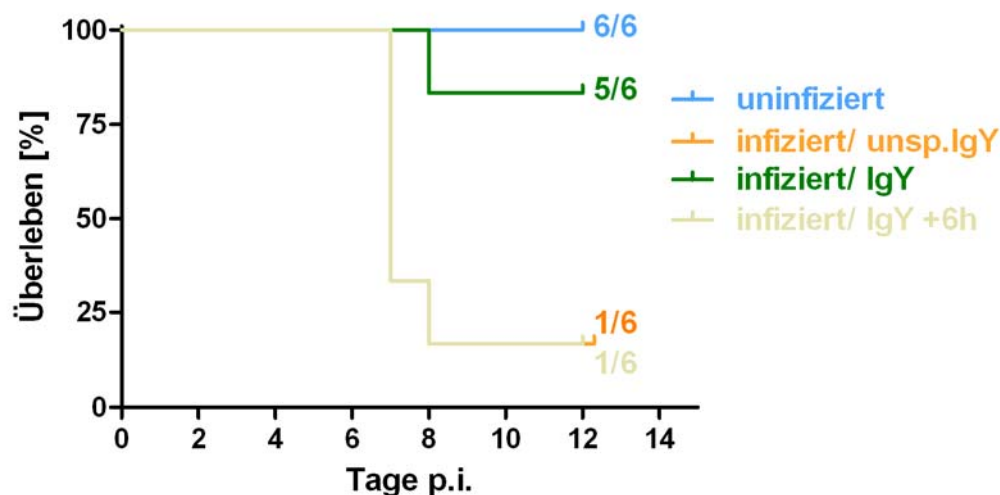
Im Blut vom 19. Tag nach der Infektion konnten bei keinem der noch lebenden Tiere OPV-DNA oder infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Serums mittels ELISA und PRNT<sub>50</sub> zeigte, dass 7 bzw. 8 Tage nach der Infektion noch keine bindenden oder neutralisierenden IgG im Blut nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Am Ende des Experimentes an Tag 19 p.i. waren bei allen infizierten Tieren bis auf 2, die mit IgY prophylaktisch behandelt wurden, bindende IgG im Serum mit Titern zwischen 1:1600 und 1:12800 sowie neutralisierende Antikörper mit Titern im Bereich von 1:40 bis 1:480 vorhanden. Dieses Ergebnis deckte sich mit der Beobachtung, dass die beiden betreffenden Tiere weder Symptome gezeigt noch Gewicht verloren hatten.

#### 4.2.3 Infektion mit $10^4$ PFU und einmalige Behandlung mit IgY

Es wurden 4 Gruppen von jeweils 6 Tieren wie im vorhergehenden Experiment mit  $10^4$  PFU *Vaccinia Virus* intranasal infiziert, aber nur einmal mit OPV-spezifischen IgY 6h vor oder 6h nach der Infektion intranasal behandelt. Da in den vorherigen Experimenten bereits gezeigt wurde, dass die intranasale Behandlung mit

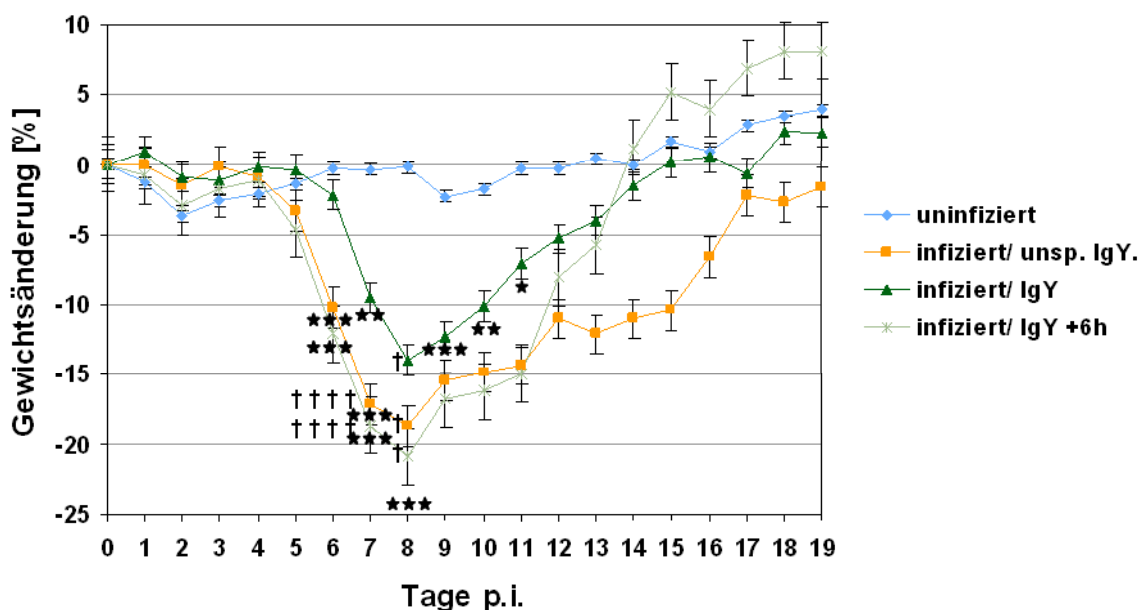


unspezifischen IgY der Behandlung mit PBS gleichwertig ist, wurde in diesem Experiment auf die zweite Kontrollgruppe verzichtet. Die Überlebenszeitanalyse der Tiere nach der Infektion ist in Abbildung 25 dargestellt. 5 von 6 mit IgY prophylaktisch behandelten Tieren haben die Infektion überlebt, während 5 von 6 infizierten Kontrolltieren (infiziert/unsp. IgY) und auch 5 von 6 therapeutisch mit IgY behandelten Tieren 7 bzw. 8 Tage nach der Infektion getötet werden mussten.



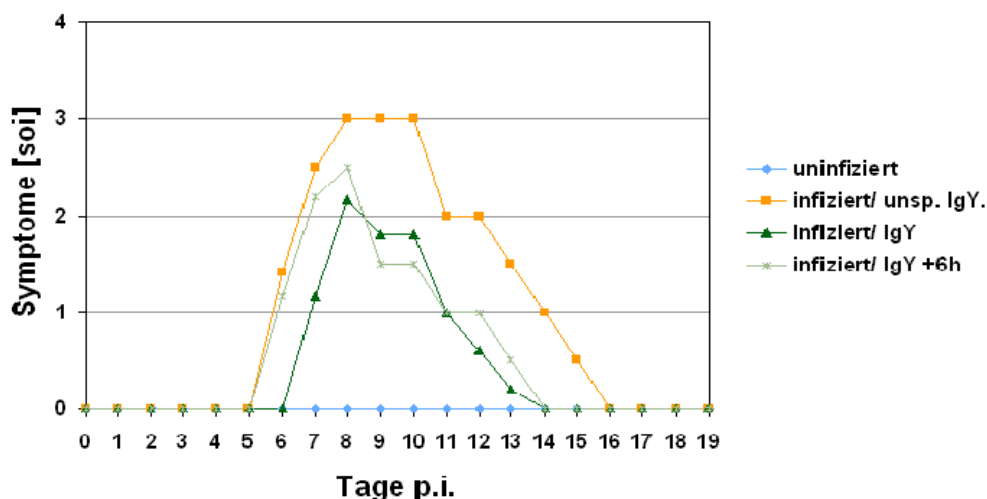
**Abbildung 25: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer Infektionsdosis von  $10^4$  PFU VV WR und einmaliger Behandlung.** Dargestellt ist das Überleben der einzelnen Gruppen in Prozent über die Zeit nach Infektion (p.i.). Die Tiere wurden infiziert und nur einmal intranasal behandelt. Die Kontrollgruppen (uninfiziert, infiziert/ unsp. IgY) und die erste IgY-Behandlungsgruppe (infiziert/ IgY) wurden 6h vor der Infektion behandelt, die Behandlung der zweiten IgY-Gruppe (infiziert/ IgY +6h) erfolgte 6h nach der Infektion

Anhand der Gewichtsverläufe ist erkennbar, dass die Tiere der Gruppe, die mit OPV-spezifischen IgY 6h nach der Infektion behandelt wurden, ebenso wie die der infizierten Kontrollgruppe ab Tag 6 p.i. signifikant Gewicht verloren haben (Abbildung 26). Die Gruppe, die mit IgY 6h vor der Infektion behandelt wurde, verlor ab Tag 7 p.i. signifikant an Gewicht, wobei der Verlust um ca. 5% geringer ausfiel als bei den anderen beiden infizierten Gruppen. Alle überlebenden Tiere erreichten 15 Tage nach der Infektion wieder ihr Initialgewicht.



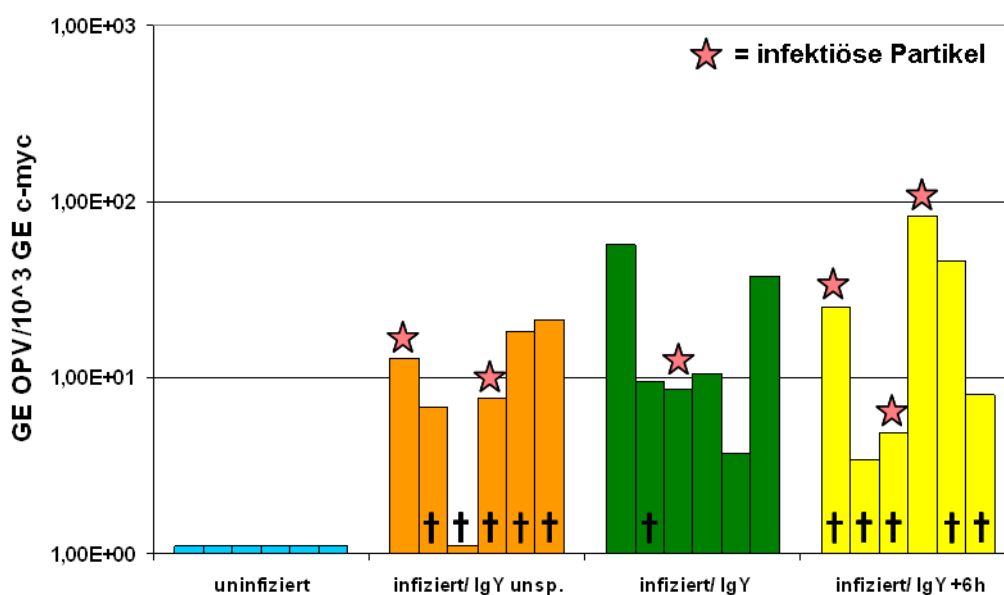
**Abbildung 26: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion mit  $10^4$  PFU VV WR und einer Behandlung 6h vor oder nach der Infektion.** Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Gewichtsänderung in Prozent jeder Gruppe  $\pm$  Standardfehler bezogen auf das Initialgewicht. Die statistische Auswertung erfolgte durch One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die Signifikanzwerte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen uninfizierter und infizierten Gruppen. Sie gelten für den Koordinatenpunkt der Kurve, unter der die Sterne jeweils platziert sind, bzw. für die Koordinatenpunkte aller Kurven, wenn die Sterne direkt über der x-Achse positioniert sind (\*\* $p = 0,001$ , \*\*  $p = 0,01$ , \*  $p = 0,05$ ). Getötete Tiere sind durch ein Kreuz ( $\dagger$ ) markiert, das jeweils links von dem zugehörigen Koordinatenpunkt steht.

Auch die Symptomverläufe belegen den prophylaktischen Behandlungseffekt durch OPV-spezifische IgY, da die behandelten Tiere im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren einen Tag verzögert Symptome zeigten. Die Behandlung mit IgY 6h nach der Infektion zeigte offensichtlich keine Wirkung (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Symptome von Mäusen nach Infektion mit  $10^4$  PFU VV WR und einmaliger Behandlung.** Arithmetische Mittelwerte der soi jeder Gruppe (soi = signs of illness, 0 = gesund, 1 = gesträubtes Fell, 2 = 1 + gekrümmter Rücken, 3 = 2 + Atmungsschwierigkeiten, verminderte Motilität).

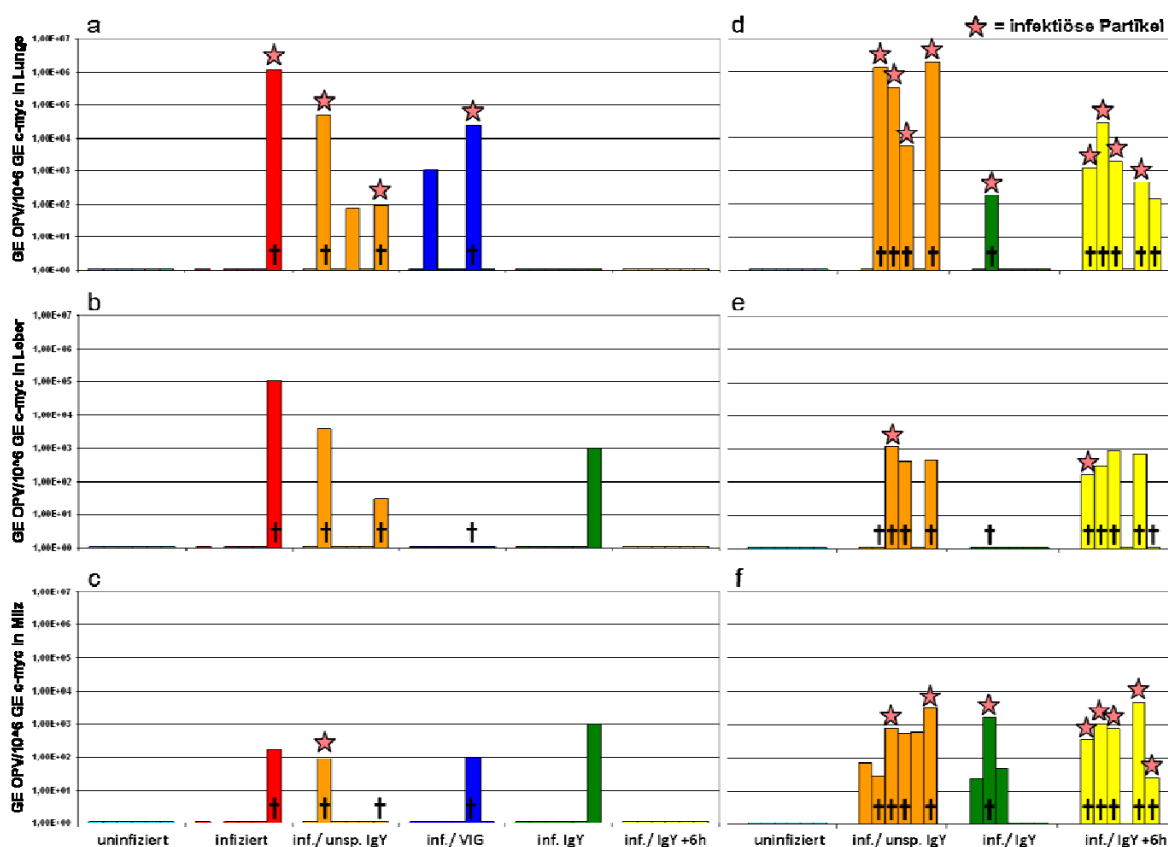
Auch bei diesem Versuch wurde eine Woche nach der Infektion und am Ende des Experiments allen Tieren Blut für die Untersuchung auf Antikörper und *Vaccinia Virus* abgenommen. Bei der Untersuchung der Blutproben vom Tag 7 p.i. konnte bei 17 der insgesamt 18 infizierten Tiere unabhängig von der Behandlung virale DNA nahe der Nachweisgrenze (durchschnittlich ca. 10 Kopien OPV/ $10^3$  Kopien c-myc) detektiert werden. In den Blutproben von 6 der 18 infizierten Tiere konnten zusätzlich infektiöse Partikel nachgewiesen werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Nachweis von OPV-Kopien im Blut einzelner Tiere an Tag 7 nach Infektion.** Angegeben sind die mit Real Time-PCR ermittelten Genomäquivalente (GE) bezogen auf  $10^3$  Kopien c-myc. Die Tiere wurden mit  $10^4$  PFU VV WR infiziert und einmal intranasal behandelt. Sterne

markieren im Plaque-Test nachgewiesene infektiöse Partikel, Kreuze markieren wegen zu hohen Gewichtsverlusts an Tag 7 oder 8 p.i. getötete Tiere.

Ab einem Gewichtsverlust von 20% bzw. am Ende des Experiments (Tag 19 p.i.) wurden die Tiere unter Betäubung getötet. Bei allen Tieren aus den beiden Versuchen, bei denen mit  $10^4$  PFU *Vaccinia Virus* infiziert wurde, wurden Lunge, Milz und Leber auf virale DNA und infektiöse Partikel untersucht (Abbildung 29). Dabei zeigte sich, dass bei allen 14 Tieren, die auf Grund des Infektionsverlaufs getötet werden mussten, OPV-DNA in der Lunge und in geringeren Mengen zumeist auch in Milz und Leber nachweisbar war. Bei 13 von 14 Tieren konnten ebenfalls infektiöse Partikel in der Lunge gefunden werden. 19 Tage nach der Infektion konnte nur bei 7 der 34 infizierten und überlebenden Tiere OPV-DNA nahe der Nachweisgrenze in Lunge, Leber oder Milz nachgewiesen werden, jedoch keine infektiösen Partikel.



**Abbildung 29: Nachweis von OPV-Kopien in Gewebelysaten einzelner Tiere nach Euthanasierung.** Angegeben sind die mit Real Time-PCR ermittelten Genomäquivalente (GE) bezogen auf  $10^6$  Kopien c-myc. Die Tiere wurden mit  $10^4$  PFU VV WR infiziert und viermal (a, b, c) bzw. einmal (d, e, f) intranasal behandelt. Sterne markieren im Plaque-Test nachgewiesene infektiöse Partikel, Kreuze markieren wegen zu hohen Gewichtsverlusts an Tag 7 oder 8 p.i. getötete Tiere.

Die Untersuchung der Seren mittels ELISA zeigte, dass 7 bzw. 8 Tage nach der Infektion noch keines der infizierten Tiere IgG gegen das Infektionsvirus gebildet

hatte. Bei allen überlebenden Tieren waren jedoch 19 Tage nach der Infektion Virus-spezifische IgG nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

In Kapitel 4.2 wurden die Ergebnisse der Behandlung einer *Orthopockenvirus*-Infektion durch die Applikation von IgY dargestellt. Eine alternative Möglichkeit, gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen vorzugehen, ist die aktive Immunisierung mit einem wirkungsvollen und sicheren Impfstoff. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse einer Immunisierungsstudie im Tiermodell mit der Pockenvakzine IMVAMUNE vorgestellt.

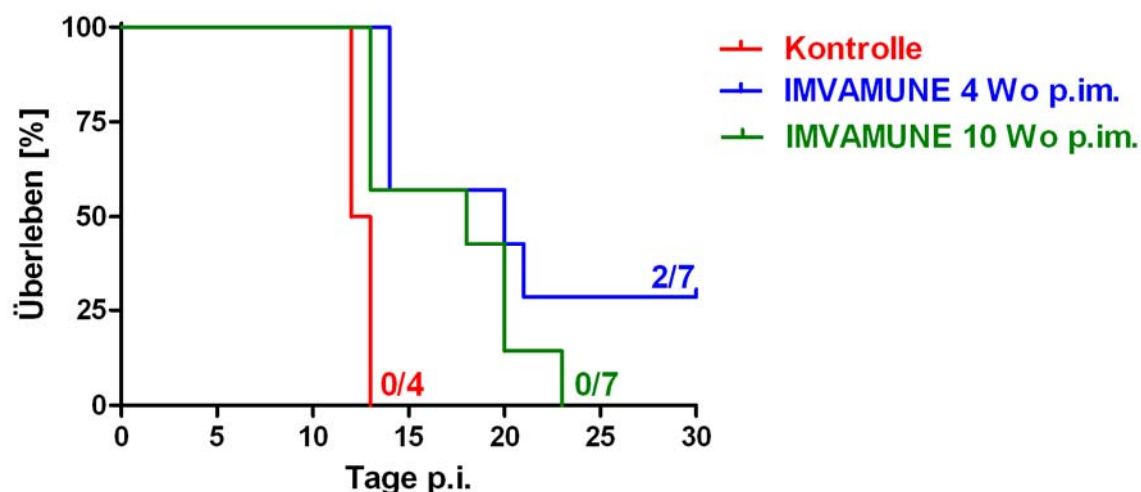
### **4.3 Immunisierungsstudie mit IMVAMUNE**

Die noch nicht zugelassene Pockenvakzine IMVAMUNE wurde von Bavarian Nordic entwickelt und leitet sich von einem MVA-Impfstamm (*Modified Vaccinia Virus Ankara*) ab, mit dem gegen Ende der Eradikationskampagne in Deutschland ca. 120.000 Menschen immunisiert wurden [175]. Infolge multipler Passagierung auf hühnerembryonalen Fibroblasten hat die Lebendvakzine ihre Replikationsfähigkeit in humanen Zellen verloren und gilt daher als risikoärmer als die traditionell eingesetzten Impfstoffe. Für die Zulassung neuer Arzneimittel ist ihre präklinische Überprüfung *in vitro* und *in vivo* erforderlich. Auf Grund vielfältiger Vorteile gegenüber länger existierenden Makaken-Modellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit von IMVAMUNE in dem kürzlich etablierten Marmosetten/*Calpox Virus*-Modell getestet. In diesem Modell führt die intranasale Applikation geringer Mengen *Calpox Virus* zu einer letalen Infektion [231]. Es ist bereits gezeigt, dass bei den Marmosetten mit dem klassischen Impfstoff *Vaccinia Virus Lister-Elstree* 10 Wochen nach Immunisierung ein vollständiger Schutz gegen *Calpox Viren* erreicht werden kann ([233], Kramski et al., in Vorbereitung).

Jeweils 7 Weißbüschelaffen wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen intramuskulär mit  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> IMVAMUNE immunisiert und nach 4 bzw. 10 Wochen mit  $10 \times$  MID<sub>50</sub> *Calpox Virus* intranasal infiziert. Als Kontrolle diente eine Gruppe nicht-immunisierter Tiere (n=4). Die Tiere wurden täglich überwacht und der

Krankheitsverlauf durch die Bestimmung der Viruslast im Blut und in Rachenabstrichen verfolgt. Bei starken Symptomen bzw. am Ende des Experiments wurden die Tiere eingeschläfert und sezirt.

Alle 4 Kontrolltiere mussten am 12. und 13. Tag nach der Infektion auf Grund der Schwere der Symptome getötet werden. Die Tiere, die 10 Wochen nach der Immunisierung infiziert wurden, mussten zwischen 13 und 23 Tagen nach der Infektion getötet werden. Von den 7 Tieren, die nur 4 Wochen nach der Immunisierung infiziert wurden, mussten 5 Tiere zwischen 14 und 21 Tagen nach der Infektion eingeschläfert werden, 2 Tiere haben die Infektion ohne Entwicklung von Symptomen überlebt (Abbildung 30).

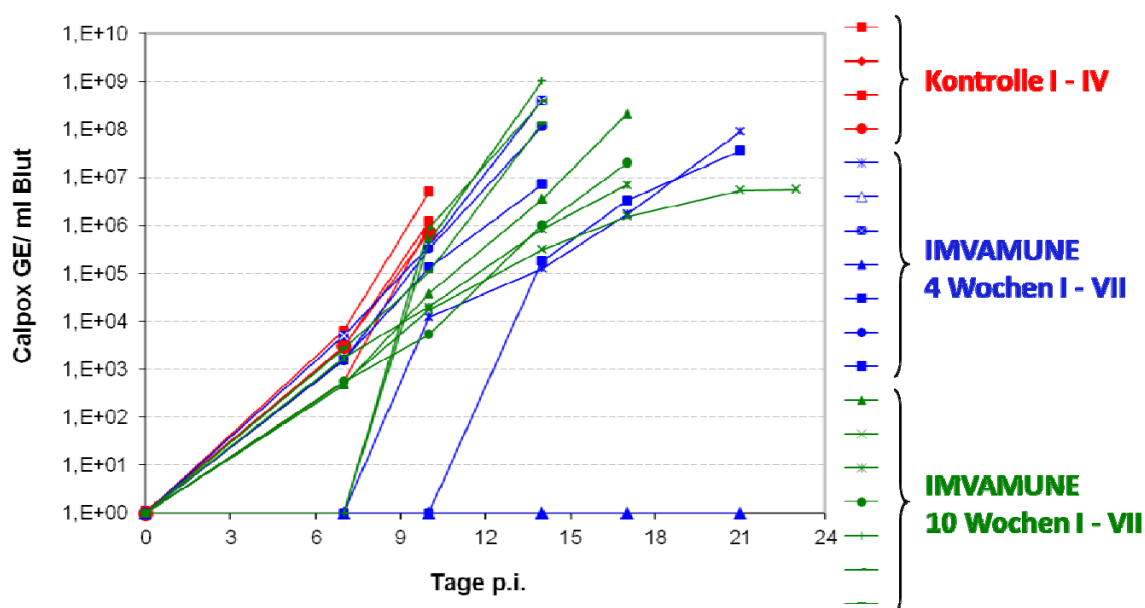


**Abbildung 30: Kaplan-Meier Plot von immunisierten Tieren mit IMVAMUNE und nicht-immunisierten Tieren.** Die Krallenaffen wurden zweimal im Abstand von vier Wochen immunisiert und mit einer  $10 \times \text{MID}_{50}$  intranasal vier bzw. zehn Wochen nach der Booster-Immunisierung infiziert.

#### 4.3.1 Nachweis von viralen Nukleinsäuren und infektiösen Partikeln

Aus den Blutproben wurde DNA bzw. RNA extrahiert. Mit Hilfe eines Real Time-PCR Assays, mit dem auf Grund von Sequenzunterschieden zwischen dem *Calpox Virus* und anderen OPV zwar das Impfvirus, aber nicht das *Calpox Virus* nachweisbar ist, wurden die Impfvirus-Genomäquivalente quantifiziert. Mit einem weiteren Real Time-PCR Assay wurden die Blutproben spezifisch auf das *Calpox Virus* getestet. Es konnte zu keinem Zeitpunkt IMVAMUNE-Nukleinsäure im Blut nachgewiesen

werden. 7 Tage nach der Infektion ist bei allen Kontrolltieren *Calpox Virus*-DNA zwischen  $10^3$  und  $10^4$  GE/ml Blut nachweisbar (Abbildung 31). Bei der 10 Wochen Gruppe war bei 5 Tieren ebenfalls bereits 1 Woche nach der Infektion DNA des Infektionsvirus nachweisbar, bei 2 Tieren erst bei der nächsten Blutabnahme an Tag 10 p.i.. Im Blut der beiden überlebenden Tiere der 4 Wochen Gruppe (IMVAMUNE 4 Wochen III + IV) war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte *Calpox Virus*-DNA nachweisbar, bei 3 Tieren bereits ab Tag 5 nach der Infektion und bei 2 Tieren erst ab Tag 10 bzw. 14 p.i..



**Abbildung 31: Nachweis von *Calpox Virus*-DNA im Blut nach Infektion.** Angegeben sind die mit Real Time-PCR ermittelten Genomäquivalente (GE) pro ml Blut. Jeweils 7 Tiere wurden mit IMVAMUNE immunisiert und 4 bzw. 10 Wochen später mit einer letalen Dosis *Calpox Virus* infiziert. 4 Tiere wurden zur Kontrolle ohne vorherige Immunisierung infiziert. Die Viruslast im Blut wurde 0, 7, 10, 14, 17, 21 und 23 Tage p.i. bestimmt.

Um weitere Daten hinsichtlich des Infektionsverlaufes zu erhalten, wurden Rachenabstriche mittels Plaque-Test untersucht (Tabelle 6). Auf Grund der Schwierigkeit des Einfangens der Tiere zur Probennahme wurden zur Verringerung von Stress nicht zu allen geplanten Zeitpunkten Rachenabstriche gemacht. Bei 3 von 4 Kontrolltieren waren bereits 7 Tage p.i. infektiöse Partikel im Rachen vorhanden, bei 1 Tier konnten erst bei dem folgenden Untersuchungszeitpunkt an Tag 10 p.i. infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Bei den immunisierten Tieren war infektiöses Virus ab dem 7., 10., 12. oder erst ab dem 14. Tag p.i. nachweisbar. Bei den beiden überlebenden Tieren (IMVAMUNE 4 Wo II + IV) konnte kein bzw. ein Mal infektiöses Virus an der Nachweisgrenze gefunden werden.

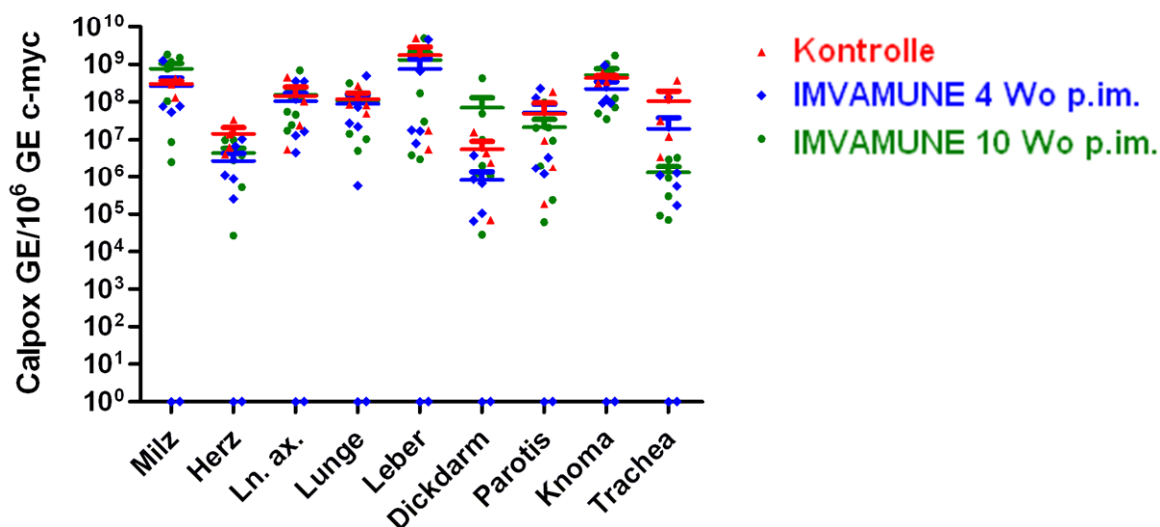
**Tabelle 6:** Nachweis von infektiösem *Calpox Virus* in Rachenabstrichen nach Infektion

	Tage p.i. (+ / -)							
	3	7	10	12	14	17	21	35
<b>Kontrolle I</b>	-	+	+	+				
<b>Kontrolle II</b>	-	-	+	+				
<b>Kontrolle III</b>		+						
<b>Kontrolle IV</b>		+	+	+				
<b>IMVAMUNE 4 Wo I</b>	-	+	+		+	+	+	
<b>IMVAMUNE 4 Wo II</b>			-		-		-	-
<b>IMVAMUNE 4 Wo III</b>	(+)	+	+		+			
<b>IMVAMUNE 4 Wo IV</b>					-			-
<b>IMVAMUNE 4 Wo V</b>		-	-	-	(+)			
<b>IMVAMUNE 4 Wo VI</b>		-	-	+				
<b>IMVAMUNE 4 Wo VII</b>		+	+	+	+		+	
<b>IMVAMUNE 10 Wo I</b>	-	-	-		+	+	+	
<b>IMVAMUNE 10 Wo II</b>	-	+	+		+	+		
<b>IMVAMUNE 10 Wo III</b>	-	+	+		+	+	+	
<b>IMVAMUNE 10 Wo IV</b>	-	-	+		+	+	+	
<b>IMVAMUNE 10 Wo V</b>		-	-	(+)	+			
<b>IMVAMUNE 10 Wo VI</b>			+	+				
<b>IMVAMUNE 10 Wo VII</b>								

(+) = ein infektiöses Partikel, + ≤ 2 infektiöse Partikel im Plaque-Test nachgewiesen. (p.i. = post Infektion; Wo = Wochen Wartezeit nach Immunisierung bis zur Infektion)

Am Ende des Experiments wurde die virale DNA in verschiedenen Organen quantifiziert, um zu überprüfen, ob sich zwischen den Kontrolltieren und den erkrankten, immunisierten Tieren Unterschiede in der Viruslast feststellen lassen. In Abbildung 32 ist die Viruslast exemplarisch für 9 der 25 untersuchten Gewebe dargestellt. In allen Organen der erkrankten Tiere lassen sich unabhängig von der Immunisierung zwischen  $10^6$  und  $10^9$  *Calpox Virus*-Genomäquivalente pro  $10^6$  Kopien c-myc nachweisen. Im Lebergewebe ist die Viruslast am höchsten. Dagegen konnte bei den beiden überlebenden Tieren in keinem der untersuchten Organe DNA des Infektionsvirus gefunden werden.





**Abbildung 32: Nachweis von *Calpox Virus*-Genomäquivalenten in ausgewählten Geweben.** Die Krallenaffen wurden unter Narkose getötet, bevor Organproben für eine DNA-Extraktion und Bestimmung der Viruslast entnommen wurden. Exemplarisch angegeben sind die mit Real Time-PCR ermittelten Genomäquivalente (GE) bezogen auf  $10^6$  Kopien c-myc in 9 Geweben und die arithmetischen Mittelwerte jeder Gruppe mit dem Standardfehler. Bei den erkrankten Tieren konnte *Calpox Virus*-DNA in allen untersuchten Organen quantitativ nachgewiesen werden, bei den 2 überlebenden Tieren dagegen in keinem der untersuchten Organe. (Ln. ax. = Lymphonodus axillaris; Knoma = Knochenmark; Wo p.im. = Wochen post Immunisierung)

#### 4.3.1 Nachweis von OPV-spezifischen Antikörpern

Um die Entwicklung der humoralen Immunantwort durch die Immunisierung mit IMVAMUNE verfolgen zu können, wurden die Antikörpertiter der Tiere nach Immunisierung und Infektion mittels ELISA gegen das *Calpox Virus* bestimmt (Tabelle 7). 3 von 7 Tieren mit 4 Wochen Wartezeit bis zur Infektion zeigten am Tag der Booster-Immunisierung einen Titer von 1:100 bzw. 1:200, 28 Tage nach der Booster-Immunisierung bzw. am Tag der Infektion zeigten alle einen Titer zwischen 1:100-1:400. 14 Tage nach der Infektion hatten 4 von 7 Tieren einen erhöhten Titer zwischen 1:400-1:3.200, 1 Tier hatte einen stark erhöhten Titer von 1:25.600 und die 2 überlebenden Tiere einen gleichbleibend schwachen Titer wie am Tag der Infektion von 1:200.

In der zweiten Immunisierungsgruppe mit 10 Wochen Wartezeit bis zur Infektion zeigten 6 von 7 Tieren am Tag der Booster-Immunisierung keine Antikörpertiter. Das Tier, das bereits zu diesem Zeitpunkt einen auffällig hohen Wert von 1:3.200 zeigte,

wurde im Folgenden von der Auswertung ausgenommen, da bei ihm möglicherweise bereits vor Versuchsbeginn Antikörper gegen OPV vorhanden waren. 28 Tage nach der Booster-Immunsierung hatten 4 der 6 betrachteten Tiere einen ähnlich niedrigen Titer wie die Tiere der ersten Immunsierungsgruppe von 1:100-1:200 entwickelt, der am Tag der Infektion nur noch bei 1 Tier nachgewiesen werden konnte. 14 Tage nach der Infektion hatten 5 der 7 Tiere einen Titer von 400-800 entwickelt, während die 2 übrigen Tiere bis zu diesem Zeitpunkt bereits eingeschlüpfert werden mussten. Die 3 Tiere, die länger als 14 Tage nach der Infektion überlebt haben, zeigten finale Titer von 1:1.600 bzw. 1:25.600.

**Tabelle 7:** Bestimmung des Anti-Calpox-spezifischen IgG-Titers im ELISA nach Immunsierung mit IMVAMUNE und Infektion [1/x]

	Booster-Im.	28 p.im.	Infektion	14 p.i.	17 p.i.	Exp.Ende
Kontrolle I	-	-	0	(+)	-	-
Kontrolle II	-	-	0	(+)	-	-
Kontrolle III	-	-	0	(+)	-	-
Kontrolle IV	-	-	-	(+)	-	-
IMVAMUNE 4 Wo I	0	100	100	3.200	25.600	1.600 (+)
IMVAMUNE 4 Wo II	200	200	200	200	800	800
IMVAMUNE 4 Wo III	0	100	100	3.200 (+)	-	-
IMVAMUNE 4 Wo IV	200	200	200	200	400	400
IMVAMUNE 4 Wo V	0	400	400	25.600 (+)	-	-
IMVAMUNE 4 Wo VI	100	200	200	400 (+)	-	-
IMVAMUNE 4 Wo VII	0	200	200	3.200	12.800	3.200 (+)
IMVAMUNE 10 Wo I	0	100	0	400	1.600 (+)	-
IMVAMUNE 10 Wo III	0	100	0	800	9.600	25.600 (+)
IMVAMUNE 10 Wo III	0	200	100	800	25.600	(+)
IMVAMUNE 10 Wo IV	0	200	0	800	-	(+)
IMVAMUNE 10 Wo V	3.200	3.200	800	(+)	-	-
IMVAMUNE 10 Wo VI	0	0	0	400 (+)	-	-
IMVAMUNE 10 Wo VII	0	0	0	(+)	-	-

0 = keine IgG nachweisbar; - = keine Serumprobe verfügbar; tote Tiere sind durch ein Kreuz markiert, Im.= Immunsierung, p.im.= post Immunsierung, p.i.= post Infektion, Exp.Ende = finale Titer zwischen Tag 21 und 35 p.i.

Im Vergleich dazu hatten die VV LE-BN-immunisierten Tiere 28 Tage nach der Immunsierung und am Tag der Infektion deutlich höhere Titer als die MVA-immunisierten Tiere (Tabelle 8). Während 4 von 6 Kontrolltieren zum Todeszeitpunkt 14 Tage nach der Infektion keinen Titer und nur eines einen Titer von 1:100 entwickelt hatte, erreichten die immunisierten Tiere bereits Titer zwischen 1:400 und 1:102.400. Bis zum Ende des Experiments stiegen diese meist noch um einige Verdünnungsstufen.

**Tabelle 8:** Bestimmung des Anti-Calpox-spezifischen IgG-Titers im ELISA nach Immunisierung mit VV LE-BN und Infektion [1/x]

	Immunis.	28 p.im.	Infektion	14 p.i.	17 p.i.	Exp.Ende
Kontrolle I	-	-	-	0 (†)	-	-
Kontrolle II	-	-	-	0 (†)	-	-
Kontrolle III	-	-	-	0 (†)	-	-
Kontrolle IV	-	-	0	0 (†)	-	-
Kontrolle V	-	-	0	100	(†)	-
VV LE-BN 4 Wo I	0	800	800	102.400	-	409.600 (†)
VV LE-BN 4 Wo II	0	3.200	3.200	12.800	-	51.200 (†)
VV LE-BN 4 Wo III	0	0	0	1.600	-	12.800 (†)
VV LE-BN 4 Wo IV	0	400	400	400	-	25.600
VV LE-BN 10 Wo I	0	6.400	3.200	12.800	-	204.800
VV LE-BN 10 Wo II	0	3.200	3.200	51.200	-	51.200
VV LE-BN 10 Wo III	0	400	200	3.200	-	25.600
VV LE-BN 10 Wo IV	0	1.600	3.200	51.200	-	204.800

0 = keine IgG nachweisbar; - = keine Serumprobe verfügbar; tote Tiere sind durch ein Kreuz markiert, Im.= Immunisierung, p.im.= post Immunisierung, p.i.= post Infektion, Exp.Ende = finale Titer zwischen Tag 21 und 35 p.i.

Mittels Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test wurden die Plasmaproben auf neutralisierende Antikörper gegen das *Calpox Virus* untersucht. Bei den IMVAMUNE-immunisierten Tieren konnten am Tag der Infektion nur bei 5 der insgesamt 14 Tiere neutralisierende Antikörper nahe der Nachweisgrenze detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei den mit VV LE-BN immunisierten Tieren hingegen wurden am Tag der Infektion bei allen Tieren neutralisierende Antikörper nachgewiesen ([233], Kramski et al., in Vorbereitung).

Um weitere Rückschlüsse auf immunologischer Ebene auf den Effekt von IMVAMUNE ziehen zu können, wurde das Plasma von allen immunisierten Krallenaffen vom Tag der Infektion und vom letztmöglichen Zeitpunkt im Versuchsverlauf mit einem ELISA auf Reaktivität mit verschiedenen OPV-Proteinen untersucht. Dafür wurden 5 rekombinant hergestellte Proteine der inneren und der äußeren Membran verwendet, die bereits als protektive (A33, B5, L1, H3, A27) und neutralisierende Antikörper (B5, L1, H3, A27) auslösende Determinanten bekannt sind [128]. Zum Vergleich wurde auch das Plasma von mit *Vaccinia Virus Lister-Elstree*-immunisierten Weißbüschelaffen einer vorangegangenen Studie mitgetestet. Alle Messungen wurden auf eine Positivkontrolle normalisiert und der Cutoff mittels der Plasmaproben der Kontrolltiere berechnet.

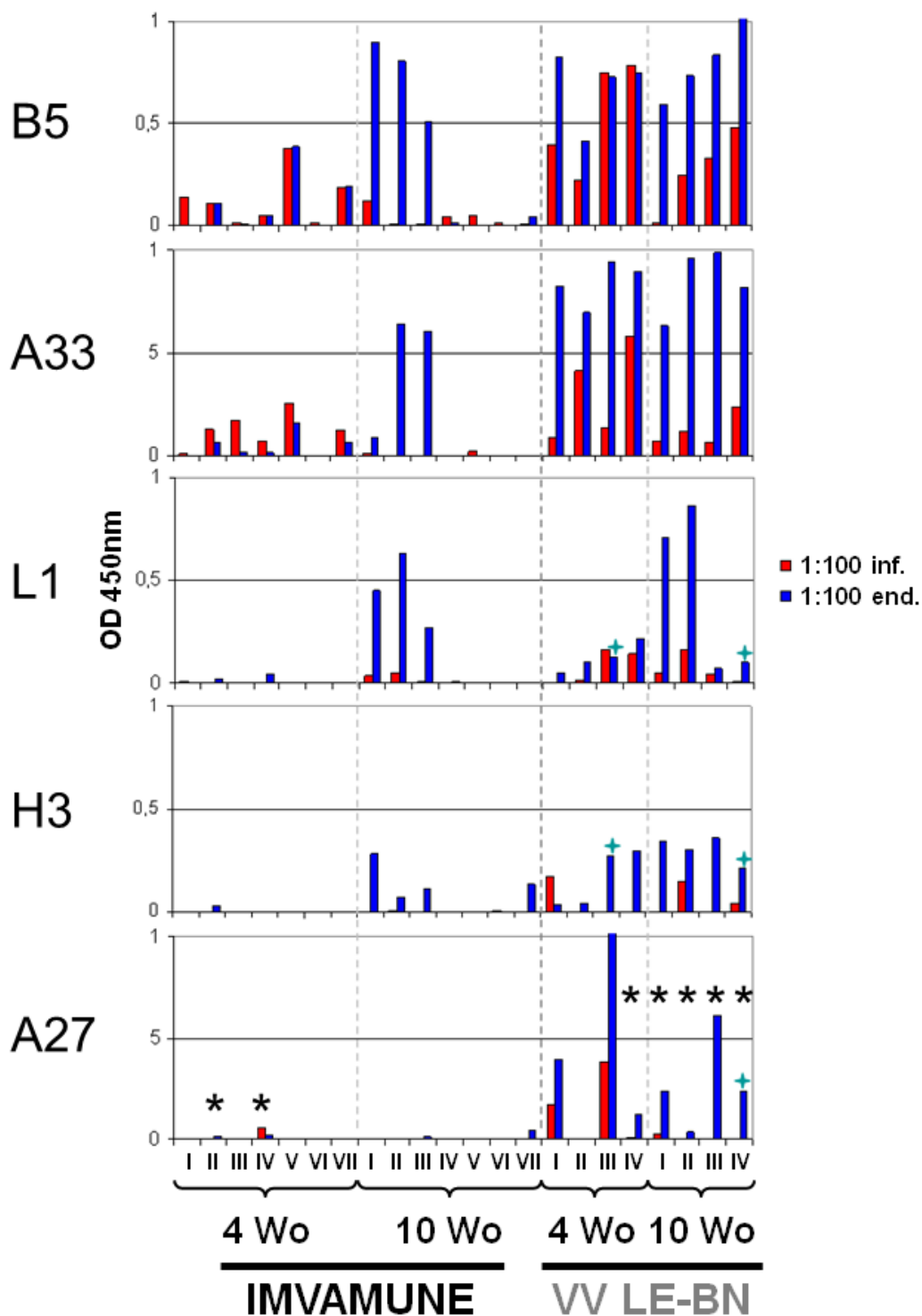
Wie die Abbildung 33 zeigt, verfügten von den IMVAMUNE-immunisierten Tieren 5 der 7 Tiere mit 4 Wochen Wartezeit bereits am Infektionstag über Antikörper gegen die EV-Proteine B5 und A33. Dabei zeigte sich durch die Infektion kein Booster-Effekt, da die Signale am Ende des Experiments gleich hoch oder niedriger ausfielen. Bei den Tieren mit 10 Wochen Wartezeit bis zur Immunisierung ergaben

---

sich am Tag der Infektion nur vereinzelt niedrige ODs gegen B5 und A33, jedoch am Ende des Experiments bei 3 der 7 Tiere höhere ODs.

Gegen die MV-Proteine L1, H3 und A27 konnten bei den Tieren mit 4 Wochen Wartezeit nahezu keine Antikörper nachgewiesen werden. Bei 3 der Tiere mit 10 Wochen Wartezeit ergaben sich zum Zeitpunkt der Infektion niedrige ODs gegen L1 und am Ende des Experiments höhere ODs gegen L1 und auch H3.

Im Gegensatz dazu waren bei deutlich mehr VV LE-BN-immunisierten Tieren Antikörper gegen EV- und MV-Proteine schon am Tag der Infektion nachweisbar und bei fast allen Tieren mit einem deutlichen Booster-Effekt am Ende des Experiments.



**Abbildung 33: Nachweis von Antikörpern in Seren von mit IMVAMUNE und VV LE-BN immunisierten Tieren gegen unterschiedliche virale Oberflächenproteine.** Abgebildet sind die im ELISA ermittelten OD-Werte von Plasma des Infektionstages (inf.) und des letztmöglichen Zeitpunkts (end.). Die Plasmaproben wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nur die mit einem grünen Stern markierten Signale wurden mangels Plasma aus einer 1:1.000 Verdünnung generiert. Alle Messungen wurden durch Division auf die Positivkontrolle (VIG 1:100 verdünnt) normalisiert. Der Cutoff wurde mittels der Kontrollplasma berechnet (MW + 3x STABW). Sterne markieren die überlebenden Tiere.

## 5 Diskussion

Nach einer rund 10 Jahre andauernden Impfkampagne durch die WHO wurde der Erreger der humanen Pocken, das *Variola Virus*, 1980 für ausgerottet erklärt [11]. Infolge dessen wurden die Pockenimpfungen weltweit sukzessive eingestellt [13], weshalb der Anteil der nicht-immunisierten Individuen an der Gesamtbevölkerung seitdem stetig wächst. Obwohl Restbestände des *Variola Virus* offiziell nur noch in Hochsicherheitslabors in den USA (CDC, Atlanta) und in Russland (Vektor, Novosibirsk) gelagert werden, wurde es wegen seiner hohen Letalität und schnellen Übertragung von Mensch zu Mensch in die Kategorie A der für bioterroristische Anschläge am ehesten geeigneten Agenzien eingestuft [22]. Ebenfalls auf dieser von den CDC erstellten Liste stehen das *Clostridium botulinum* Toxin, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, hämorrhagische Fieber auslösende Viren und *Bacillus anthracis*, mit dem bereits Anschläge auf Nachrichtensender und Senatoren in den USA im Jahr 2001 verübt wurden. Nach den Terroranschlägen 2001 wurden in den USA im Rahmen eines Präventionsprogramms über 1,2 Millionen Mitarbeiter des Gesundheitswesens und Militärangehörige mit *Vaccinia Virus* (Dryvax) gegen Pocken immunisiert [163]. Auf Grund der zwar seltenen, aber schweren Nebenwirkungen der Impfungen mit dem traditionell genutzten Impfstoff verweigerten jedoch viele die Immunisierung. Vorsorglich wurden außerdem 200 Millionen Impfdosen ACAM2000 eingelagert [168]. Auch die Bundesrepublik Deutschland ließ Impfdosen gegen den Pockenerreger einlagern und stellte vermehrt Forschungsgelder für die Gefahrenabwehr durch Bioterrorismus zur Verfügung.

Einige Verwandte des *Variola Virus*, wie die *Kuhpocken-* und *Affenpocken-* und *Vaccinia Viren*, sind als Zoonosen-Erreger bekannt und treten gelegentlich beim Menschen auf. Seit dem ersten identifizierten Affenpockenfall beim Menschen im Jahr 1970 wurde in West- und Zentralafrika eine Reihe von Zoonose-Fällen durch *Affenpockenviren* verzeichnet [32, 35-41]. Der erste *Affenpockenvirus*-Ausbruch außerhalb des afrikanischen Kontinents wurde 2003 in den USA durch infizierte Präriehunde ausgelöst, die sich offenbar an einer aus Ghana importierten Gambiaratte angesteckt hatten [43]. Mit einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen gefolgt von Fieber, Hautausschlag und der Entwicklung von Läsionen ähnelt das

klinische Bild der *Affenpockenvirus*-Infektion stark dem einer *Variola Virus*-Infektion, die Transmissionsrate und Mortalität sind jedoch weitaus geringer [33, 42]. Seit 1999 werden in Brasilien *Vaccinia Virus*-Infektionen vorwiegend bei Milchkühen und Menschen, aber auch bei Pferden beschrieben. Das Virus verursacht lokal umschriebene Hautläsionen, die aber nach einigen Wochen wieder abheilen [44, 47, 49, 50]. In Europa treten vereinzelt selbstlimitierende zoonotische Infektionen durch *Kuhpockenviren* auf. Die Übertragung des Virus auf den Menschen erfolgt zumeist durch Katzen oder als Haustiere gehaltene Ratten und führt ebenfalls zu lokalen Läsionen auf der Haut [58-67, 69, 70].

Diese Beispiele zeigen, dass auch nach der Eradikation der humanen Pocken weiterhin Risiken durch *Orthopockenviren*-vermittelte Zoonosen bestehen.

Selbst wenn die Wahrscheinlichkeit erneuter *Variola Virus*-Ausbrüche nach der Eradikationskampagne extrem gering ist, bleibt ein Restrisiko durch eventuell noch vorhandene, inoffizielle Virusvorräte bestehen. Würden diese in bioterroristischen Anschlägen eingesetzt werden, wären die Auswirkungen verheerend. Daher ist es nach wie vor sinnvoll, auf dem Gebiet der *Orthopockenviren* zu forschen und Vorbereitungen zu treffen, um im Fall einer kriminellen Freisetzung des *Variola Virus* entsprechende Maßnahmen in die Wege leiten zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Therapieansätze als auch Immunisierungsstrategien gegen *Orthopockenviren* im Tiermodell untersucht.

## **5.1 Generierung von OPV-spezifischen IgY**

Bis heute sind noch keine Therapeutika gegen *Orthopockenviren* zugelassen. Einige vielversprechende Substanzen wurden jedoch bereits in verschiedenen Tiermodellen gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen getestet, wie zum Beispiel Cidofovir, sein Derivat CMX001 [185, 201-205], ST-246 [185, 218] und *Vaccinia* Immunglobulin [198, 199]. Das ursprünglich gegen ein breites Spektrum von DNA-Viren entwickelte Nukleotidanalogen Cidofovir [210] wird seit 1996 bei AIDS-Patienten gegen eine CMV-vermittelte Retinitis eingesetzt [246], findet aber auf Grund nephrotoxischer Nebenwirkungen keine breitere Anwendung [214]. Durch Veresterung mit einer Alkoxyalkylgruppe wurde das lipophile Derivat CMX001 entwickelt, das im

Tiermodell eine geringere Toxizität aufweist und zudem oral verfügbar ist [185, 202, 215]. ST-246 wurde 2002 in einem high-throughput-Screening gegen *Orthopockenviren* in einer chemischen Bibliothek entdeckt [218]. Es inhibiert effizient die Virusausbreitung *in vitro* und *in vivo* und befindet sich bereits in der klinischen Prüfung [220]. Der Wirkmechanismus basiert darauf, durch Bindung an das OPV-Protein F13 die Bildung von extrazellulären Partikeln zu hemmen, und ist daher *Orthopockenvirus*-spezifisch [218]. Zellkulturversuche mit *Kuhpockenviren* haben gezeigt, dass die Behandlung von Vero-Zellen mit ST-246 durch Mutation einer einzigen Base in dem zum *Vaccinia Virus* homologen Gen F13L zur Bildung resistenter Virusvarianten führt [218]. Vaccinia Immunglobulin (VIG) ist eine isotone, sterile Lösung von Immunglobulinen, die von mit *Vaccinia Virus* immunisierten Personen durch Plasmapherese gewonnen wurde und demnach nur limitiert verfügbar ist. Die Herstellung von VIG ist kostenintensiv und wie bei allen Blutprodukten besteht die Gefahr der Krankheitsübertragung. In den 1960ern wurde es für die Behandlung von Impfkomplicationen eingesetzt [206, 207], allerdings wurden dazu keine kontrollierten klinischen Studien durchgeführt [206]. Dennoch ist VIG zur Zeit das einzige von der FDA zugelassene Produkt für die Behandlung schwerer Impfn Nebenwirkungen [209]. 2007 und 2009 traten infolge des Impfprogramms in den USA zwei schwere Fälle von Ekzema Vaccinatum bzw. progressiver Vaccinia auf, bei dem VIG, ST-246 und Cidofovir bzw. CMX001 in Kombination eingesetzt werden mussten, um eine Verbesserung des lebensbedrohlichen Zustands der Patienten zu erreichen [221, 222]. Aus Israel wurde eine ähnliche Impfkomplication im Jahr 2002 bekannt, bei der ebenfalls VIG zur Behandlung eingesetzt wurde. Der Patient überlebte, es blieben jedoch tiefe Narben im Gesicht und auf der Brust zurück [223]. Diese Fallbeispiele verdeutlichen den Engpass an nachweislich wirkungsvollen, verfügbaren Therapeutika gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen und unterstreichen die Notwendigkeit, weitere Therapiemöglichkeiten zu erforschen.

Eine alternative, beziehungsweise ergänzende Maßnahme könnte die Anwendung von OPV-spezifischen IgY von Hühnern darstellen, die dem IgG der Säugetiere entsprechen. IgY werden vom Serum des Muttertiers auf das Eidotter übertragen, aus dem sie kostengünstig und in großen Mengen isoliert werden können [224]. Gegenüber der traditionellen Methode zur Herstellung von Antikörpern, bei der meist Kaninchen verwendet werden, birgt die Immunisierung von Legehennen mehrere



Vorteile. Zum einen kann im Vergleich zu Kaninchen etwa das 5-15-fache an Antikörpern pro Monat isoliert werden und zum anderen findet die Gewinnung tierschutzgemäß auf nicht-invasivem Wege statt [225].

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Immunisierungsexperiment, in dem aktives Virus eingesetzt wurde, bereits nach drei Wochen OPV-spezifische IgY mit hohen Bindungstitern im Bereich von  $1:10^4$  -  $10^6$  generiert, die sich bis zum Ende des Experiments auf diesem Niveau hielten. Die Neutralisierungstiter entwickelten sich unabhängig von den Bindungstitern. Sie stiegen erst nach der zweiten Booster-Injektion nach ca. 11 Wochen auf eins zu mehreren Tausend an und fielen trotz weiterer Booster-Injektionen ab der 20. Woche wieder ab. Die voneinander unabhängigen Verläufe von Neutralisierungs- und Bindungstitern von IgY wurden in einer anderen Arbeit bereits beschrieben [237]. Während mit dem ELISA jeder Antikörper nachgewiesen wird, der an ein Virusantigen bindet, wird im Neutralisations-Test nur der Anteil von Antikörpern erfasst, der tatsächlich spezifisch die neutralisierenden Determinanten erkennt und die Bindung des Pathogens an die Zielzelle verhindert. Die Ausbreitung einer Infektion wird dadurch nicht nur in der Zellkultur, sondern analog dazu auch *in vivo* verhindert. Dementsprechend liegt bei der Produktion von Antikörpern zu Therapiezwecken und auch bei der Entwicklung von Impfstoffen der Fokus auf der Bildung neutralisierender Antikörper [128, 247].

Im zweiten Immunisierungsexperiment konnte gezeigt werden, dass auch mit inaktivierten *Orthopockenviren* hohe Bindungstitere von bis zu  $1:5 \times 10^5$  erzielt werden können. Sowohl die mit inaktiviertem als auch die mit aktivem Virus immunisierten Tiere entwickelten jedoch bei diesem Experiment etwas niedrigere Neutralisierungstiter mit Maxima von 1:320 (*Calpox Virus* aktiv), 1:640 (*Calpox Virus* inaktiviert) und 1:2560 (*Vaccinia Virus WR*). Vermutlich hätte aber eine längere Laufzeit, über die 17. Woche hinaus, ein ähnliches Ergebnis gebracht wie im ersten Experiment, in dem die höchsten Titer zwischen der 16. und 20. Woche gebildet wurden. In einer früheren Studie, in der erstmalig Hühner mit inaktivierten *Orthopockenviren* immunisiert wurden, entwickelten die mit *Vaccinia Virus Lister-Elstree* und *Calpox Virus* immunisierten Tiere ebenfalls hohe Bindungstitere, jedoch weitaus niedrigere Neutralisierungstiter von maximal 1:320. Auch in dieser Studie fielen die Neutralisierungstiter nach einiger Zeit trotz weiterer Booster-Injektionen wieder ab. Zudem konnten bei dem mit  $10^6$  inaktivierten PFU *Kuhpockenvirus*

immunisierten Tier keine spezifischen IgY detektiert werden. [237]. Die Autoren vermuten, dass die Antigenmenge nicht ausgereicht hat. Im Vergleich dazu reagierten die mit der gleichen, aber nicht inaktivierten Antigenmenge immunisierten Hühner in der vorliegenden Arbeit mit einer starken Immunantwort. Dies kann an der Reinheit der verwendeten Viruspräparationen (*Dr. Wälter, pers. Mitteilung*) oder ebenfalls an einer möglichen lokalen Replikation aktiver Viren an der Injektionsstelle liegen. Die mit aktivem Virus immunisierten Hühner zeigten allerdings keine offensichtlichen Anzeichen einer Infektion. Auch das Verhalten der Tiere und ihre Legeleistung, in der sich eine Unverträglichkeit des verwendeten Antigens widerspiegeln kann (*Prof. Schade, pers. Mitteilung, [225]*), waren zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt. Die Granulome und Schwellungen, die sich bei einigen mit aktivem Virus immunisierten Tieren infolge von Immunisierungen vorübergehend bildeten, sind vermutlich eher auf das verwendete Freund's Adjuvans [248, 249] oder Abweichungen bei der Antigenpräparation zurückzuführen. Durch Mischung der wässrigen Antigenlösung mit dem Adjuvans soll im Gewebe ein Depot entstehen, das die Freisetzung und den Abbau des Antigens verzögert. Voraussetzung ist die Herstellung einer stabilen Emulsion. Möglicherweise war diese bei den betreffenden Antigenpräparationen nicht in ausreichendem Maß gegeben.

In der Regel ist für die Immunisierung von Tieren eine größere Antigenmenge inaktivierter Viren vonnöten, als es bei der Verwendung aktiver Viren notwendig wäre, da letztere replikations- und damit vermehrungsfähig sind und zudem die Antigene in nativem Zustand vorliegen. Der Vorteil der Verwendung inaktivierter Viren liegt aber darin, dass die Tiere unter niedrigeren Sicherheitsbedingungen gehalten werden können und für jede Booster-Injektion die gleiche Präparation verwendet werden kann. Um aktives Virus verwenden zu können, muss jedoch für jede Immunisierung das Virus frisch angezogen werden, um auch die sehr fragilen extrazellulären Viruspartikel in der Präparation zu erhalten. Ein weiterer Vorteil ist prinzipiell die Vermeidung von Infektionen bei den Tieren und demzufolge auch bei den Tierpflegern.

Die Ergebnisse aus dem Western Blot und ELISA belegen nicht nur die hohe *Orthopockenvirus*-Spezifität der generierten Antikörper, sondern auch die für Anti-OPV-Antikörper bekannte Kreuzreaktivität gegen die anderen Virusspezies innerhalb des Genus OPV. Zudem zeigen die scheinbaren Dissoziationskonstanten, dass nicht

nur die mit aktiven, sondern auch die mit inaktivierten Viren immunisierten Tiere Antikörper mit hoher Affinität gegen membranständige EV-Proteine entwickeln. Nach Ergebnissen aus vorhergehenden Studien, die sich mit der Wirksamkeit von *Vaccinia Virus*-Totvakzinen beschäftigten, konnten mit inaktivierten Impfstoffen keine oder nur unzureichend Anti-EV-Antikörper produziert werden [194-196, 250], welche aber für einen vollständigen Immunstatus gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen erforderlich sind [188]. Allerdings lag im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit in diesen Studien der Fokus allgemein auf der Präparation von Virusantigenen und nicht spezifisch auf der Erhaltung der fragilen EV-Partikel. Extrazelluläre Partikel werden nur von intakten infizierten Zellen produziert und freigesetzt und sind sehr instabil. Bei einer standardmäßigen Virusanzucht in der Zellkultur machen den weitaus größten Anteil an Viruspartikeln die robusteren MV-Partikel aus den aufgeschlossenen Zellen aus [114, 251]. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurden in der vorliegenden Arbeit die infizierten Zellen nicht aufgebrochen, sondern es wurde nur der Zellkultur-Überstand verwendet. Die Menge an geernteten Viruspartikeln pro Zellkulturflasche ist folglich zwar viel geringer (wie sich zeigte um Faktor 10 bis 100), der Anteil an EV-Partikeln im Gegenzug jedoch höher. Die Qualität der Viruspräparationen, mit der ein komplettes Spektrum an Antikörpern induziert werden kann, wiegt also den größeren Aufwand auf, der sich aus der höheren Zahl an Zellkulturflaschen ergibt. Mit diesem Verfahren kann demzufolge auch mit inaktivierten Viren die Bildung von Anti-EV Antikörpern induziert werden, zumal offenbar die Inaktivierung durch  $\beta$ -Propiolacton nicht zur Denaturierung der Epitope der Oberflächenproteine führt. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung des Zellkultur-Überstands an Stelle des Zelllysats für die Immunisierung von Tieren begründet sich in der höheren Reinheit der Viruspräparationen, da weniger Wirtszell-Komponenten darin enthalten sind, gegen die prinzipiell auch Antikörper generiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Virusanzucht für die Immunisierung der Hühner jedoch auf CEF-Zellen durchgeführt, daher waren keine gegen die Wirtszellen gerichteten Antikörper zu erwarten.

Mit einem Screening gegen  $\lambda$ -Phagen-basierte *Orthopockenvirus*-Expressionsbibliotheken kann die Bindung von Antikörpern theoretisch an alle möglichen Antigene aus Pockenviren bestimmt werden. Das ist möglich, da im Idealfall die Expressionsbibliothek das gesamte Pockenvirusgenom abdeckt und

damit alle Virus-codierten Proteine exprimiert. Limitierungen ergeben sich jedoch durch den teilweisen DNA-Verdau bei der Erstellung der Bibliotheken [252] und durch die unterschiedliche Größe der offenen Leserahmen bzw. durch die gewählte Fragmentlänge der Expressionsbibliothek. Kürzere Fragmente eignen sich zwar eher zur gezielten Identifizierung einzelner antigener Virusproteindomänen, aber mit abnehmender Fragmentlänge steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass nur Proteinbruchstücke exprimiert werden, die nur noch lineare Epitope repräsentieren, während Strukturepitope verloren gehen. Je größer jedoch die exprimierten Proteinsequenzen sind, desto eher werden auch die antigenen Determinanten mit nativer, immunogener Struktur exponiert. Eine weitere Einschränkung dieses Systems stellt die fehlende posttranslationale Modifizierung der Proteine durch beispielsweise Glycosylierungen dar, da die rekombinanten Phagen in *E. coli*-Zellen vermehrt werden. Somit könnten zum einen selbst bei komplett translatierten Proteinen die Epitope denaturiert vorliegen und zum anderen können Antikörper gegen proteinassoziierte Lipid- und Polysaccharidantigene nicht identifiziert werden.

Zu den mit Hilfe der Expressionsbibliotheken in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzen gehören die bereits in der Literatur als Antigene identifizierten Proteine A25, A26 [241] A53 [238], A52 [244], E9 [238, 242], F13 [241, 243, 244], D8 [241-245], D6 [245] D5 [242, 243] und J6 [242]. Das Gen A25L codiert u.a. in *Kuhpockenviren*, *Ectromelie Viren* und *Waschbärpockenviren* für das A-type inclusion protein [253-257], das im Zytoplasma sogenannte A-type inclusions (ATI) formiert. In diese werden die MV-Partikel eingebettet, auf diese Weise wird ihre Infektiosität nach der Zellyse geschützt [258]. Das Gen A26L codiert für das Protein P4c, das maßgeblich an der Formierung der A-type inclusions beteiligt ist. Da diese allerdings nicht von allen OPV-Spezies ausgebildet werden, das Gen aber unter den Mitgliedern der *Orthopockenviren* hoch konserviert ist, wird vermutet, dass es noch andere Funktionen erfüllt [80]. A53R codiert für den löslichen, viralen Tumor necrosis factor receptor, der durch Bindung von TNF, einem pro-inflammatorischen und antiviralen Zytokin, immunevasorisch wirkt [259]. Das Produkt von A52R wirkt als intrazellulärer Toll-like-Rezeptor (TLR) und IL-1 Signalinhibitor ebenfalls immunevasorisch [260]. E9L codiert für die DNA-Polymerase, die 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt und die virale genetische Rekombination fördert [261]. F13L codiert für ein palmitoyliertes EV-Membranprotein, das maßgeblich für die

Bildung und Freisetzung von extrazellulären Partikeln verantwortlich gemacht wird [262, 263], D8L für ein MV-Membranprotein mit Carboanhydraseaktivität [264] und D6R für die kleine Untereinheit des frühen Transkriptionsfaktors VETF [265]. D5R codiert für eine NTPase, die essentiell für die Replikation ist [266], und J6R codiert für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase [267]. Die Identifizierung dieser bereits als immunogen bekannten Sequenzen belegt die Funktionalität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode und damit auch die Validität der Ergebnisse. Offensichtlich kann mit dem gewählten Ansatz in Hühnern ein breites Spektrum von IgY-Antikörpern induziert werden.

Erstmals als mögliche Antigene identifizierte Sequenzen sind die in dieser Arbeit ermittelten Fragmente von D7R, die für die kleine Untereinheit rpo18 der RNA-Polymerase codiert [268], D9R, die mit der Funktion einer mutT-NTP-Phosphohydrolase an der DNA-Reparatur beteiligt ist [269], und schließlich noch die Sequenzen zweier hypothetischer Proteine unbekannter Funktion (Gen BR-063 und BR-064).

Da in allen viralen Genomfragmenten, die mit Hilfe der beiden Bibliotheken als immunogen ermittelt wurden, mehrere OPV-Gene enthalten waren, ließen sich zwar die immunogenen Proteinsequenzen nicht eindeutig identifizieren, zumindest aber liefern die Ergebnisse den Hinweis auf ein potentiell immunogenes Protein. Um diese zu präzisieren, könnten die betreffenden Proteinsequenzen zur Immunisierung von Tieren genutzt und die Seren nachfolgend *in vitro* mit Bindungs- und Neutralisations-Assays getestet werden. In einem weiteren Schritt könnte der Schutz durch die Immunisierung mit rekombinant hergestellten Proteinen vor einer Infektion mit *Orthopockenviren* getestet werden.

Die Ergebnisse der Charakterisierungen zeigen, dass durch die Immunisierung von Legehennen mit aktiven bzw. inaktivierten *Orthopockenviren* quantitativ und auch qualitativ hochwertige IgY generiert werden konnten. Um das Potential dieser Antikörper auszuschöpfen, wurde in weiteren Experimenten ihre Wirksamkeit *in vivo* getestet.

## 5.2 Entwicklung einer Immuntherapie gegen Orthopockenviren

Getestet wurde die Wirksamkeit der OPV-spezifischen IgY in einem *Vaccinia Virus*/Mausmodell, in dem die natürliche Infektionsroute durch eine Infektion über die Atemwege imitiert wird. Zunächst wurden mehrfache intranasale Behandlungen gegen zwei verschiedene Infektionsdosen evaluiert.

Bei Applikation der niedrigeren Dosis von  $10^4$  PFU und Behandlung mit IgY bzw. VIG ab 6h vor der Infektion konnte ein deutlicher Behandlungseffekt gegen die Belastungsinfektion beobachtet werden. Dabei war die Gabe von IgY ab 6h vor der Infektion am effektivsten. In dieser Gruppe erkrankten zwei Tiere offensichtlich gar nicht. Die abschließende Untersuchung des Serums dieser beiden Tiere zeigte, dass keines der beiden Anti-VV WR IgG gebildet hatte. Somit konnte sogar eine lokale Virusreplikation ausgeschlossen werden. Die durchschnittlichen Symptom- und Gewichtsverläufe der einzelnen Gruppen belegen eine bessere Virusneutralisationsfähigkeit durch die Behandlung mit IgY als durch VIG. In Abschnitt 5.1 wurde infolge der *in vitro*-Charakterisierungen die hohe Qualität der OPV-spezifischen IgY diskutiert, die sich konsequent nun auch *in vivo* äußert. Außerdem ist der Behandlungseffekt mit rein therapeutischen Gaben schwächer als mit einer Kombination aus Therapie und Prophylaxe.

Im Gegensatz dazu war bei Applikation der höheren Dosis von  $10^6$  PFU und Behandlung mit IgY bzw. VIG ab 6h vor der Infektion nur ein wenig verzögertes Auftreten der Symptome gegenüber der nicht behandelten Kontrolle zu verzeichnen. Davon abgesehen verlief die Krankheit bei den Behandlungs- wie bei den Kontrollgruppen gleich progressiv. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit unterschiedlichen Virusdosen legen nahe, dass die Wirksamkeit der IgY vom Verhältnis der Antikörpermenge zur Virusdosis abhängt.

In einem nächsten Versuch wurde überprüft, ob der gleiche Behandlungseffekt mit einer nur einmaligen IgY-Applikation vor bzw. nach der Infektion erzielt werden kann. Bei der prophylaktisch behandelten Gruppe verlief die Krankheit zwar deutlich milder im Vergleich zur therapeutisch behandelten und zur Kontrollgruppe, dennoch war der Behandlungseffekt viel schwächer als in dem Versuch mit drei zusätzlichen therapeutischen IgY-Gaben. Die Wirksamkeit von antikörperbasierten Behandlungen über die Atemwege wurde bereits in einer 2010 veröffentlichten Studie von Nguyen

et al. beschrieben, in der IgY zur Behandlung von systemischen Influenza-Infektionen bei Mäusen getestet wurden. Nach intranasaler Applikation der spezifischen Antikörper waren die Tiere vor einer Infektion mit Influenzastämmen gleichen HA-Typs geschützt [270].

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der intranasalen Behandlung zusätzlich ein alternativer Behandlungsweg über das Peritoneum bei einer Infektion mit  $10^6$  PFU geprüft, der keine Wirkung nach sich zog (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der Seren ergab, dass 24h nach der intraperitonealen Behandlung nur ca. 2% der applizierten IgY im Blut vorhanden waren, während bei den mit VIG behandelten Tieren zur gleichen Zeit über 90% der ursprünglich applizierten Antikörpermenge nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich ableiten, dass im Vergleich zu VIG entweder weit weniger IgY vom Peritoneum in den Blutstrom übergehen oder aber ihre Halbwertszeit im Blut viel kürzer ist. In der bereits angeführten Studie von Nguyen et al. ist ebenfalls die Wirkung alternativer Applikationswege erwähnt. Laut den Autoren wurden initial die orale und die intraperitoneale Route für die Behandlung der Influenza-Infektion geprüft und obwohl sich IgY infolge beider Applikationswege im Serum nachweisen ließen, blieb ein Behandlungserfolg aus [270]. Über den prozentualen Anteil der IgY im Serum gegenüber der ursprünglich applizierten Menge wird jedoch keine Angabe gemacht.

Prinzipiell belegen zahlreiche seit den 1980er Jahren veröffentlichte Studien die Anwendungsmöglichkeit von IgY über verschiedene Applikationswege. Bestätigt wurde ihre Wirksamkeit beispielsweise im Einsatz gegen verschiedene gastrointestinale bakterielle und virale Infektionen bei Mensch und Tier durch *Rota-* und *Coronaviren*, *enterotoxische E. coli*, *Salmonella spp.*, *Helicobacter pylori*, sowie bei Menschen mit cystischer Fibrose gegen den Pneumonie-Auslöser *Pseudomonas aeruginosa*. Bei all diesen erfolgte die IgY-Applikation auf oralem Weg [271-283]. Damit nahmen die Antikörper denselben Weg wie die jeweiligen Krankheitserreger, wodurch sichergestellt wird, dass die IgY möglichst nah an den Infektionsherd gelangen. Die gleiche Sachlage ergibt sich bei Anwendungen, die per Injektion durchgeführt wurden: Bei Milchkühen wurden IgY gegen eine *Staphylococcus aureus* bedingte Mastitis direkt in den Euter injiziert, was sogar eine bessere Heilungsrate zur Folge hatte als eine Penicillininjektion [284]. Bei Versuchen an Mäusen wurden

intraperitoneale IgY-Injektionen gegen diverse Schlangen- und Skorpiongifte und Toxine durchgeführt, wobei auch die Intoxikation intraperitoneal erfolgte [285-289].

Um systemische *Orthopockenvirus*-Infektionen mit IgY zu behandeln, die wie Influenzaviren über die Atemwege übertragen werden, ist demnach die Gabe der Antikörper ebenfalls über die Atemwege am erfolgversprechendsten. Somit kann eine ungünstige Pharmakokinetik, wie sie sich aus der intraperitonealen Behandlung ergibt, umgangen werden. Außerdem stellt die intranasale Behandlung eine unbedenklichere und anwendungsbezogenere Alternative zu allen anderen genannten Applikationswegen dar. Sie ist obendrein gut vom Mausmodell auf das humane System übertragbar.

Die intranasale Applikation von neutralisierenden IgY 6h vor der Infektion scheint die Infektion, die sich zunächst in der Lunge etabliert, abhängig von der Virusdosis abzuschwächen oder möglicherweise sogar zu verhindern. Es ist zwar nicht exakt geklärt, wie sich das *Vaccinia Virus WR* in diesem Modell weiterhin im Organismus ausbreitet, jedoch belegen frühere Studien eine Neurovirulenz dieses Stammes. Vermutlich ist die Ausbreitung auf das ZNS hämatogen bedingt, da sie einer frühen Virämie folgt. Möglicherweise erfolgt die ZNS-Infektion aber auch direkt über die nasale Mucosa und die Siebplatte [114, 290], einen der Schädelknochen, durch den sich Nervenfasern zum Gehirn bzw. zur Nasenhöhle ziehen. Eine neuere Veröffentlichung zeigt jedoch, dass die Gewichtsabnahme der Tiere nicht mit der Virusreplikation im Gehirn sondern mit der in der Lunge korreliert [198]. Entsprechend zeigen unsere Ergebnisse eine hohe Viruslast im Lungengewebe aller Tiere, die der Infektion unterlagen, und nur in geringeren Mengen in Milz und Leber. Interessanterweise konnte für *Vaccinia Viren* gezeigt werden, dass sie humane Lungenepithelzellen effizienter über die basolaterale Membran infizieren, während die Freisetzung vorwiegend durch die apikale Membran, also nach „außen“, stattfindet. Im Organismus könnte dieser Umstand möglicherweise die Infektion des Lungenepithels nach der Virusreplikation im Lymphsystem und der darauf folgenden zweiten Virämie erleichtern [291]. Es stellt sich zwar die Frage, ob das Infektionsverhalten von humanen auf murine Epithelzellen übertragbar ist, zumindest aber lässt die Wirksamkeit von mehrmaligen Behandlungen ab 6h nach der Infektion - im Gegensatz zu nur einer einzigen Behandlung - auf eine verminderte Freisetzung der Viren und damit limitierte Virusverbreitung in der Lunge der Tiere schließen.



Die vorliegende Arbeit zeigt, dass IgY präventiv und therapeutisch gegen eine *Orthopockenvirus*-Infektion in den Atemwegen einsetzbar sind. Möglich wäre die praktische Umsetzung mit Hilfe einer zu gurgelnden Lösung [282] oder auch mittels eines Sprays, wie es bereits für eine Influenza-Vakzine genutzt wird; seit 2003 existiert der Impfstoff FluMist® auf dem US-amerikanischen Markt, der in Form eines Nasensprays angewendet wird [292]. Da die attenuierten Influenza-Viren auf der Allantoismembran von bebrüteten Hühnereiern angezogen werden, besteht auch dort das Basisrisiko, allergisch auf Bestandteile von Eiern zu reagieren, was der Zulassung des Impfstoffs offenkundig nicht im Wege stand. Damit ist auch eine Zulassung von IgY für die Therapie oder Prophylaxe von *Orthopockenvirus*-Infektionen über eine derartige Route denkbar. Bei Viren, die wie das *Variola Virus* initial in den Schleimhäuten der Atemwege replizieren, ist diese Art der Antikörperanwendung vermutlich die vielversprechendste Möglichkeit, um der Infektion bereits in einem frühen Stadium entgegenwirken oder sogar vorbeugen zu können. Dies wäre bei einer *Variola Virus*-Freisetzung für alle Personen besonders wichtig, die auf Grund von Immundefizienzen nicht geimpft werden könnten oder aber in Risikobereichen arbeiten und der Erhaltung des öffentlichen Lebens dienen. Im Ernstfall könnte bei ihnen durch den Einsatz von IgY das Ansteckungsrisiko minimiert werden und zumindest bei zweiteren der Zeitraum bis zur Gewährleistung eines Impfschutzes überbrückt werden.

Eine zweite Applikationsform könnte eine IgY-versetzte Creme für die lokale Behandlung von Pockenläsionen darstellen. In einer Fallstudie wurde bei einer immundefizienten Patientin mit einer Pockenläsion am Finger der erfolgreiche Einsatz von Cidofovir-Salbe zur Eindämmung der Infektion beschrieben [293]. Die Anwendung einer IgY-Creme ist eine günstige und unbedenkliche Alternative. Sie könnte ebenso zur Behandlung von Hautläsionen genutzt werden, die durch zoonotische Pockenviren verursacht werden, wie auch zur Behandlung von *Variola Virus*-bedingten Läsionen auf der Haut und der Mucosa.

### 5.3 Immunisierungsstudie mit *IMVAMUNE*

Im Zuge der Eradikationskampagne gegen die Pocken kamen verschiedene *Vaccinia Virus*-Stämme zum Einsatz [162]. Vakziniert wurde mit einer zweizackigen Impfnadel, mit der mehrmals in die Haut am Oberarm gestochen wurde. Die übliche Reaktion war die Entwicklung einer lokalen Pockenpustel, die nach 2-3 Wochen abheilte und als Merkmal für eine erfolgreiche Immunisierung galt [117]. Typische Nebenwirkungen waren bei 50% der Geimpften Kopfschmerzen und, seltener, Fieber [294]. Traditionell wurden Impfstoffe der ersten Generation verwendet, die aus der Lymphe dermal infizierter Tiere und durch Passagierung auf Tierhäuten gewonnen wurden. In den Präventionsprogrammen neuerer Zeit wurden sie durch die steril in Zellkulturen hergestellte zweite Generation ersetzt, um Impfkomplicationen durch mögliche Kontaminationen vorzubeugen. In einigen Fällen kam es jedoch zu schweren Impfkomplicationen wie postvaccinaler Enzephalitis, Ekzema vaccinatum und progressive und generalisierte Vaccinia, teils mit tödlichem Ausgang [160-162, 295]. Vor allem Ekzema vaccinatum und progressive Vaccinia sind mit Vorerkrankungen wie einer Neurodermitis bzw. Immundefizienz assoziiert. Schätzungen zufolge wäre eine Immunisierung mit diesen Impfstoffen heute bei 25% der Bevölkerung kontraindiziert. Dazu gehören Individuen mit Hautkrankheiten, Allergien gegen Impfstoffkomponenten, Herzerkrankungen, Immundefizienzen oder -suppressionen, Kleinkinder bis 12 Monate und Schwangere [296].

Eine Alternative wäre für diese Gruppen ein Impfstoff der dritten Generation, die Vakzinuntereinheiten und attenuierte Stämme wie das *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) umfasst. Das MVA wurde erst gegen Ende der WHO-Kampagne zur Pockeneradikation bei ca. 120.000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzt [175]. Während seine Verträglichkeit gut zu sein scheint, konnte seine Wirksamkeit im Menschen auf Grund der inzwischen erfolgreichen Eradikation der Pocken nicht mehr belegt werden. Ursprünglich wurde dieser Stamm aus einer Pockenläsion eines Pferdes isoliert und durch multiple Passagen auf hühnerembryonalen Fibroblasten attenuiert [297]. Die Folge dessen sind eine Reihe von Deletionen, die ca. 15% des Gesamtgenoms ausmachen, und der daraus resultierende Verlust der Replikationsfähigkeit in den meisten Säugetierzellen [298]. Vom MVA abgeleitet ist der weiterentwickelte Impfstoff *IMVAMUNE*, der als

Einzelklon nach weiteren Passagen auf CEF gewonnen wurde. Für die Zulassung neuer Arzneimittel müssen nach dem Arzneimittelgesetz die Unbedenklichkeit, Wirksamkeit und pharmazeutische Qualität nachgewiesen werden. Die Unbedenklichkeit von IMVAMUNE wurde bereits in klinischen Prüfungen der Phase I und II bestätigt [173, 174]. Da die Prüfung auf Wirksamkeit jedoch aus ethischen Gründen nicht im Menschen erfolgen kann, wird sie in Tiermodellen getestet und auf den Menschen extrapoliert. Dafür werden Tiermodelle benötigt, die das Krankheitsgeschehen beim Menschen möglichst genau imitieren. Für Pockenviren existieren diverse Nagetiermodelle mit Mäusen, Kaninchen, Zieseln und Präriehunden, einige Primatenmodelle mit Makaken und ein Modell mit Marmosetten [230, 231]. Jedes Tiermodell birgt spezielle Vor- und Nachteile und keines kann den Infektionsweg sowie den Krankheitsverlauf beim Menschen exakt widerspiegeln. Bisher wurde die Wirkung von IMVAMUNE bei Mäusen, Kaninchen und auch in einem Makakenmodell beschrieben [183-186]. In dem verwendeten Makakenmodell ist die Infektion mit einer hohen Dosis von  $10^6 - 10^7$  PFU *Affenpockenvirus* erforderlich, um eine Erkrankung der Tiere auszulösen. Das kürzlich etablierte Marmosettenmodell hingegen hat eine  $MID_{50}$  von  $8,3 \times 10^2$  PFU *Calpox Virus*, was einer natürlichen *Variola Virus*-Infektion näher kommt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit von IMVAMUNE in diesem Modell getestet.

Jeweils 7 Weißbüschelaffen pro Gruppe wurden zweimal mit  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> im Abstand von 4 Wochen intramuskulär immunisiert und nach 4 bzw. 10 Wochen mit einer letalen Dosis *Calpox Virus* intranasal infiziert. 4 nicht immunisierte Tiere dienten als Kontrolle. Die Zeitspannen zwischen Immunisierung und Infektion wurden aus einer bereits durchgeführten Immunisierungsstudie mit VV LE-BN abgeleitet ([233], Kramski et al., in Vorbereitung). Es wurden zwei unabhängige Experimente unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt und die Ergebnisse zusammen analysiert.

Wie auch in vorigen Studien bereits beobachtet, zeigten die Tiere auf die intramuskuläre Injektion von IMVAMUNE keine lokale Reaktion, wie sie für die Impfstoffe der ersten und zweiten Generation üblich war [181, 299]. Zudem konnte zu keinem Zeitpunkt IMVAMUNE-DNA im Blut der immunisierten Tiere nachgewiesen werden. Beides deutet auf die Replikationsinkompetenz des Impfstoffs auch in Krallenaffen hin. Die Deletionen im IMVAMUNE-Genom betreffen

sechs dezentrale Bereiche, in denen host range-Faktoren und Immunmodulatoren codiert sind. Ihr Fehlen ist offenbar Ursache der verbesserten Sicherheit von IMVAMUNE als Impfstoff [298, 300].

Während alle 4 Kontrolltiere 12 bzw. 13 Tage nach der Infektion auf Grund des Krankheitsverlaufs eingeschläfert werden mussten, mussten 12 der 14 immunisierten Tiere leicht verzögert zwischen 13 und 23 Tagen nach der Infektion getötet werden. Bei 8 der insgesamt 14 immunisierten Tiere waren *Calpox Virus* Genomäquivalente und mRNA wie bei den Kontrolltieren bereits 7 Tage nach der Infektion im Blut nachweisbar und bei jeweils 2 immunisierten Tieren mit 4 bzw. 10 Wochen Wartezeit etwas verzögert an den Tagen 10 und 14 p.i.. Nur 2 der immunisierten Tiere überlebten ohne jegliche Entwicklung von Symptomen bis zum Ende des Experiments. Entsprechend konnten bei diesen beiden Tieren zu keinem Zeitpunkt *Calpox Virus*-Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Es ist auf Grund der in dem Modell möglichen Probennahme-Intervalle allerdings nicht auszuschließen, dass bei den beiden Tieren zwischenzeitlich eine kurze Virämie aufgetreten ist, die zu den überprüften Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar war. Im Vergleich dazu mussten bei der zuvor durchgeführten Immunisierungsstudie mit VV LE-BN nur 3 von 4 immunisierten Tieren mit vierwöchiger Wartezeit zwischen Impfung und Belastungsinfektion 1-3 Wochen später als die Kontrolltiere eingeschläfert werden. Alle übrigen Tiere (4 mit 10 Wochen Wartezeit und 1 von 4 Tieren mit 4 Wochen Wartezeit) haben die Infektion ebenfalls überlebt, ohne dass Symptome aufgetreten wären. Jedoch schien nur 1 dieser 5 Tiere eine sterile Immunität zu entwickeln ([233], Kramski et al., in Vorbereitung). Eine neuere Studie in einem Kaninchenmodell zeigt zwar, dass IMVAMUNE gegen *Kaninchenpockenviren* hochgradig potent ist und nach experimenteller Infektion keine Belastungsvirus-DNA nachweisbar ist [183], bei Untersuchungen an nicht-humanen Primaten wurde jedoch die signifikante Reduzierung der Viruslast bis hin zur Entwicklung von sterilen Immunitäten bisher nur nach Immunisierung mit Dryvax und einer vierfach DNA-Vakzine gegen *Affenpockenviren* beschrieben [181, 193], nicht aber für IMVAMUNE oder eine IMVAMUNE-Vorläufervakzine [181, 182, 184]. Daher ist nicht auszuschließen, dass bei den beiden IMVAMUNE-immunisierten, überlebenden Tieren aus unbekanntem Gründen die Infektion fehlgeschlagen ist.

Auf Grund der geringen Körpergröße der Krallenaffen kann nur ein geringes Blutvolumen für die Analysen abgenommen werden. Deshalb konnten die Blutproben

nicht auch noch auf infektiöse Partikel untersucht werden. Bei einer produktiven Infektion durch *Orthopockenviren* wird ein großer Anteil an defekten Partikeln gebildet. In der Zellkultur beträgt das Verhältnis von mittels Real Time-PCR messbaren Genomäquivalenten zu infektiösen Partikeln ca. 100:1 [301]. Entsprechend ist davon auszugehen, dass im Blut erkrankter Tiere etwa um den Faktor 100 weniger infektiöse Partikel als virale DNA vorhanden sind. Am Tag 7 p.i. müssten also auf Grund der gemessenen Genomäquivalente bei den erkrankten, IMVAMUNE-immunisierten Tieren und bei den Kontrolltieren bis zu  $10^2$  PFU/ml Blut vorhanden sein. Da im weiteren Krankheitsverlauf bis zur Euthanasierung der Tiere ansteigende Zahlen von Genomäquivalenten von bis zu  $10^9$  GE/ml messbar waren, wäre dementsprechend die Anzahl infektiöser Einheiten auf einem Niveau zwischen  $10^5$  und  $10^7$  PFU/ml Blut zu erwarten.

Die Untersuchung der Rachenabstriche einer Reihe von infizierten Krallenaffen zeigte infektiöse Viren. Das weist darauf hin, dass erkrankte Tiere die Infektion über den Speichel übertragen können. Ob bei den beiden überlebenden Tieren eine vorübergehende produktive Infektion in den Atemwegen stattgefunden hat, konnte wegen der zu geringen Probenanzahl an Rachenabstrichen nicht abschließend geklärt werden.

Die Antikörpertiter infolge der Immunisierung wurden gegen das *Calpox Virus* bestimmt. 28 Tage nach der Booster-Immunisierung mit IMVAMUNE konnten nur bei 11 Tieren niedrige Titer zwischen 100-400 gemessen werden und am Tag der Infektion nur noch bei 8 Tieren. Ein Vergleich mit den Plasmaproben der zuvor durchgeführten Immunisierungsstudie mit VV LE-BN zeigt bei 7 von 8 Tieren 28 Tage nach der Immunisierung höhere Titer zwischen 400 und 6400, die sich bei allen Tieren bis zum Tag der Infektion etwa auf diesem Niveau hielten. Offenbar werden durch Impfung mit IMVAMUNE in weitaus geringerem Maße Antikörper gegen das *Calpox Virus* gebildet als mit VV LE-BN. Auch der Booster-Effekt infolge der Infektion ist bei den VV LE-BN-immunisierten Tieren deutlich stärker als bei den IMVAMUNE-immunisierten Tieren. Während die Studie mit VV LE-BN einen besseren Schutz nach zehn- als nach vierwöchiger Wartezeit zwischen Immunisierung und Belastungsinfektion belegt, ist dieser Effekt bei den IMVAMUNE-immunisierten Tieren nicht festzustellen.

Es stellt sich die Frage, ob die geringe Schutzwirkung infolge der Immunisierung mit IMVAMUNE den niedrigen Antikörpertitern geschuldet ist, oder ob für einen

ausreichenden Schutz eine zelluläre Komponente ausschlaggebend ist, die bei den Tieren durch IMVAMUNE in nicht ausreichendem Maß ausgelöst wurde. Einige Studien weisen darauf hin, dass der Schutzmechanismus einer Immunisierung mit *Vaccinia Viren* eher auf der Entwicklung der humoralen als der zellulären Immunantwort zu beruhen scheint [135, 302]. Belyakov et al. konnten zeigen, dass weder CD4 noch CD8 Effektorzellen notwendig oder ausreichend sind, um immunisierte Mäuse gegen eine *Vaccinia Virus*-Infektion zu schützen. Versuche in B-Zell-defizienten Tieren weisen darauf hin, dass die T-Zell-Antwort Zeit braucht, um reaktiviert zu werden, und sich somit ihre Aktivität erst in der späteren Phase der Erkrankung bemerkbar macht. Durch passive oder aktive Immunisierung präexistierende Antikörper aber verhinderten Morbidität und Mortalität in den Tieren. Die Rolle der CD4-positiven T-Helferzellen als Induktoren der B-Zellen wurde dabei allerdings nicht untersucht [135]. Zu der gleichen Schlussfolgerung kommt die Gruppe um Edghill-Smith et al. nach Vakzinierungsstudien in einem Makaken/*Affenpockenvirus*-Modell. Während eine Antikörper-vermittelte CD4+ bzw. CD8+ T-Zell-Depletion keine Auswirkung auf den Schutz durch Dryvax hatte, hob eine B-Zell-Depletion die Immunisierungswirkung auf. Außerdem konnte bei naiven Tieren eine protektive Wirkung durch passive Immunisierung mit gegen *Vaccinia Viren* gerichteten, neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden [136]. Auch der Einsatz von VIG beim Menschen zur Behandlung von Impfkomplikationen beruhte allein auf dem Wirkprinzip von Antikörpern gegen eine Infektion [303]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen somit die These, dass für eine protektive Immunisierung die humorale Immunantwort ausschlaggebend ist.

Bei allen mit IMVAMUNE und VV LE-BN immunisierten und anschließend einer Belastungsinfektion mit *Calpox Virus* ausgesetzten Tieren ist bis zum Ende des Experiments ein eklatanter Anstieg des Antikörpertiters messbar - mit Ausnahme der beiden nicht erkrankten, IMVAMUNE-immunisierten Tiere. Es ist daher fraglich, ob bei den beiden überlebenden Tieren überhaupt eine Infektion stattgefunden hat, oder ob sie durch die Immunisierung unterdrückt wurde. Inzwischen wurden im Rahmen des Aufbaus dieses Infektionsmodells und verschiedener nachfolgender Studien zahlreichen Tieren die 10x MID<sub>50</sub> *Calpox Virus* intranasal verabreicht. Auf diese Weise wurden bisher alle inokulierten Tiere zuverlässig infiziert. Bei der Durchführung der Infektionen dieser beiden überlebenden Tiere am Deutschen

Primatenzentrum sind keine Unregelmäßigkeiten aufgefallen (*Dr. C. Stahl-Hennig, pers. Mitteilung*). Andererseits haben selbst die mit dem offensichtlich potenteren Impfstoff VV LE-BN immunisierten überlebenden Tiere aus der vorangegangenen Studie infolge der transienten Infektion hohe Antikörpertiter gebildet. Um statistisch abgesicherte Aussagen zum Zusammenhang zwischen der Bildung hoher Antikörpertiter und einer sterilen Immunität zu treffen, sind die Tierzahlen allerdings zu niedrig. Die Untersuchung verschiedenster Gewebetypen am Ende des Experiments ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine Infektion der beiden mit IMVAMUNE immunisierten überlebenden Tiere. Dagegen konnten zwischen den IMVAMUNE-immunisierten erkrankten Tieren und den nicht-immunisierten Kontrolltieren keine Unterschiede hinsichtlich der Viruslast in den Geweben festgestellt werden.

In der Literatur sind verschiedene Antikörperreaktionen in nicht-humanen Primatenmodellen auf eine Immunisierung mit einer MVA-Vakzine im Vergleich zu traditionellen Impfstoffen beschrieben worden. Nach einer Studie von Stittelaar et al. entwickelten Rhesusaffen nach Immunisierung mit IMVAMUNE eine schnellere und höhere Antikörperantwort gegen *Vaccinia Viren* als mit Elstree-RIVM [184]. Earl et al. beschreiben in zwei Studien schnellere Antikörperantworten nach Immunisierung mit einer IMVAMUNE-Vorläufervakzine (MVA 1974/NIH clone 1 bzw. MVA aus Passage 572 (2/22/1974)) als mit Dryvax, die dann aber dasselbe Level erreichten [181, 182]. Alle drei Studien haben gemeinsam, dass die mit den traditionellen Impfstoffen immunisierten Tiere dennoch besser gegen die Wochen spätere Infektion mit *Affenpockenviren* geschützt waren. Insofern wird im in der vorliegenden Studie verwendeten Weißbüschelaffen/*Calpox Virus*-Modell der Zusammenhang zwischen Antikörperbildung und Schutzwirkung der Immunisierung mit IMVAMUNE besser widergespiegelt als in den erwähnten Makakenmodellen.

Um die Entwicklung der Immunantwort der Krallenaffen auf IMVAMUNE genauer zu charakterisieren, wurden die Plasmaproben vom Infektionstag und vom im Versuchsverlauf letztmöglichen Zeitpunkt mittels ELISA auf ihre Reaktivität gegen verschiedene Virusproteine untersucht. Die effektive Neutralisierung von *Vaccinia Viren* erfordert die Bildung von Antikörpern gegen sowohl MV- als auch EV-Antigene [188]. Zur Charakterisierung der Immunantwort wurden insgesamt fünf rekombinant hergestellte OPV-Oberflächenproteine ausgewählt, die als Targets für protektive (A33, B5, L1, H3, A27) und neutralisierende (B5, L1, H3, A27) Antikörper bekannt

sind [128]. Die drei Proteine A27, H3 und L1 sind in der inneren Membran, A33 und B5 in der äußeren Membran des Viruspartikels lokalisiert. Es liegt auf der Hand, dass für die spezifische Bindung an die antigenen Determinanten der rekombinant hergestellten MV-Proteine die korrekte Faltung der Proteine erforderlich ist. Obwohl einige der Proteine natürlicherweise glykosyliert (A33, B5) oder myristyliert (L1) vorliegen, spielen diese posttranslationalen Modifikationen eine untergeordnete Rolle für die Bindung spezifischer Antikörper [245]. Überdies hat der Einsatz von VIG als Positivkontrolle gezeigt, dass die verwendeten Proteine im ELISA zweifellos erkannt werden.

Bei den EV-Proteinen B5 und A33 sind von den IMVAMUNE-immunisierten Tieren am Tag der Infektion bei 5 von 7 Tieren mit vierwöchiger Wartezeit deutliche Signale zu erkennen, bei den Tieren mit zehnwöchiger Wartezeit hingegen nur gelegentliche und schwächere Signale (Abbildung 33). Dieses Ergebnis deckt sich insofern mit den ELISA-Ergebnissen gegen Virus/Zelllysate, als dass am Tag der Infektion Antikörper bei der Gruppe mit nur 4 Wochen Wartezeit, aber kaum noch bei der mit 10 Wochen Wartezeit nachweisbar waren. Gegen die eingesetzten MV-Proteine konnten nur in Einzelfällen Antikörper nahe der Nachweisgrenze detektiert werden. Die gleiche Tendenz ist auch bei den mit VV LE-BN-immunisierten Tieren erkennbar: Einerseits gibt es höhere Signale bei den Tieren mit 4 Wochen Wartezeit als bei denen mit 10 Wochen Wartezeit, andererseits seltener und schwächere Signale bei MV-Proteinen. Die Antikörperantworten nach der Vakzinierung mit VV LE-BN sind dabei jedoch deutlich höher als nach der Vakzinierung mit IMVAMUNE. Wie bereits anhand der Ergebnisse aus den ELISAs mit Virus/Zelllysate diskutiert, wird auch hier der Unterschied zwischen der Antikörperbildung nach einer VV LE-BN- und einer IMVAMUNE-Immunsierung deutlich. In dem verwendeten Weißbüschelaffenmodell wird eine weitaus schwächere Antikörperantwort sowohl gegen die eingesetzten EV- als auch MV-Proteine generiert als durch eine Immunsierung mit VV LE-BN. Außerdem zeigen die Ergebnisse aus beiden Immunsierungsstudien, dass der Antikörpertiter gegen die einzelnen EV-Proteine 10 Wochen nach der Immunsierung wieder abfällt, was aber offenbar nicht mit dem Schutz vor der Infektion korreliert. Entsprechende Daten sind von Pütz et al. im Rahmen einer Studie mit humanen Seren beschrieben worden, nach denen die Antikörpertiter immunisierter Individuen gegen ganze *Vaccinia Viren* viel höher und signifikant länger nachzuweisen sind als gegen einzelne Oberflächenproteine [140].



Die Antikörperantwort aller immunisierten Weißbüschelaffen ist gegen die EV-Proteine B5 und A33 stärker als gegen die MV-Proteine L1, A27 und H3. Hier gibt es Abweichungen zur oben erwähnten Untersuchung, in der die Seren von 92 VV L-E-immunisierten Individuen charakterisiert wurden. Dort waren hohe Antikörpertiter gegen die EV-Proteine B5, A33 und A56 und auch gegen die MV-Proteine A27 und H3 messbar, jedoch keine Antikörper gegen L1 [140]. Es ist unklar, ob dies generelle Unterschiede zwischen den im Infektionsmodell verwendeten Neuweltaffen und den Menschen zeigt, oder ob die unterschiedlichen Ergebnisse individuelle Unterschiede reflektieren. Eine neuere Studie zeigt, dass die humorale Immunantwort gegen *Vaccinia Virus* individuell sehr unterschiedlich ist und weder hinsichtlich Intensität noch Spezifität der EV- und MV-Proteine uniform ist. Es wird vermutet, dass diese Heterogenität aus der Diversität der HLA-Klasse II-Allele und der CD4 Helfer-T-Zell-Epitope resultiert, die die B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren [245].

Ebenfalls in Übereinstimmung mit den bereits diskutierten ELISAs gegen Virus/Zellysat zeigen die Protein-spezifischen ELISAs bei den VV LE-BN immunisierten Tieren nach der Infektion einen deutlichen Booster-Effekt, aber kaum bei den IMVAMUNE-immunisierten Tieren. Offensichtlich werden durch die Immunisierung mit IMVAMUNE diese speziellen Determinanten dem Immunsystem nicht oder in zu geringem Maß präsentiert. IMVAMUNE verursacht in den meisten Säugetierzellen eine abortive Infektion. Zwar findet eine effektive Transkription und Translation statt, die Morphogenese und die Freisetzung infektiöser Partikel ist jedoch gestört [304, 305]. Im Gegensatz dazu werden durch die Immunisierung mit VV LE-BN Zellen permissiv infiziert, was den Unterschied in der Antikörperantwort zwischen beiden Impfstoffen erklären kann. So werden in der frühen Phase der Infektion aus intakten Zellen EV-Partikel ausgeschleust und später durch die Lyse von Zellen MV-Bestandteile freigesetzt, die sämtlich dem Immunsystem präsentiert werden.

Die Immunisierung mit IMVAMUNE zeigt in verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche Wirksamkeit. In der bereits erwähnten Arbeit von Garza et al. waren 7 von 8 immunisierten Kaninchen vollständig gegen eine Erkrankung durch *Kaninchenpockenviren* geschützt. Ein Tier zeigte schwache Symptome [183]. In der Studie von Stittelaar et al. wurden je drei immunisierte Makaken mit einer subletalen bzw. letalen Dosis *Affenpockenviren* infiziert. Eines der drei mit der letalen Dosis

---

infizierten Tiere durchlief eine systemische Infektion mit Läsionen und erholte sich nach vier Wochen wieder. Alle übrigen Tiere entwickelten Fieber, aber keine Läsionen [184]. Die vorliegende Arbeit zeigt einen unzureichenden Schutz durch IMVAMUNE im Krallenaffen/*Calpox Virus*-Modell. Um die Ergebnisse aus diesen Studien statistisch gegeneinander absichern zu können, wären indes größere Tierzahlen erforderlich. Es ist bisher unklar, welches Modell die Schutzwirkung von IMVAMUNE beim Menschen gegen das *Variola Virus* am besten widerspiegelt. Möglicherweise treten in dem *Calpox Virus*/Weißbüschelaffen-Modell kleine Differenzen in der Immunantwort bzw. in der Schutzwirkung deutlicher zu Tage als in anderen nicht-humanen Primatenmodellen, da in diesem Modell eine Infektion ohne vorherige Immunisierung scheinbar grundsätzlich tödlich verläuft [231]. Es ist daher möglich, dass mit diesem Modell Unterschiede zwischen verschiedenen Vakzinen und eventuell auch antiviralen Therapien aufgezeigt werden können, die in anderen Modellen nur mit sehr umfangreichen Studien statistisch abgesichert werden könnten.

Es ist abschließend nicht zu beurteilen, ob IMVAMUNE beim Menschen einen ausreichenden Schutz gegen *Orthopockenvirus*-Infektionen gewährleisten würde. Fest steht hingegen, dass die Vakzine sicherer als die Impfstoffe der ersten und zweiten Generation ist und auch bei Individuen mit Risikofaktoren eingesetzt werden könnte. Denkbar ist eine Verwendung als Prävakzine, wie sie schon für die IMVAMUNE-Vorläufer diskutiert wurden, um das Risiko der Immunisierung mit einem traditionellen Impfstoff zu minimieren [181, 306, 307]. Die Eignung von IMVAMUNE als Prävakzine ist bereits in kontrollierten, klinischen Studien evaluiert worden [308]. Im Falle eines Einsatzes beim Menschen bleiben daher die Risiken der Erkrankung, des potentiell ungenügenden Impfschutzes durch IMVAMUNE und der Entwicklung von Impfkomplicationen durch traditionelle Vakzine gegeneinander abzuwägen. Aus diesem Grund würde der Einsatz von IMVAMUNE als Prävakzine vermutlich die sicherste Alternative darstellen.

# Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ATI	A-type inclusion bodies
$\alpha$	anti
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
BSL	biosafety level
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEF	chicken embryonal fibroblasts
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalievirus
CPE	zytopathischer Effekt
CPXV	<i>Cowpox Virus</i> (Abkürzung im Englischen)
CV	<i>Kuhpockenvirus</i> (Abkürzung im Deutschen)
CV BR	<i>Cowpox Virus Brighton Red</i>
dd	double distilled
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum Göttingen GmbH
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFC	Entry/Fusion-Complex
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
etc.	et cetera
EV	extracellular virion
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminglykan
GMII	Göttinger Mischung II

---

h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
i.d.	intradermal
IFA	indirect immunofluorescence assay
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
ITR	inverted terminal repeat
i.v.	intravenös
Inf.	Infektion
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LD <sub>50</sub>	lethal dose 50
m	milli
M	molar
MGB	minor groove binder
MID <sub>50</sub>	monkey infectious dose 50
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MV	mature virion
MVA	Modified Vaccinia Virus Ankara
MW	molecular weight
μ	mikro
n	nano
nat.	natürlich
NFQ	non-fluorescing quencher

---

OD	Optische Dichte
OPV	Orthopockenvirus
p.i.	post infection
p.im.	post immunization
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pers.	persönlich
PFU	plaque forming units
PKR	Proteinkinase
POD	Peroxidase
PRNT <sub>50</sub>	Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test
RCLB	red cell lysis buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
Scarif.	Skarifizierung
s.c.	subcutan
SDS	sodiumdodecylsulfate
spp.	Spezies (Plural)
STR	short tandem repeat
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose 50
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
unsp.	unspezifisch
v/v	Volumenprozent
VIG	Vaccinia Immunglobulin
V	Volt
VACV	<i>Vaccinia Virus</i> (Abkürzung im Englischen)
VV	<i>Vaccinia Virus</i> (Abkürzung im Deutschen)
VV Cop	<i>Vaccinia Virus Copenhagen</i>
VV L-E	<i>Vaccinia Virus Lister-Elstree</i>
VV LE-BN	<i>Vaccinia Virus Lister-Elstree</i> (produziert von Bavarian Nordic)
VV WR	<i>Vaccinia Virus Western Reserve</i>
WB	Western Blot

w/v	Gewichtprozent
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization
WV	wrapped virion

---

# Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Spezies des Genus Orthopockenvirus und einige wichtige Vertreter.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2: Einige Impfstoffe und Impfstoffkandidaten gegen Variola.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3: Tiermodelle mit Orthopockenviren.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 4: Scheinbare <math>K_D</math>- und <math>B_{max}</math>-Werte verschiedener IgY-Präparationen.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 5: Identifizierte Vaccinia Virus- und Kuhpockenvirus-Antigene.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 6: Nachweis von infektiösem Calpox Virus in Rachenabstrichen nach Infektion.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabelle 7: Bestimmung des Anti-Calpox-spezifischen IgG-Titers im ELISA nach Immunisierung mit IMVAMUNE und Infektion [1/x].....</i>	<i>91</i>
<i>Tabelle 8: Bestimmung des Anti-Calpox-spezifischen IgG-Titers im ELISA nach Immunisierung mit VV LE-BN und Infektion [1/x].....</i>	<i>92</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vaccinia Viren.....	7
Abbildung 2: OPV-Genomstruktur mit Hind III-Kartierung.....	9
Abbildung 3: Krankheitsverlauf einer ordinären Variola Virus-Infektion.....	13
Abbildung 4: Hautläsionen bei Pocken und Windpocken.....	13
Abbildung 5: Manipulation und Überwachung/Kontrolle von Balb/c-Mäusen .....	32
Abbildung 6: ZAP-Express® Vektor-System.....	56
Abbildung 7: Bestimmung des Titers von OPV-spezifischen IgY aus Eiern immunisierter Hühner.....	62
Abbildung 8: Titerverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem Virus immunisierter Hühner im IFA.....	63
Abbildung 9: Titerverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem oder inaktiviertem Virus immunisierter Hühner im IFA.....	64
Abbildung 10: Neutralisierungstiterverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem Virus immunisierter Hühner (bestimmt mit PRNT <sub>50</sub> ).....	65
Abbildung 11: Neutralisierungstiterverläufe von IgY aus Eiern mit aktivem oder inaktiviertem Virus immunisierter Hühner (bestimmt mit PRNT <sub>50</sub> ).....	66
Abbildung 12: SDS-PAGE exemplarisch von IgY-Präparationen.....	67
Abbildung 13: Western Blot mit spezifischen IgY, VIG und unspezifischen IgY.....	68
Abbildung 14: Bindungskapazitäten von IgY-Präparationen gegen einzelne OPV-Proteine.....	69
Abbildung 15: Screening von IgY gegen OPV-Expressionsbibliotheken.....	71
Abbildung 16: Verteilung der durch Screening mit IgY gefundenen immunogenen Fragmente in OPV-Expressionsbibliotheken.....	72
Abbildung 17: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer letalen Infektionsdosis von 10 <sup>6</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	75
Abbildung 18: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion (p.i.) mit 10 <sup>6</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	76
Abbildung 19: Balb/c-Mäuse.....	77
Abbildung 20: Symptome von Mäusen nach Infektion mit 10 <sup>6</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	77
Abbildung 21: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer Infektionsdosis von 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	78
Abbildung 22: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	79
Abbildung 23: Symptome von Mäusen nach Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und viermaliger Behandlung mit IgY.....	80
Abbildung 24: Nachweis von OPV-Kopien im Blut einzelner Tiere an Tag 7 nach Infektion.....	81
Abbildung 25: Kaplan-Meier Plot nach Infektion von Mäusen mit einer Infektionsdosis von 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und einmaliger Behandlung.....	82
Abbildung 26: Gewichtsänderung von Mäusen nach der Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und einer Behandlung 6h vor oder nach der Infektion.....	83
Abbildung 27: Symptome von Mäusen nach Infektion mit 10 <sup>4</sup> PFU VV WR und einmaliger Behandlung.....	84
Abbildung 28: Nachweis von OPV-Kopien im Blut einzelner Tiere an Tag 7 nach Infektion.....	84
Abbildung 29: Nachweis von OPV-Kopien in Gewebelysaten einzelner Tiere nach Euthanasierung....	85
Abbildung 30: Kaplan-Meier Plot von immunisierten Tieren mit IMVAMUNE und nicht-immunisierten Tieren.....	87
Abbildung 31: Nachweis von Calpox Virus-DNA im Blut nach Infektion.....	88
Abbildung 32: Nachweis von Calpox Virus-Genomäquivalenten in ausgewählten Geweben.....	90
Abbildung 33: Nachweis von Antikörpern in Seren von mit IMVAMUNE und VV LE-BN immunisierten Tieren gegen unterschiedliche virale Oberflächenproteine.....	94



# Literaturverzeichnis

1. FDA Fast Track status for IMVAMUNE, 2010, Food and Drug Administration: Human vaccines.
2. Riedel, S., *Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2005. **18**(1): p. 21-5.
3. Miller, J., Engelberg, S., Broad, W. J., *Germes: the ultimate weapon*. 2001: Simon & Schuster Ltd. 382.
4. Langer, W.L., *Immunization against smallpox before Jenner*. Sci Am, 1976. **234**(1): p. 112-7.
5. Henderson, D.A., *Edward Jenner's vaccine*. Public Health Rep, 1997. **112**(2): p. 116-21.
6. Essbauer, S., M. Pfeffer, and H. Meyer, *Zoonotic poxviruses*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 229-36.
7. Henderson, D.A., *The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future*. Vaccine, 2011. **29 Suppl 4**: p. D7-9.
8. Strassburg, M.A., *The global eradication of smallpox*. Am J Infect Control, 1982. **10**(2): p. 53-9.
9. Foege, W.H., J.D. Millar, and J.M. Lane, *Selective epidemiologic control in smallpox eradication*. Am J Epidemiol, 1971. **94**(4): p. 311-5.
10. Eradication, G.C.f.t.C.o.S., *The Global Eradication of Smallpox: Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication.*, 1980, World Health Organization: Switzerland, Geneva.
11. *The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, 1979*, in *History of international public health ; no. 41980*, World Health Organization: Switzerland, Geneva. p. 122.
12. Rao, A.R., et al., *Epidemiological studies in smallpox. A study of intrafamilial transmission in a series of 254 infected families*. Indian J Med Res, 1968. **56**(12): p. 1826-54.
13. Jezek, Z., L.N. Khodakevich, and J.F. Wickett, *Smallpox and its post-eradication surveillance*. Bull World Health Organ, 1987. **65**(4): p. 425-34.
14. Mahy, B.W., et al., *The remaining stocks of smallpox virus should be destroyed*. Science, 1993. **262**(5137): p. 1223-4.
15. Lane, J.M. and G.A. Poland, *Why not destroy the remaining smallpox virus stocks?* Vaccine, 2011. **29**(16): p. 2823-4.
16. Razzell, P., *Should remaining stocks of smallpox virus be destroyed?* Soc Hist Med, 1995. **8**(2): p. 305-7.
17. Tanne, J.H., *World Health Assembly votes not to destroy smallpox virus*. BMJ, 2005. **330**(7502): p. 1230.
18. Organization, W.H., *Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 October - 1 November, 2011*, World Health Organization: Switzerland, Geneva.
19. Shoham, D. and Z. Wolfson, *The Russian biological weapons program: vanished or disappeared?* Crit Rev Microbiol, 2004. **30**(4): p. 241-61.
20. Clarke, S.C., *Bioterrorism: an overview*. Br J Biomed Sci, 2002. **59**(4): p. 232-4.
21. Ryan, C.P., *Zoonoses likely to be used in bioterrorism*. Public Health Rep, 2008. **123**(3): p. 276-81.
22. Prevention, C.f.D.C.a. *Bioterrorism Agents/Diseases, By Category*. [cited 2012 September 5, 2012]; Available from: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.
23. Rega, P. *History of Bioterrorism: A chronological history of biological terrorism and biowarfare throughout the ages*. . 25.10.2012]; Available from: <http://www.bi-terry.com/HistoryBioTerr.html>.
24. Phillips, M.B. *Bioterrorism: a brief history*. Focus on Bioterrorism 2005. 25.10.2012]; Available from: [https://www.dcmsonline.org/jax-medicine/2005journals/bioterrorism/bioterrorism\\_History.Pdf](https://www.dcmsonline.org/jax-medicine/2005journals/bioterrorism/bioterrorism_History.Pdf).
25. *From the Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigation of bioterrorism-related Anthrax--Connecticut, 2001*. JAMA, 2002. **287**(1): p. 34-5.
26. *Justice Department and FBI Announce Formal Conclusion of Investigation into 2001 Anthrax Attacks, investigative summary*. Justice News 2010 25.10.2012]; Available from: <http://www.justice.gov/opa/pr/2010/February/10-nsd-166.html>.

27. Vorou, R.M., V.G. Papavassiliou, and I.N. Pierroutsakos, *Cowpox virus infection: an emerging health threat*. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. **21**(2): p. 153-6.
28. Kroon, E.G., et al., *Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy*. *Antiviral Res*, 2011. **92**(2): p. 150-63.
29. Parker, S., et al., *Human monkeypox: an emerging zoonotic disease*. *Future Microbiol*, 2007. **2**(1): p. 17-34.
30. von Magnus, P., Andersen, E. K., Petersen, K. B., Birch-Andersen, A., *A pox-like disease in cynomolgus monkeys*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 1959. **46**(2): p. 156-176.
31. Arita, I., et al., *Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates*. *Bull World Health Organ*, 1972. **46**(5): p. 625-31.
32. Marennikova, S.S., et al., *Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man*. *Bull World Health Organ*, 1972. **46**(5): p. 599-611.
33. Di Giulio, D.B. and P.B. Eckburg, *Human monkeypox: an emerging zoonosis*. *Lancet Infect Dis*, 2004. **4**(1): p. 15-25.
34. Khodakevich, L., et al., *The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission*. *Trop Geogr Med*, 1987. **39**(2): p. 115-22.
35. Breman, J.G., et al., *Human monkeypox, 1970-79*. *Bull World Health Organ*, 1980. **58**(2): p. 165-82.
36. Heymann, D.L., M. Szczeniowski, and K. Esteves, *Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years*. *Br Med Bull*, 1998. **54**(3): p. 693-702.
37. Hutin, Y.J., et al., *Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997*. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(3): p. 434-8.
38. Jezek, Z., et al., *Serological survey for human monkeypox infections in a selected population in Zaire*. *J Trop Med Hyg*, 1987. **90**(1): p. 31-8.
39. Lourie, B., et al., *Human infection with monkeypox virus: laboratory investigation of six cases in West Africa*. *Bull World Health Organ*, 1972. **46**(5): p. 633-9.
40. Damon, I.K., C.E. Roth, and V. Chowdhary, *Discovery of monkeypox in Sudan*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(9): p. 962-3.
41. Learned, L.A., et al., *Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(2): p. 428-34.
42. Breman, J.G. and D.A. Henderson, *Diagnosis and management of smallpox*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(17): p. 1300-8.
43. Reed, K.D., et al., *The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(4): p. 342-50.
44. Damaso, C.R., et al., *An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine*. *Virology*, 2000. **277**(2): p. 439-49.
45. Nagasse-Sugahara, T.K., et al., *Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004. **46**(6): p. 315-22.
46. Lobatol, Z.I.P., Trindadell, G. S., FroisIII, M. C. M., RibeiroI, E. B. T., DiasI, G. R. C., TeixeiraI, B. M., Limal, F. A., AlmeidaI, G. M. F., Kroon, E. G., *Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2005. **57**(4).
47. de Souza Trindade, G., et al., *Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle*. *Emerg Infect Dis*, 2003. **9**(2): p. 155-60.
48. Leite, J.A., et al., *Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil*. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(12): p. 1935-8.
49. Silva-Fernandes, A.T., et al., *Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks*. *J Clin Virol*, 2009. **44**(4): p. 308-13.
50. Brum, M.C., et al., *An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil*. *J Vet Diagn Invest*, 2010. **22**(1): p. 143-7.
51. Lopesode, S., et al., *Cotia Virus: A New Agent Isolated from Sentinel Mice in S Ao Paulo, Brazil*. *Am J Trop Med Hyg*, 1965. **14**: p. 156-7.
52. Abrahao, J.S., et al., *One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil?* *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7428.
53. Abrahao, J.S., et al., *Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance*. *Arch Virol*, 2009. **154**(9): p. 1551-3.

54. Trindade, G.S., et al., *Brazilian vaccinia viruses and their origins*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(7): p. 965-72.
55. Drumond, B.P., et al., *Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain*. Microbes Infect, 2008. **10**(2): p. 185-97.
56. Kinnunen, P.M., et al., *Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(8): p. 1133-40.
57. Chantrey, J., et al., *Cowpox: reservoir hosts and geographic range*. Epidemiol Infect, 1999. **122**(3): p. 455-60.
58. Vogel, S., et al., *The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: transmission by infected pet rats*. Acta Derm Venereol, 2012. **92**(2): p. 126-31.
59. Campe, H., et al., *Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 777-80.
60. Willemse, A. and H.F. Egberink, *Transmission of cowpox virus infection from domestic cat to man*. Lancet, 1985. **1**(8444): p. 1515.
61. Honlinger, B., et al., *Generalized cowpox infection probably transmitted from a rat*. Br J Dermatol, 2005. **153**(2): p. 451-3.
62. Eis-Hubinger, A.M., et al., *Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat*. Lancet, 1990. **336**(8719): p. 880.
63. Haenssle, H.A., et al., *Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat*. J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(2 Suppl): p. S1-4.
64. Coras, B., et al., *Cowpox and a cat*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 446.
65. Bennett, M. and D. Baxby, *Cowpox in cats and man*. Vet Q, 1995. **17 Suppl 1**: p. S16.
66. Wolfs, T.F., et al., *Rat-to-human transmission of Cowpox infection*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(12): p. 1495-6.
67. Ninove, L., et al., *Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 781-4.
68. Stolz, W., et al., *Characteristic but unfamiliar--the cowpox infection, transmitted by a domestic cat*. Dermatology, 1996. **193**(2): p. 140-3.
69. Baxby, D., M. Bennett, and B. Getty, *Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases*. Br J Dermatol, 1994. **131**(5): p. 598-607.
70. Blackford, S., D.L. Roberts, and P.D. Thomas, *Cowpox infection causing a generalized eruption in a patient with atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 1993. **129**(5): p. 628-9.
71. Matz-Rensing, K., et al., *Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys*. Vet Pathol, 2006. **43**(2): p. 212-8.
72. Kurth, A., et al., *Rat-to-elfant-to-human transmission of cowpox virus*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(4): p. 670-1.
73. Cardeti, G., et al., *Cowpox virus in llama, Italy*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(8): p. 1513-5.
74. Kurth, A., et al., *Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6883.
75. Moss, B., *Poxviridae: the viruses and their replication*. 4 ed. Fields Virology. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
76. King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E.J., *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2011, International Committee on Taxonomy of Viruses: San Diego. p. 1338.
77. Condit, R.C., N. Moussatche, and P. Traktman, *In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion*. Adv Virus Res, 2006. **66**: p. 31-124.
78. Wilton, S., A.R. Mohandas, and S. Dales, *Organization of the vaccinia envelope and relationship to the structure of intracellular mature virions*. Virology, 1995. **214**(2): p. 503-11.
79. Hollinshead, M., et al., *Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1503-17.
80. McKelvey, T.A., et al., *Identification of the orthopoxvirus p4c gene, which encodes a structural protein that directs intracellular mature virus particles into A-type inclusions*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11216-25.
81. Upton, C., et al., *Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7590-600.
82. Gubser, C., et al., *Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 1): p. 105-17.
83. Shchelkunov, S.N., et al., *The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins*. Virology, 1998. **243**(2): p. 432-60.

84. Esposito, J.J., et al., *Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus*. Science, 2006. **313**(5788): p. 807-12.
85. Stuart, D., et al., *In vitro resolution of poxvirus replicative intermediates into linear minichromosomes with hairpin termini by a virally induced Holliday junction endonuclease*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1551-63.
86. Goebel, S.J., et al., *The complete DNA sequence of vaccinia virus*. Virology, 1990. **179**(1): p. 247-66, 517-63.
87. Moss, B., *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. 5 ed. Fields' Virology, ed. P.M.H. David M. Knipe. Vol. 2. 2007, Philadelphia.
88. Vanderplasschen, A. and G.L. Smith, *A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 4032-41.
89. Chung, C.S., et al., *A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1577-85.
90. Lin, C.L., et al., *Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3353-65.
91. Hsiao, J.C., C.S. Chung, and W. Chang, *Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8750-61.
92. Chiu, W.L., et al., *Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2149-57.
93. Foo, C.H., et al., *Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans*. Virology, 2009. **385**(2): p. 368-82.
94. Kochan, G., et al., *Membrane cell fusion activity of the vaccinia virus A17-A27 protein complex*. Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 149-64.
95. Law, M., et al., *Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5989-94.
96. Sandgren, K.J., et al., *A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000866.
97. Schmidt, F.I., et al., *Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3647-61.
98. Mercer, J. and A. Helenius, *Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells*. Science, 2008. **320**(5875): p. 531-5.
99. Mercer, J. and A. Helenius, *Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1209**: p. 49-55.
100. Wolfe, C.L., S. Ojeda, and B. Moss, *Transcriptional repression and RNA silencing act synergistically to demonstrate the function of the eleventh component of the vaccinia virus entry-fusion complex*. J Virol, 2012. **86**(1): p. 293-301.
101. Baldick, C.J., Jr. and B. Moss, *Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3515-27.
102. Wei, C.M. and B. Moss, *Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): p. 318-22.
103. Beaud, G., *Vaccinia virus DNA replication: a short review*. Biochimie, 1995. **77**(10): p. 774-9.
104. Merchlinsky, M. and B. Moss, *Resolution of vaccinia virus DNA concatemer junctions requires late-gene expression*. J Virol, 1989. **63**(4): p. 1595-603.
105. Meng, X., et al., *Vaccinia virus A6 is essential for virion membrane biogenesis and localization of virion membrane proteins to sites of virion assembly*. J Virol, 2012. **86**(10): p. 5603-13.
106. Moss, B. and E.N. Rosenblum, *Letter: Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin*. J Mol Biol, 1973. **81**(2): p. 267-9.
107. Smith, G.L., B.J. Murphy, and M. Law, *Vaccinia virus motility*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 323-42.
108. Sanderson, C.M., M. Hollinshead, and G.L. Smith, *The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 1): p. 47-58.
109. Blasco, R. and B. Moss, *Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4170-9.
110. Schmelz, M., et al., *Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 130-47.

111. Tooze, J., et al., *Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes*. Eur J Cell Biol, 1993. **60**(1): p. 163-78.
112. Hiller, G. and K. Weber, *Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment*. J Virol, 1985. **55**(3): p. 651-9.
113. Smith, G.L. and M. Law, *The exit of vaccinia virus from infected cells*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 189-97.
114. Payne, L.G., *Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia*. J Gen Virol, 1980. **50**(1): p. 89-100.
115. Turner, P.C. and R.W. Moyer, *The vaccinia virus fusion inhibitor proteins SPI-3 (K2) and HA (A56) expressed by infected cells reduce the entry of superinfecting virus*. Virology, 2008. **380**(2): p. 226-33.
116. Doceul, V., et al., *Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread*. Science, 2010. **327**(5967): p. 873-6.
117. Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Zdenek, J., Ladnyi, I. D., *Smallpox and its Eradication*. 1988, Switzerland, Geneva: World Health Organization. 1460.
118. Behbehani, A.M., *The smallpox story: life and death of an old disease*. Microbiol Rev, 1983. **47**(4): p. 455-509.
119. Koplan, J.P. and S.O. Foster, *Smallpox: clinical types, causes of death, and treatment*. J Infect Dis, 1979. **140**(3): p. 440-1.
120. Hahon, N. and B.J. Wilson, *Pathogenesis of variola in Macaca irus monkeys*. Am J Hyg, 1960. **71**: p. 69-80.
121. Buller, R.M. and G.J. Palumbo, *Poxvirus pathogenesis*. Microbiol Rev, 1991. **55**(1): p. 80-122.
122. Zaucha, G.M., et al., *The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)*. Lab Invest, 2001. **81**(12): p. 1581-600.
123. Martin, D.B., *The cause of death in smallpox: an examination of the pathology record*. Mil Med, 2002. **167**(7): p. 546-51.
124. Moore, Z.S., J.F. Seward, and J.M. Lane, *Smallpox*. Lancet, 2006. **367**(9508): p. 425-35.
125. Bray, M. and M. Buller, *Looking back at smallpox*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(6): p. 882-9.
126. Downie, A.W., et al., *Virus and virus antigen in the blood of smallpox patients; their significance in early diagnosis and prognosis*. Lancet, 1953. **265**(6778): p. 164-6.
127. Downie, A.W. and C.K. Mc, *The antibody response in man following infection with viruses of the pox group. III. Antibody response in smallpox*. J Hyg (Lond), 1958. **56**(4): p. 479-87.
128. Moss, B., *Smallpox vaccines: targets of protective immunity*. Immunol Rev, 2011. **239**(1): p. 8-26.
129. Mc, C.K., A.W. Downie, and W.H. Bradley, *The antibody response in man following infection with viruses of the pox group. II. Antibody response following vaccination*. J Hyg (Lond), 1958. **56**(4): p. 466-78.
130. Fenner, F., Wittek, R., Dumbell, K. R. , *The Orthopoxviruses*. 1989, London: Academic Press. 1989.
131. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
132. Crotty, S., et al., *Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 4969-73.
133. Taub, D.D., et al., *Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study*. Am J Med, 2008. **121**(12): p. 1058-64.
134. Hammarlund, E., et al., *Antiviral immunity following smallpox virus infection: a case-control study*. J Virol, 2010. **84**(24): p. 12754-60.
135. Belyakov, I.M., et al., *Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9458-63.
136. Edghill-Smith, Y., et al., *Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 740-7.
137. Wolffe, E.J., S. Vijaya, and B. Moss, *A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies*. Virology, 1995. **211**(1): p. 53-63.
138. Nelson, G.E., et al., *Vaccinia virus entry/fusion complex subunit A28 is a target of neutralizing and protective antibodies*. Virology, 2008. **380**(2): p. 394-401.
139. Wallengren, K., et al., *The A17L gene product of vaccinia virus is exposed on the surface of IMV*. Virology, 2001. **290**(1): p. 143-52.
140. Putz, M.M., et al., *Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1310-5.

141. Galmiche, M.C., et al., *Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens*. *Virology*, 1999. **254**(1): p. 71-80.
142. Benhnia, M.R., et al., *Vaccinia virus extracellular enveloped virion neutralization in vitro and protection in vivo depend on complement*. *J Virol*, 2009. **83**(3): p. 1201-15.
143. Lustig, S., et al., *Synergistic neutralizing activities of antibodies to outer membrane proteins of the two infectious forms of vaccinia virus in the presence of complement*. *Virology*, 2004. **328**(1): p. 30-5.
144. Sette, A., et al., *Definition of epitopes and antigens recognized by vaccinia specific immune responses: their conservation in variola virus sequences, and use as a model system to study complex pathogens*. *Vaccine*, 2009. **27 Suppl 6**: p. G21-6.
145. Xu, R., et al., *Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice*. *J Immunol*, 2004. **172**(10): p. 6265-71.
146. Gordon, S.N., et al., *Smallpox vaccine safety is dependent on T cells and not B cells*. *J Infect Dis*, 2011. **203**(8): p. 1043-53.
147. Bray, M. and M.E. Wright, *Progressive vaccinia*. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(6): p. 766-74.
148. Seet, B.T., et al., *Poxviruses and immune evasion*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 377-423.
149. Alcami, A., *Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 36-50.
150. Alcami, A. and U.H. Koszinowski, *Viral mechanisms of immune evasion*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(9): p. 410-8.
151. McFadden, G. and P.M. Murphy, *Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses*. *Curr Opin Microbiol*, 2000. **3**(4): p. 371-8.
152. Perdiguero, B. and M. Esteban, *The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms*. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(9): p. 581-98.
153. Taylor, J.M. and M. Barry, *Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death*. *Virology*, 2006. **344**(1): p. 139-50.
154. Kotwal, G.J., et al., *Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus*. *Science*, 1990. **250**(4982): p. 827-30.
155. Haga, I.R. and A.G. Bowie, *Evasion of innate immunity by vaccinia virus*. *Parasitology*, 2005. **130 Suppl**: p. S11-25.
156. Langland, J.O., et al., *Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses*. *Virus Res*, 2006. **119**(1): p. 100-10.
157. Stanford, M.M., et al., *Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(2): p. 93-102.
158. Fulginiti, V.A., et al., *Smallpox vaccination: a review, part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(2): p. 241-50.
159. Kennedy, R.B., et al., *The immunology of smallpox vaccines*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(3): p. 314-20.
160. Lane, J.M., et al., *Complications of smallpox vaccination, 1968*. *N Engl J Med*, 1969. **281**(22): p. 1201-8.
161. Lane, J.M., et al., *Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys*. *J Infect Dis*, 1970. **122**(4): p. 303-9.
162. Artenstein, A.W. and J.D. Grabenstein, *Smallpox vaccines for biodefense: need and feasibility*. *Expert Rev Vaccines*, 2008. **7**(8): p. 1225-37.
163. Defense, U.S.D.o. *DoD Smallpox Vaccination Program: Safety Summary, 17 May 2007*. 2007 07 Sep 12 [cited September 07, 2012 2012]; Available from: <http://www.smallpox.mil/event/SPSafetySum.asp>.
164. Selgelid, M.J., *Smallpox revisited?* *Am J Bioeth*, 2003. **3**(1): p. W-IF 1.
165. Infections, A.H.C.o.O., *Report of the Meeting of the Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus Infections, Geneva, Switzerland, 31 August - 1 September, 2004*, World Health Organization: Switzerland, Geneva.
166. Wharton, M., et al., *Recommendations for using smallpox vaccine in a pre-event vaccination program. Supplemental recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. *MMWR Recomm Rep*, 2003. **52**(RR-7): p. 1-16.
167. Cono, J., et al., *Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians*. *MMWR Recomm Rep*, 2003. **52**(RR-4): p. 1-28.
168. Nalca, A. and E.E. Zumbun, *ACAM2000: the new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile*. *Drug Des Devel Ther*, 2010. **4**: p. 71-9.



169. ACAM2000 Smallpox (*Vaccinia*) vaccine. 2009 03/23/2012 [cited 2012 September 5, 2012]; Package Insert - ACAM2000]. Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm180810.htm>.
170. Kennedy, J.S., et al., *Safety and immunogenicity of LC16m8, an attenuated smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults*. J Infect Dis, 2011. **204**(9): p. 1395-402.
171. Kenner, J., et al., *LC16m8: an attenuated smallpox vaccine*. Vaccine, 2006. **24**(47-48): p. 7009-22.
172. Holzer, G.W. and F.G. Falkner, *Construction of a vaccinia virus deficient in the essential DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase by a complementing cell line*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 4997-5002.
173. von Krempelhuber, A., et al., *A randomized, double-blind, dose-finding Phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE*. Vaccine, 2010. **28**(5): p. 1209-16.
174. Kennedy, J.S. and R.N. Greenberg, *IMVAMUNE: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(1): p. 13-24.
175. Mayr, A., et al., *[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]*. Zentralbl Bakteriell B, 1978. **167**(5-6): p. 375-90.
176. Chaplin, P., *Phenotypic and genotypic differences of MVA strains.*, 2006, Bavarian Nordic GmbH, Fraunhoferstrasse 13, 82152 Martinsried (DE).
177. Qin, L., et al., *Genomic analysis of the vaccinia virus strain variants found in Dryvax vaccine*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13049-60.
178. Wyatt, L.S., et al., *Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4590-5.
179. Phelps, A.L., et al., *Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine*. Vaccine, 2007. **25**(1): p. 34-42.
180. Staib, C., et al., *Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 10): p. 2917-21.
181. Earl, P.L., et al., *Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 182-5.
182. Earl, P.L., et al., *Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10889-94.
183. Garza, N.L., et al., *Evaluation of the efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA)/IMVAMUNE against aerosolized rabbitpox virus in a rabbit model*. Vaccine, 2009. **27**(40): p. 5496-504.
184. Stittelaar, K.J., et al., *Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7845-51.
185. Stabenow, J., et al., *A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against Monkeypox virus*. J Virol, 2010. **84**(8): p. 3909-20.
186. Samuelsson, C., et al., *Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1776-84.
187. Davies, D.H., et al., *Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 11724-33.
188. Fogg, C., et al., *Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10230-7.
189. Hooper, J.W., et al., *DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge*. Virology, 2000. **266**(2): p. 329-39.
190. Hooper, J.W., D.M. Custer, and E. Thompson, *Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates*. Virology, 2003. **306**(1): p. 181-95.
191. Pulford, D.J., et al., *Differential efficacy of vaccinia virus envelope proteins administered by DNA immunisation in protection of BALB/c mice from a lethal intranasal poxvirus challenge*. Vaccine, 2004. **22**(25-26): p. 3358-66.
192. Heraud, J.M., et al., *Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2552-64.
193. Hooper, J.W., et al., *Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox*. J Virol, 2004. **78**(9): p. 4433-43.

194. Madeley, C.R., *The immunogenicity of heat-inactivated vaccinia virus in rabbits*. J Hyg (Lond), 1968. **66**(1): p. 89-107.
195. Turner, G.S. and E.J. Squires, *Inactivated smallpox vaccine: immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus*. J Gen Virol, 1971. **13**(1): p. 19-25.
196. Boulter, E.A., *Protection against poxviruses*. Proc R Soc Med, 1969. **62**(3): p. 295-7.
197. Boulter, E.A. and G. Appleyard, *Differences between extracellular and intracellular forms of poxvirus and their implications*. Prog Med Virol, 1973. **16**: p. 86-108.
198. Law, M., M.M. Putz, and G.L. Smith, *An investigation of the therapeutic value of vaccinia-immune IgG in a mouse pneumonia model*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 4): p. 991-1000.
199. Lustig, S., et al., *Effective post-exposure protection against lethal orthopoxviruses infection by vaccinia immune globulin involves induction of adaptive immune response*. Vaccine, 2009. **27**(11): p. 1691-9.
200. Grosenbach, D.W., R. Jordan, and D.E. Hruby, *Development of the small-molecule antiviral ST-246 as a smallpox therapeutic*. Future Virol, 2011. **6**(5): p. 653-671.
201. Andrei, G. and R. Snoeck, *Cidofovir Activity against Poxvirus Infections*. Viruses, 2010. **2**(12): p. 2803-30.
202. Rice, A.D., et al., *Efficacy of CMX001 as a post exposure antiviral in New Zealand White rabbits infected with rabbitpox virus, a model for orthopoxvirus infections of humans*. Viruses, 2011. **3**(1): p. 47-62.
203. Hostetler, K.Y., et al., *Oral 1-O-octadecyl-2-O-benzyl-sn-glycero-3-cidofovir targets the lung and is effective against a lethal respiratory challenge with ectromelia virus in mice*. Antiviral Res, 2007. **73**(3): p. 212-8.
204. Quenelle, D.C., et al., *Oral treatment of cowpox and vaccinia virus infections in mice with ether lipid esters of cidofovir*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(2): p. 404-12.
205. Smee, D.F., et al., *Effects of four antiviral substances on lethal vaccinia virus (IHD strain) respiratory infections in mice*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **23**(5): p. 430-7.
206. Hopkins, R.J. and J.M. Lane, *Clinical efficacy of intramuscular vaccinia immune globulin: a literature review*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(6): p. 819-26.
207. Bray, M., *Henry Kempe and the birth of vaccinia immune globulin*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(6): p. 767-9.
208. Hopkins, R.J., et al., *Safety and pharmacokinetic evaluation of intravenous vaccinia immune globulin in healthy volunteers*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(6): p. 759-66.
209. *Vaccinia Immune Globulin Intravenous (Human)*. 2005 03/20/2012 [cited 2012 September 5, 2012]; Approval Letter]. Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm179515.htm>.
210. De Clercq, E., et al., *A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 464-7.
211. Magee, W.C., K.Y. Hostetler, and D.H. Evans, *Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3153-62.
212. Jesus, D.M., et al., *Cidofovir inhibits genome encapsidation and affects morphogenesis during the replication of vaccinia virus*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11477-90.
213. Stittelaar, K.J., et al., *Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 745-8.
214. Medizinprodukte, B.f.A.u. *Schwerwiegende Nebenwirkungen nach Off-Label-Anwendung*. 13.01.2011 [cited 2012 September 5, 2012]; Rote-Hand-Brief zu Vistide® (Cidofovir)]. Available from: <http://www.bfarm.de/DE/Pharmakovigilanz/risikoinfo/2011/rhb-vistide.html>.
215. Ciesla, S.L., et al., *Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney*. Antiviral Res, 2003. **59**(3): p. 163-71.
216. Lanier, R., et al., *Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections*. Viruses, 2010. **2**(12): p. 2740-2762.
217. Painter, W., et al., *First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2726-34.
218. Yang, G., et al., *An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 13139-49.
219. Jordan, R., et al., *Development of ST-246(R) for Treatment of Poxvirus Infections*. Viruses, 2010. **2**(11): p. 2409-35.



220. Jordan, R., et al., *Safety and pharmacokinetics of the antiorthopoxvirus compound ST-246 following repeat oral dosing in healthy adult subjects*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(6): p. 2560-6.
221. Vora, S., et al., *Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee*. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**(10): p. 1555-61.
222. Prevention, C.f.D.C.a., *Progressive vaccinia in a military smallpox vaccinee - United States, 2009*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009. **58**(19): p. 532-6.
223. Moses, A.E. and R. Cohen-Poradosu, *Images in clinical medicine. Eczema vaccinatum--a timely reminder*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(17): p. 1287.
224. Dias da Silva, W. and D.V. Tambourgi, *IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010. **135**(3-4): p. 173-80.
225. Schade, R., et al., *Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine*. *Altern Lab Anim*, 2005. **33**(2): p. 129-54.
226. *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*, G.f.V.-S.f.L.A.S. GV-SOLAS, Editor 2009, Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT.
227. Bundesministerium für Ernährung, L.u.V. *Versuchstierzahlen 2010*. 2010 20.07.2011 [cited 2012 September 5, 2012]; Tabellen der Tierversuchszahlen für das Jahr 2010.]. Available from: <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.html>.
228. Kennedy, T., *Managing the drug discovery/development interface*. *Drug Discovery Today*, 1997. **2**(10): p. 436-444.
229. FDA, *New drug and biological drug products; evidence needed to demonstrate effectiveness of new drugs when human efficacy studies are not ethical or feasible. Final rule*. *Fed Regist*, 2002. **67**(105): p. 37988-98.
230. Chapman, J.L., et al., *Animal models of orthopoxvirus infection*. *Vet Pathol*, 2010. **47**(5): p. 852-70.
231. Kramski, M., et al., *A novel highly reproducible and lethal nonhuman primate model for orthopox virus infection*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10412.
232. Williamson, J.D., et al., *Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route*. *J Gen Virol*, 1990. **71** ( Pt 11): p. 2761-7.
233. Kramski, M., *Infections of Common Marmosets with Calpox Virus: A Model for Smallpox Virus Infections*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I* 2009, Humboldt-Universität zu Berlin. p. 126.
234. Polson, A., et al., *Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens*. *Immunol Invest*, 1985. **14**(4): p. 323-7.
235. Allison, S.D., et al., *Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **365**(2): p. 289-98.
236. Nilsson, E., Larsson, A., *Stability of chicken IgY antibodies freeze-dried in the presence of lactose, sucrose and trehalose*. *The Journal of Poultry Science*, 2007. **44**: p. 58-62.
237. Zhang, X.Y., Kurth, A., Pauly, D., Pauli, G., Schade, R., Ellerbrok, H., *Application of hightitred IgY antibodies in orthopox virus diagnostics*. *J. Chin. Pharmaceut. Sci.*, 2008. **17**(3): p. 183-191.
238. Miller, L., et al., *Genomic expression libraries for the identification of cross-reactive orthopoxvirus antigens*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e21950.
239. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
240. *Poxvirus Bioinformatics Resource Center*. [Database] Version 6.8.2 (18 Jun 2009) 15/02/2013]; Available from: <http://www.poxvirus.org/index.asp?bhcp=1>.
241. Davies, D.H., et al., *Antibody profiling by proteome microarray reveals the immunogenicity of the attenuated smallpox vaccine modified vaccinia virus ankara is comparable to that of Dryvax*. *J Virol*, 2008. **82**(2): p. 652-63.
242. Sahin, U., et al., *Rapid molecular dissection of viral and bacterial immunomes*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(4): p. 1049-57.
243. Davies, D.H., et al., *Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 547-52.
244. Davies, D.H., et al., *Proteome-wide analysis of the serological response to vaccinia and smallpox*. *Proteomics*, 2007. **7**(10): p. 1678-86.

245. Duke-Cohan, J.S., et al., *The heterogeneity of human antibody responses to vaccinia virus revealed through use of focused protein arrays*. *Vaccine*, 2009. **27**(8): p. 1154-65.
246. *FDA approves cidofovir for treatment of CMV retinitis*. *Food and Drug Administration*. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*, 1996. **2**(8): p. 30.
247. Xiao, Y. and S.N. Isaacs, *Therapeutic Vaccines and Antibodies for Treatment of Orthopoxvirus Infections*. *Viruses*, 2010. **2**(10): p. 2381-2403.
248. Nicklas, W., Cußler, K., Hartinger, J., *Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren*, 1997, Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.
249. Hanly, W.C., Bennett, B. T., Artwohl, J. E. *Overview of Adjuvants*. 1994; Available from: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/overview.htm>.
250. Boulter, E.A., et al., *The nature of the immune state produced by inactivated vaccinia virus in rabbits*. *Am J Epidemiol*, 1971. **94**(6): p. 612-20.
251. Payne, L.G., *Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus*. *J Virol*, 1979. **31**(1): p. 147-55.
252. Seed, B., R.C. Parker, and N. Davidson, *Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion*. *Gene*, 1982. **19**(2): p. 201-9.
253. Downie, A.W., *A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1939. **48**(2): p. 361-379.
254. Ichihashi, Y. and S. Matsumoto, *Studies on the nature of Marchal bodies (A-type inclusion) during ectromelia virus infection*. *Virology*, 1966. **29**(2): p. 264-75.
255. Marchal, J., *Infectious ectromelia. A hitherto undescribed virus disease in mice*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1930. **33**(3): p. 713-728.
256. Patel, D.D., D.J. Pickup, and W.K. Joklik, *Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component*. *Virology*, 1986. **149**(2): p. 174-89.
257. Knight, J.C., et al., *Further analyses of the orthopoxviruses volepox virus and raccoon poxvirus*. *Virology*, 1992. **190**(1): p. 423-33.
258. Howard, A.R. and B. Moss, *Formation of orthopoxvirus cytoplasmic A-type inclusion bodies and embedding of virions are dynamic processes requiring microtubules*. *J Virol*, 2012. **86**(10): p. 5905-14.
259. Smith, G.L., et al., *Vaccinia virus immune evasion*. *Immunol Rev*, 1997. **159**: p. 137-54.
260. Harte, M.T., et al., *The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense*. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 343-51.
261. Gammon, D.B. and D.H. Evans, *The 3'-to-5' exonuclease activity of vaccinia virus DNA polymerase is essential and plays a role in promoting virus genetic recombination*. *J Virol*, 2009. **83**(9): p. 4236-50.
262. Blasco, R. and B. Moss, *Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein*. *J Virol*, 1991. **65**(11): p. 5910-20.
263. Honeychurch, K.M., et al., *The vaccinia virus F13L YPPL motif is required for efficient release of extracellular enveloped virus*. *J Virol*, 2007. **81**(13): p. 7310-5.
264. Ohradanova, A., et al., *Reconstitution of carbonic anhydrase activity of the cell-surface-binding protein of vaccinia virus*. *Biochem J*, 2007. **407**(1): p. 61-7.
265. Yang, Z. and B. Moss, *Interaction of the vaccinia virus RNA polymerase-associated 94-kilodalton protein with the early transcription factor*. *J Virol*, 2009. **83**(23): p. 12018-26.
266. De Silva, F.S., et al., *Poxvirus DNA primase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(47): p. 18724-9.
267. Condit, R.C. and E.G. Niles, *Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1577**(2): p. 325-36.
268. Quick, S.D. and S.S. Broyles, *Vaccinia virus gene D7R encodes a 20,000-dalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase*. *Virology*, 1990. **178**(2): p. 603-5.
269. Parrish, S. and B. Moss, *Characterization of a vaccinia virus mutant with a deletion of the D10R gene encoding a putative negative regulator of gene expression*. *J Virol*, 2006. **80**(2): p. 553-61.
270. Nguyen, H.H., et al., *Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10152.
271. Kuroki, M., et al., *Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk*. *Vet Microbiol*, 1993. **37**(1-2): p. 135-46.
272. Kuroki, M., et al., *Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves*. *Arch Virol*, 1997. **142**(4): p. 843-51.

273. Sarker, S.A., et al., *Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(1): p. 19-25.
274. Ikemori, Y., et al., *Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder*. Vet Microbiol, 1997. **58**(2-4): p. 105-11.
275. Ikemori, Y., et al., *Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic Escherichia coli*. Am J Vet Res, 1992. **53**(11): p. 2005-8.
276. Marquardt, R.R., et al., *Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999. **23**(4): p. 283-8.
277. Yokoyama, H., et al., *Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets*. Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 998-1007.
278. Yokoyama, H., et al., *Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk Salmonella-specific antibodies*. Am J Vet Res, 1998. **59**(4): p. 416-20.
279. Horie, K., et al., *Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans*. J Dairy Sci, 2004. **87**(12): p. 4073-9.
280. Carlander, D., et al., *Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections*. Immunol Res, 2000. **21**(1): p. 1-6.
281. Kollberg, H., et al., *Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent Pseudomonas aeruginosa infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study*. Pediatr Pulmonol, 2003. **35**(6): p. 433-40.
282. Nilsson, E., et al., *More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of Pseudomonas aeruginosa infections: a case report*. J Med Food, 2007. **10**(2): p. 375-8.
283. Malekshahi, Z.V., et al., *Treatment of Helicobacter pylori infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin*. Microb Pathog, 2011. **51**(5): p. 366-72.
284. Zhen, Y.H., et al., *Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol, 2009. **133**(4): p. 317-22.
285. Gomez, C.M., Biamonte, S., Barragan, J., Babusci, M., Garavano, J., Guillen, G., Rudiger, S., *Production of chicken antibodies against botulinic toxin A*. Advances in Agricultural Sciences, 2006. **10**: p. 25-32.
286. Meenatchisundaram, S., et al., *Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(8): p. 1067-73.
287. Meenatchisundaram, S., et al., *Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies*. Toxicon, 2008. **52**(2): p. 221-7.
288. Thalley, B.S. and S.B. Carroll, *Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(10): p. 934-8.
289. Paul, K., et al., *Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy*. Toxicon, 2007. **50**(7): p. 893-900.
290. Turner, G.S., *Respiratory infection of mice with vaccinia virus*. J Gen Virol, 1967. **1**(3): p. 399-402.
291. Vermeer, P.D., et al., *Vaccinia virus entry, exit, and interaction with differentiated human airway epithelia*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9891-9.
292. FluMist. 2003 07/25/2012 [cited 2012 September 5, 2012]; Approval Letter - Influenza Virus Vaccine Live, Intranasal]. Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm094047.htm>.
293. Geerinck, K., et al., *A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream*. J Med Virol, 2001. **64**(4): p. 543-9.
294. Metzger, W. and B.G. Mordmueller, *Vaccines for preventing smallpox*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(3): p. CD004913.
295. Fulginiti, V.A., et al., *Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(2): p. 251-71.
296. Kemper, A.R., M.M. Davis, and G.L. Freed, *Expected adverse events in a mass smallpox vaccination campaign*. Eff Clin Pract, 2002. **5**(2): p. 84-90.

- 
297. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., Stickl, H., *Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes*. Infection, 1975. **3**(1): p. 6-14.
298. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr, *Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence*. J Gen Virol, 1991. **72 ( Pt 5)**: p. 1031-8.
299. Auckland, C., et al., *Reactions to small pox vaccine in naive and previously-vaccinated individuals*. Vaccine, 2005. **23**(32): p. 4185-7.
300. Stittelaar, K.J., et al., *Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques*. Vaccine, 2001. **19**(27): p. 3700-9.
301. Panning, M., et al., *Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay*. Clin Chem, 2004. **50**(4): p. 702-8.
302. Panchanathan, V., G. Chaudhri, and G. Karupiah, *Antiviral protection following immunization correlates with humoral but not cell-mediated immunity*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 461-7.
303. Kempe, C.H., et al., *The use of vaccinia hyperimmune gamma-globulin in the prophylaxis of smallpox*. Bull World Health Organ, 1961. **25**: p. 41-8.
304. Sutter, G. and B. Moss, *Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10847-51.
305. Sutter, G. and C. Staib, *Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery*. Curr Drug Targets Infect Disord, 2003. **3**(3): p. 263-71.
306. Stickl, H., et al., *[MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]*. Dtsch Med Wochenschr, 1974. **99**(47): p. 2386-92.
307. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., Stickl, H., *Passage history, properties, and applicability of the attenuated vaccinia virus strain MVA*. Infection, 1975. **3**: p. 6-14.
308. Frey, S.E., et al., *Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax challenge*. Vaccine, 2007. **25**(51): p. 8562-73.