Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128, 464–472 (2015)
DOI 10.2376/0005-9366-128-464

© 2015 Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
gerd.sutter@lmu.de

Eingegangen: 14.07.2015
Angenommen: 09.09.2015

Online first: 06.11.2015
http://vetline.de/open-access/158/3216/

Lehrstuhl für Virologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Ludwig-Maximilians-Universität München

Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) – die Entwicklung als Vektorimpfstoff und Einsatzmöglichkeiten in der Veterinärmedizin

Modified vaccinia virus ankara (MVA) – development as recombinant vaccine and prospects for use in veterinary medicine

Asisa Volz, Robert Fux, Martin C. Langenmayer, Gerd Sutter

Zusammenfassung

Pockenviren zählen zu den meistgenutzten viralen Expressionssystemen für die Entwicklung neuer Impfstoffe und Gentherapeutika. In diesem Übersichtsartikel berichten wir aus der aktuellen Impfstoffforschung mit rekombinanten Modifizierten Vacciniaviren Ankara (MVA). MVA entstand bereits vor mehr als 40 Jahren nach einer Vielzahl von Vermehrungspassagen in Hühnerzellenkulturen. Durch Anpassung an die vom Vogel stammenden Wirtszellen hat das Virus etwa 15 % seiner ursprünglichen genetischen Information eingebüßt sowie die Vermehrungsfähigkeit in Säugetierzellen und viele Virulenzeigenschaften normaler Vacciniaviren verloren. Trotz dieser Replikationsdefizienz kann MVA aber beliebige Wirtszellen infizieren, seinen molekularen Lebenszyklus entfalten sowie virale und rekombinante Gene exprimieren. Aufgrund seiner Avirulenz und der Unbedenklichkeit für die allgemeine Umwelt kann MVA unter Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 1 eingesetzt werden. Das Virus dient als gut etabliertes Vektorsystem zur Expression heterologer Gensequenzen sowie als Technologieplattform zur Konstruktion und Entwicklung von Impfstoffen in der medizinischen Forschung. Für verschiedenste rekombinante MVA-Impfstoffe konnten die Sicherheit und die Immunogenität im Menschen bereits in klinischen Prüfungen der Phase I bis II belegt werden. Moderne Verfahren zur großtechnischen Produktion von MVA-Impfstoffen nach arzneimittelrechtlichen Bestimmungen sind ebenfalls bereits etabliert. Daher ist auch die Verwendung MVA-basierter Vektorimpfstoffe in der Veterinärmedizin aussichtsreich. Die Ergebnisse erster Untersuchungen unterstützen die erfolgreiche Impfung von Haus- und Nutztieren.

Schlüsselwörter: Rekombinante Impfstoffe, Infektionsmedizin, Zoonosen

Summary

Poxviruses as expression vectors are widely used in medical research for the development of recombinant vaccines and molecular therapies. Here we review recent accomplishments in vaccine research using recombinant modified vaccinia virus ankara (MVA). MVA is a highly attenuated vaccinia virus strain that originated from serial tissue culture passage in chicken embryo fibroblasts more than 40 years ago. Growth adaptation to avian host cells caused deletions and mutations in the viral genome affecting about 15% of the original genetic information. In consequence, MVA is replication-deficient in cells of mammalian origin and fails to produce many of the virulence factors encoded by conventional vaccinia virus. Because of its safety for the general environment MVA can be handled under conditions of biosafety level one. Non-replicating MVA can enter any target cell and activate its molecular life cycle to express all classes of viral and recombinant genes. Therefore, recombinant MVA have been established as an extremely safe and efficient vector system for vaccine development in medical research. By now, various recombinant MVA vaccines have been found safe and immunogenic when used for phase I/II clinical testing in humans, and suitable for industrial scale production following good practice of manufacturing. Thus, there is an obvious usefulness of recombinant MVA vaccines for novel prophylactic and therapeutic approaches also in veterinary medicine. Results from first studies in companion and farm animals are highly promising.

Keywords: Viral vector vaccines, infectious diseases, zoonoses.

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement:
0005-9366/2015/12811-464 $ 15.00/0

Pockenviren als rekombinante Impfstoffe

Die Pockenviren der Wirbeltiere, die sogenannten Chordopockenviren, gehören zu den größten bekannten Viren. Historisch waren sie die ersten Viren, die bereits im Lichtmikroskop erkennbar waren und in Zellkulturen vermehrt werden konnten. Die 200 x 300 nm großen, typisch quaderförmigen Virionen enthalten ein Genom aus doppelsträngiger DNA das durchschnittlich aus etwa 200 Kilobasenpaaren besteht. Interessanterweise werden ca. ein Drittel der insgesamt rund 180 viralen Proteine nicht zwingend für die in-vitro-Replikation der Viren benötigt, sondern sind allein für die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes verantwortlich. Besonders interessant sind dabei die sogenannten Immunevasionsproteine, die darauf spezialisiert sind, bestimmte Immunfunktionen des Wirtes zu inhibieren und damit die in-vivo-Vermehrungsfähigkeit und eine rasche Übertragung der Viren von Wirt-zu-Wirt zu begünstigen (Haller et al., 2014; McFadden, 2005). Daher ist es nicht erstaunlich, dass solche Virusfaktoren auch an der Ausprägung der spezifischen Pockenerkrankung beteiligt sind und damit zu den Pockenvirulenzfaktoren gezählt werden.

Die bekanntesten Pockenviren sind zwei Vertreter des Genus Orthopoxvirus, das Variolavirus als Erreger der gefürchteten Pockenerkrankung beim Menschen und das Vacciniavirus, das als Impfvirus über Jahrzehnte weltweit erfolgreich zur Bekämpfung der Menschenpocken eingesetzt wurde und somit letztlich auch die Ausrottung des Variolavirus erlaubte (Fenner et al., 1988).

Schon bald nach der Ausrottung des Variolavirus gab es für das Pockenimpfvirus Vacciniavirus eine neue Aufgabe. Die Fortschritte der molekularvirologischen Forschung hatten es erlaubt, das Vacciniavirus mit fremden Genen auszustatten und als sogenanntes rekombinantes Impfvirus zu testen (zur Übersicht: Moss, 1996). Solche rekombinanten Viren, auch als Vektorviren bezeichnet, tragen die fremde Erbinformation stabil in ihrem Genom integriert und produzieren in ihrem Lebenszyklus neben ihren eigenen Proteinen auch die durch die heterologe DNA kodierten Antigene. Die Stabilität des DNA-Genoms, der rein zytoplasmatische Replikationszyklus, die Unabhängigkeit des Virus von zellulären Enzymen der Nukleinsäuresynthese, die eigenständige Regulation der Genexpression mit virusspezifischen Promotoren und das Fehlen persistierender bzw. latenter Infektionen machen das Vacciniavirus zu einem sehr verlässlichen viralen Vektorsystem. Eine besonders vorteilhafte Eigenschaft der Vacciniaviren im Hinblick auf eine Verwendung als Impfstoff ist, dass die Präsentation von Antigenen bei der adaptiven Immunantwort durch das Virus selbst nicht behindert wird. So sind bisher keine Mechanismen der viralen Immunevasion bekannt, die direkt der Anregung von Antikörper- oder T-Zellimmunantworten des Wirtes entgegenwirken können. Das Virus hat sich im Lauf seiner Evolution offenbar ganz auf die Blockade der angeborenen („innate“) Immunantworten spezialisiert und kann dann trotz einer adaptiven Immunantwort des Wirtes gut überleben. In relativ seltenen Fällen wurden nach Impfung mit vermehrungsfähigen Vacciniaviren aber schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet, insbesondere in immungeschwächten Patienten (Lane und Millar, 1969; Redfield et al., 1987). Diese Sicherheitslücke wurde mit der Entwicklung einer zweiten Generation von Vacciniavirus-Vektorimpfstoffen geschlossen. Diese Vektoren basieren auf Viren, die in ihrer Vermehrungsfähigkeit in Säugetierzellen sehr stark eingeschränkt sind und heute als sehr sichere rekombinante Impfstoffe beim Menschen eingesetzt werden können (Sutter und Moss, 1992; Tartaglia et al., 1992). Zu diesen sehr sicheren Vacciniaviren gehört das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA).

Historie des Modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA)

Seinen Ursprung hat MVA in einem mehrjährigen Zellkulturexperiment mit einem klassischen Vacciniavirus-Impfstamm, dem Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA), das in der Türkei (Impfanstalt Ankara) und der Bayerischen Landesimpfanstalt München als Pockenimpfstoff produziert wurde (Herrlich und Mayr, 1957). Die Münchener Tierärzte Anton Mayr und Eberhard Munz untersuchten die biologischen Eigenschaften des CVA unter Bedingungen vielfach wiederholter Vermehrung in Kulturen aus primären Hühnerembryofibroblasten (FHE). Nach 371 Passagen in FHE bemerkten sie eine deutliche Veränderung des Wachstumsverhaltens im bebrüteten Hühnerei, geringere Vermehrung in Kälbernieren- und HeLa-Zellkulturen sowie eine reduzierte Virulenz im Kaninchen, in der Maus und im Huhn (Mayr und Munz, 1964). Nach weiterer Vermehrung in Serienpassage hatte das CVA-FHE-Virus seine Vermehrungsfähigkeit auf Zellkulturen menschlichen Ursprungs verloren und praktisch alle krankmachenden Eigenschaften in Tiermodellen eingebüßt. Mit der 516. Passage erfolgte seine Umbenennung in das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) (Mayr et al., 1975). Inzwischen hatte die Bayerische Landesimpfanstalt München das MVA zur Entwicklung eines neuartigen Pockenimpfstoffes übernommen und mit klinischen Prüfungen am Menschen begonnen. In den Jahren 1968–1976 wurde das MVA zur Pockenschutzimpfung in mehr als 100 000 Individuen eingesetzt. Impfkomplikationen, vergleichbar mit solchen die nach der Verabreichung herkömmlicher Vacciniaviren gelegentlich auftraten, wurden nicht beobachtet und so erhielt das MVA im Jahr 1977 durch das Paul-Ehrlich-Institut seine erste Zulassung als Vorimpfstoff bei der Pockenschutzimpfung (Mayr et al., 1978; Stickl et al., 1974). Nach der Ausrottung des Variolavirus und der damit verbundenen Abschaffung der Impfpflicht im Jahr 1980 verlor man zunächst auch das Interesse an MVA als verbesserter Pockenimpfstoff. Dies änderte sich aber schon bald durch neue molekularbiologische Erkenntnisse und Methoden, die es erlaubten, das Genom des Vacciniavirus zu entschlüsseln und gezielt gentechnisch zu verändern (Mackett et al., 1982; Panicali und Paoletti, 1982). Bereits 1988 diente eine Saatviruspräparation des MVA (572.FHE, 22.02.1974) zur Klonierung des Virus und genetischen Kartierung des MVA-Genoms (auf der Basis des klonalen MVA F6). Die Genomanalyse zeigte, dass MVA während der Attenuierung auf FHE Zellen viele Deletionen erfahren und insgesamt etwa 15 % der genetischen Information des ursprünglichen CVA verloren hatte. Die Veränderungen im MVA-Genom konnten bereits damals viralen Genfunktionen zugeordnet werden, die eine essenzielle Rolle bei der Regulation der in vitro und in vivo Vermehrung von Vacciniaviren spielen (Meyer et al., 1991). Erst kürzlich konnten

erste, bei Eukaryonten hoch konservierte, zelluläre Proteine identifiziert werden, die als Restriktionsfaktoren der Pockenvirusvermehrung dienen können und offensichtlich die Ziele dieser regulatorischen Viruspro-teine darstellen (Sivan et al., 2015). Somit lässt sich die in verschiedenen Tierspezies festgestellte Vermehrungsdefizienz des MVA endlich besser erklären, lange nachdem die entsprechenden Genfunktionen als wahrscheinliche Grundlage für die starke Abschwächung der krankmachenden Eigenschaften des MVA erstmals beschrieben waren (Meyer et al., 1991; Sutter, 1990). Spätere Volllängensequenzierungen des MVA-Genoms bestätigten die Ergebnisse der Genomkartierungen und zeigten auch die vollständige Identität der kodierenden Genomsequenzen des MVA F6 und anderer klonaler Isolate des MVA (Antoine et al., 1998; Wyatt et al., 2004). In den ersten Jahren des 21. Jahrhunderts erwachte auch wieder das Interesse an MVA als moderner Vacciniavirus-Ersatzimpfstoff gegen Pocken. Die mögliche Bedrohung durch gezielte bioterroristische Freisetzung humanpathogener Orthopockenviren hatte den Wunsch öffentlicher Gesundheitssysteme nach neuen, effizienten Pockenschutzimpstoffen aufkommen lassen. Neue Studien in verschiedenen Tiermodellen für die Variolavirus-Infektion des Menschen unterstützten die Immunogenität und Wirksamkeit von MVA als Impfstoff gegen Orthopockenviren (Drexler et al., 2003; Kremer et al., 2012a; Paran et al., 2009; Samuelsson et al., 2008; Volz et al., 2014). Gleichzeitig wurde in Europa und insbesondere den USA über staatliche Finanzierung die klinische Entwicklung eines modernen MVA-Impfstoffes vorangetrieben, der in Europa und Kanada bereits wieder als zugelassener Impfstoff gegen Variolavirus zur Verfügung steht (European Medicines Agency, 2013).

Rekombinante MVA als Vektoren für Genexpression und Impfstoffforschung

Die Herstellung von rekombinanten MVA-Viren basiert auf standardisierten molekularbiologischen und virologischen Verfahren, unter der Verwendung von Serumfreien Zellkulturmedien und der Konstruktion von Marker-freien rekombinanten Viren (zur Übersicht: Kremer et al., 2012b). Grundsätzlich sind die Methoden den bekannten Protokollen zur Herstellung herkömmlicher Vacciniavirus-Vektoren sehr ähnlich (Broder und Earl, 1999). Die wohl einfachste Methode zur Insertion von Fremdgenen in das MVA-Genom nutzt den Mechanismus der homologen Rekombination zwischen DNA-Abschnitten gleicher Sequenz. In Transferplasmide klonierte MVA-DNA Sequenzen flankieren die Fremd-DNA und ermöglichen die gezielte Anlagerung an homologe DNA-Sequenzen im MVA-Genom. Durch die Rekombination erfolgt der Einbau der heterologen Gensequenzen im Genom präzise an der Stelle zwischen den gewählten flankierenden MVA-DNA-Sequenzen. Die natürliche Deletionsstelle III im MVA-Genom (Meyer et al., 1991) war der Ort für den ersten Einbau von Fremdgenen bei der Konstruktion rekombinanter MVA (Meyer et al., 1991; Sutter und Moss, 1992; Sutter et al., 1994). Die heute etablierte Nutzung von natürlichen Deletionen oder Stellen zwischen zwei offenen Leserahmen im MVA-Genom ermöglicht, dass andere Genfunktionen des MVA durch die Insertion heterologer DNA-Sequenzen nicht beeinträchtigt werden müssen. So hat sich die Deletionsstelle III über Jahre für den zuverlässigen Einbau von Fremd-DNA bewährt und dient auch heute regelmäßig als Insertionsort bei der Entwicklung neuer MVA-Vektorimpfstoffe (Kreijtz et al., 2014; Song et al., 2013; van den Doel et al., 2014). Es stehen mittlerweile Vektorplasmide mit MVA-Ziel-Sequenzen für unterschiedliche Insertionsstellen zur Verfügung, sodass auch mehrere Fremdgene gleichzeitig in das MVA-Genom eingebracht werden können (Kremer et al., 2012b). Da die Transkription aller viralen Gene im Zytoplasma und unter strikter Regulation des Virus-eigenen Transkriptionsapparats erfolgt, muss die Expression der Fremdgene mittels Vacciniavirus-spezifischer Promotoren kontrolliert werden. Besonders häufig eingesetzt werden hierfür sogenannte Früh-Späte-Promotorsequenzen, die den viralen Transkriptionskomplex während des gesamten Lebenszyklus des Vacciniavirus aktivieren können. Hier zeigt sich auch eine besondere Eigenschaft des in seiner Vermehrungsfähigkeit stark eingeschränkten MVA. Auch in Wirtszellen, in denen keine neuen infektiösen MVA-Virionen gebildet werden können, kommt es zur Expression aller viralen Genklassen (zur Übersicht: Broyles, 2003) und so im Unterschied zu anderen replikationsdefizienten Pockenvirusvektoren zu einer nahezu uneingeschränkten Produktion von viralen und rekombinanten Proteinen (Sutter und Moss, 1992). Die im Vergleich zu voll vermehrungsfähigen Vacciniaviren erstaunlich gute Immunogenität und Wirksamkeit erster MVA-Vektorimpfstoffe (Hirsch et al., 1996; Sutter et al., 1994) kann sicher auch auf die Fähigkeit zur Synthese ausreichender Mengen an Antigen zurückgeführt werden. Trotzdem ist grundsätzlich zu erwarten, dass vermehrungsfähige Vacciniavirus-Vektoren in vivo eine deutlich größere Zahl von Zellen infizieren und so per Immunisierung auch größere Mengen an Antigen produzieren können als MVA-Impfstoffe.

Immunisierende Eigenschaften von MVA-Impfstoffen

Bereits die Charakterisierung des ersten rekombinanten MVA-Vektorimpfstoffs gegen Influenza-A-Viren H1N1 zeigte nach Immunisierung von Mäusen eine überraschend effiziente Anregung von Influenzaantigen-spezifischen Antikörpern und zytotoxischen CD8+ T Zellen (Sutter et al., 1994). Die Induktion schützender Immunität trotz fehlender Vermehrungsfähigkeit und selbst bei der Verabreichung relativ niedriger Dosierungen des MVA-Impfstoffs bestätigte sich auch in späteren Impfstudien (Drexler et al., 2003; Hirsch et al., 1996; Kreijtz et al., 2009b; Kremer et al. 2012a; Volz et al., 2014). Diese bemerkenswerten Befunde erklären sich wohl auch mit dem Fehlen vieler viraler Immunevasionsfaktoren im MVA-Genom, sodass das MVA im Gegensatz zu herkömmlichen Vacciniaviren nach Infektion bzw. Immunisierung wichtige angeborene Immunantworten wirksam aktivieren kann (Büttner et al., 1995; Delaloye et al., 2009; Förster et al., 1994; Halle et al., 2009). Hervorzuheben sind hierbei vor allem die MVA-spezifische Induktion von Typ I Interferonen sowie die Produktion anderer Zytokine und Chemokine, die das Einwandern von Immunzellen an den Ort der MVA-Inokulation stimulieren und Antigen-spezifische adaptive Immunantworten besonders aktivieren können (Lehmann et al., 2009; Price et al., 2013; Price et al., 2015; Waibler et al., 2009).

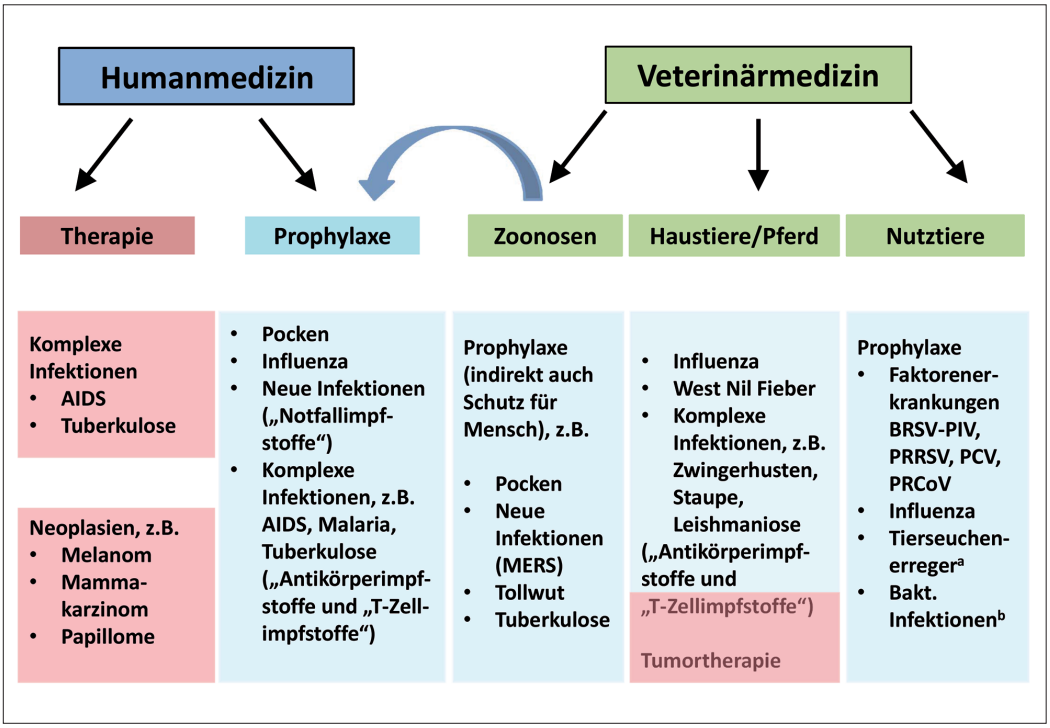

ABBILDUNG 1: *Vergleich aktueller und potenzieller Anwendungen für die Entwicklung von MVA-Vektorimpfstoffen in Human- und Veterinärmedizin. MERS – Middle East Respiratory Syndrome; BRSV – Bovines Respiratorisches Synzytial Virus, PIV – Parainfluenzavirus als Erreger der Enzootischen Bronchopneumonie beim Rind, PRRSV – Porzines Repropduktives und Respiratorisches Syndrom Virus, PCV – Porzines Circovirus, PRCoV – Porzines Respiratorisches Coronavirus als Erreger von Atemwegserkrankungen beim Schwein; a – Forschung und Entwicklung für Impfstoffe gegen neuauftretende Infektionen, wie z. B. Afrikanische Schweinepest; b – Forschung und Entwicklung für Impfstoffe zur Bekämpfung von Antibiotika-resistenten Erregern.*

MVA-Vektorimpfstoffe in der Veterinärmedizin

In der Humanmedizin haben bereits zahlreiche rekombinante MVA-Impfstoffe die Phasen I bis III der klinischen Prüfung erreicht (zur Übersicht siehe: Gilbert, 2013; Gómez et al., 2013; Kreijtz et al., 2013). Im Vordergrund der Untersuchungen stehen hierbei Testimpfstoffe gegen wichtige Infektionskrankheiten des Menschen, wie z. B. AIDS, Hepatitis B und C, Influenza, Tuberkulose und Malaria. Andere rekombinante MVA werden bei der Entwicklung von Immuntherapien gegen Krebserkrankungen erprobt. Ergebnisse einer großen klinischen Studie zur Immuntherapie von Papillomavirus-assoziierten intraepithelialen Läsionen bei mehr als 1300 Patienten in Mexiko unterstützen die Wirksamkeit wiederholter intra-uteriner, intra-urethraler sowie intra-epithelialer Applikationen von MVA E2, einem rekombinanten Virus zur Synthese des E2 Antigens des Bovinen Papillomavirus (Rosales et al., 2014; Valdez Graham et al., 2000). Anwendungen für rekombinante MVA in der Humanmedizin betreffen somit insbesondere die Entwicklung von Impfstoffen gegen komplexere Erkrankungen, welche die Anregung von spezifischen Antikörpern und T-Zellantworten wünschenswert machen. Die Entwicklung von MVA-Vektorimpfstoffen für den Bereich Veterinärmedizin befindet sich dagegen mit wenigen Konstrukten und erst vereinzelten Untersuchungen in einer Zieltierspezies noch in den Anfängen. Grundsätzlich bietet die Veterinärmedizin jedoch im Vergleich noch mehr Möglichkeiten für den Einsatz von MVA-Impfstoffen (Abb. 1). In der Haustier- und Pferdemedizin erscheinen, wie in der Humanmedizin, neben der Infektionsprophylaxe auch immuntherapeutische Anwendungen medizinisch und wirtschaftlich sinnvoll. Im Bereich der Nutztiere steht sicherlich die Prävention im Vordergrund mit einer Vielzahl wirtschaftlich bzw. tierseuchenrechtlich bedeutender Infektionserkrankungen. Schließlich sollte eine Verwendung von MVA-Vektorvakzinen in Tierreservoiren für Zoonoseerreger auch einen wichtigen Beitrag zur Prävention von Zoonosen in Humanpopulationen leisten können. Erste Ergebnisse mit veterinärmedizinischen MVA-Impfstoffen sind vielversprechend. Die Immunogenität eines MVA-Vektorimpfstoffes im Schwein konnte erstmals mit einem rekombinanten MVA gezeigt werden, welches die Hüllproteine prM und E des Japanischen Enzephalitis-Virus synthetisieren konnte (Nam et al., 1999; Nam und Cho, 2002). Als erster MVA-Impfstoff in Pferden erwies sich ein Vektorvirus zur Verabreichung von Influenza-A-Virus H3-Antigen als immunogen und protektiv gegen die Belastungsinfektion mit homologen Influenzaviren H3N8 (Breathnach et al., 2006; Breathnach et al., 2004). Die Impfung von Kälbern mit rekombinanten MVA zur Expression der Oberflächenantigene F und G des Bovinen Respiratorischen Synzytial-Virus erwies sich als sicher, immunogen und schützte vor hoher Viruslast und schwerer Erkrankung der unteren Atemwege nach einer Belastungsinfektion (Antonis et al., 2007). Bei der ersten Anwendung als Geflügelimpfstoff vermittelte die einmalige intramuskuläre Immunisierung von Hühnern mit 10^8 plaque-bildenden Einheiten (pfu) eines MVA-Influenza-H5-Impfstoffes (MVA-HA-VN/04) eine solide Schutzwirkung gegen die tödliche Belastungsinfektion mit hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren H5N1 (Veits et al., 2008). Erste Impfexperimente in Hunden zeigten die Immunogenität von zwei experimentellen MVA-Impfstoffen gegen Leishmaniose (Carson et al., 2009; Ramos et al., 2008). Ziel dieser Immunisierungen unter Verwendung der *Leishmania* Antigene TRYP und LACK ist neue Impfstrategien zu entwickeln, die eine Übertragung des Zoonoseerregers *Leishmania infantum* vom Reservoirwirt Hund auf den Menschen verhindern können. Weitere MVA-Vektorimpfstoffe dienten als Testimpfstoffe zur Bekämpfung wichtiger Tierseuchenerreger. So basieren erste rekombinante MVA-Impfstoffe gegen die Afrikanische Pferdepest auf der Produktion der Kapsidproteine VP2, den wichtigsten Zielantigenen

zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen Afrikanische Pferdepest-Viren (Castillo-Olivares et al., 2011; Chiam et al., 2009). Dabei wurde zur MVA-vermittelten Expression der VP2 Gensequenz der gut charakterisierte aber nur moderat starke Promotor P7.5 eingesetzt. Trotzdem schützte eine zweimalige Impfung mit 10^8 pfu MVA-VP2 Pferde in einem klinischen Test vollständig vor Erkrankung und Tod nach hochdosierter Belastungsinfektion (Alberca et al., 2014). Ein erster Testimpfstoff gegen die Pest der kleinen Wiederkäuer zeigte in Ziegen bereits nach Verabreichung von nur zweimal 10^5 pfu rekombinanten MVA sehr gute Schutzwirkung (Chandran et al., 2010). Die hier beobachtete Wirksamkeit der Vektorimpfstoffe bei niedriger Dosierung erklärt sich auch mit dem Einsatz des vielfach stärkeren synthetischen Promoters PmH5 zur Transkriptionskontrolle der rekombinanten H und F Gene des Virus der Pest der kleinen Wiederkäuer. Dieser Promotor und ähnliche synthetische Promotoren mit starker Transkriptionsaktivität gelten heute als wichtige Komponenten bei der Entwicklung und Untersuchung neuer MVA-Vektorimpfstoffe (Kremer et al., 2012b). Ein gutes Beispiel hierfür sind die jüngsten Arbeiten zur Entwicklung rekombinanter MVA als Plattformtechnologie für Impfstoffe gegen neuauftretende Erreger.

Rekombinante MVA als Impfstoffe gegen neuauftretende Infektionskrankheiten

Die biologische Sicherheit des MVA und bereits etablierte Verfahren zur gentechnologischen Herstellung, präklinischen Charakterisierung und klinischen Prüfung rekombinanter MVA unterstützten auch die Verwendung des Vektorsystems für möglichst schnelle Immunisierungen bei plötzlich auftretenden Virusinfektionen. Ziel dieser Strategie muss sein, dass Notfallimpfstoffe gegen ausgewählte Erreger mit Risikopotential bereits hergestellt und zumindest teilweise klinisch geprüft sind, um bei einem Ausbruch sofort eingesetzt werden zu können. Erste MVA-Impfstoffe gegen aktuelle Zoonoseerreger – Influenzaviren und Coronaviren – können hier beispielhaft für die Entwicklung solcher Notfall-Impfstoffe aufgeführt werden. Seit 2003 treten hoch pathogene aviäre Influenza-A-Viren H5N1 regelmäßig als Erreger schwerer Atemwegserkrankungen (atypische Pneumonien mit Lungenversagen) beim Menschen auf und nur wenige Mutationen im Virusgenom könnten bereits ausreichen, eine effiziente Übertragung des Virus von Mensch-zu-Mensch und eine pandemische Ausbreitung der Infektionen zu ermöglichen (Übersicht: Imai et al., 2013; Su et al., 2015). MVA-H5-Vektorimpfstoffe zur Produktion des HA Antigens des Influenzavirus-Stammes A/Vietnam/2004 (MVA-HA-VN/04) induzierten Antikörperantworten, die mit antigenetisch unterschiedlichen Influenza-A-Viren H5N1 kreuzreagierten und Mäuse waren gegen Belastungsinfektionen mit homologen und heterologen H5N1-Viren geschützt (Kreijtz et al., 2009a; Kreijtz et al., 2007). Der MVA-HA-VN/04 Impfstoff erwies sich auch bei der Immunisierung von Makaken als sicher und wirksam (Kreijtz et al., 2009b). Eine zweimalige intramuskuläre Verabreichung von 10^8 pfu MVA-HA-VN/04 führte zur Bildung von Serumantikörpern, die die H5-spezifische Hämagglutination hemmten und H5N1-Viren in der Zellkulturinfektion neutralisierten. Nach der intratrachealen Belastungsinfektion mit homologem Influenzavirus A/Vietnam/2004 bzw. mit heterologem Influenzavirus A/Indonesia/2005 erwies sich die Vermehrung der H5N1 Influenzaviren in den oberen Atemwegen und in der Lunge bei geimpften Tieren stark reduziert und schützte die Impflinge vor jeglicher Erkrankung. Bei Kontrolltieren kam es dagegen zu einer ungebremsten Vermehrung der hochpathogenen Influenzaviren mit der Entwicklung schwerer interstitieller Bronchopneumonien. Die erfolgversprechenden Ergebnisse aus diesen präklinischen Untersuchungen ermöglichten auch die Prüfung des MVA-HA-VN/04-Impfstoffes in einem ersten Phase I/IIa Klinischen Versuch an 80 Probanden am Klinikum der Erasmusuniversität Rotterdam (Kreijtz et al., 2014). Der Impfstoff war gut verträglich und zeigte ein Nebenwirkungsprofil, das mit den Ergebnissen aus anderen Phase-I-Studien mit MVA-Vektorimpfstoffen sehr vergleichbar war. Die zweimalige intramuskuläre Verabreichung des Impfstoffs im Abstand von vier Wochen führte zur Anregung von H5N1-spezifischen Antikörpern, deren Titer eine schützende Wirkung der Immunisierung erwarten lassen. Ein besonders bemerkenswertes Ergebnis der Studie war, dass Wiederholungsimpfungen in einem Abstand von zwölf Monaten nach der Erstimmunisierung zu einer unerwartet deutlichen Steigerung der H5-spezifischen Antikörperantworten führten. Die ausgeprägte Booster-Reaktion zeigte sich auch nach nur einmaliger Erstverabreichung, nach Gabe zehnfach reduzierter Impfdosis (10^7 pfu Dosis) und trotz des Vorliegens MVA-spezifischer Antikörper im Serum der Patienten. Diese Daten zeigen erstmals, dass es grundsätzlich von Vorteil sein könnte Wiederholungsimpfungen mit MVA-Vektorimpfstoffen in einem zeitlich größeren Intervall zu verabreichen. Außerdem unterstützen die Ergebnisse der Studie die Möglichkeit, der Bedrohung durch verschiedene Influenzaviren als potenzielle Pandemieerreger mit neuen Immunisierungsstrategien wirksamer zu begegnen. Die bei der Impfung mit dem H5 Antigen des H5N1 Influenzavirus-Stammes A/Vietnam/2004 induzierten Antikörper konnten auch mit dem erst 2014 identifizierten hochpathogenen aviären Influenzavirus H5N8 kreuzreagieren (de Vries et al., 2015). Dabei korrelierte die Höhe der Titer der induzierten H5-spezifischen Antikörper mit deren Fähigkeit zur Kreuzneutralisation. Ein weiterer neuer Kandidat mit Pandemiepotential ist das aviäre H7N9-Influenzavirus, das erst seit 2013 in China als Erreger von lebensbedrohlichen Infektionen beim Menschen identifiziert wurde (Gao et al., 2013). Die Bekämpfung des H7N9 Virus in Geflügelbeständen ist schwierig, da es sich um einen für Hühnervögel niedrigpathogenen Erreger handelt und die Infektionen meist nur bei Diagnostikmaßnahmen erkannt werden. Es kommt in China weiterhin zu Humaninfektionen durch H7N9-Viren mit einer Häufung der Fälle in den Wintermonaten 2013/2014 und 2014/2015. Mit der Verfügbarkeit erster Gensequenzen aus Humanisolaten des H7N9 Virus startete die präklinische Entwicklung eines MVA-Impfstoffkandidaten zur Verabreichung des H7 Antigens des Influenzavirus A/Shanghai/2/2013 (MVA-H7-Sh2). Erste Impfexperimente bestätigten kürzlich Immunogenität und Schutzwirkung dieses Impfstoffes bei Frettchen. Eine zweimalige intramuskuläre Applikation von 10^8 pfu des MVA-H7-Sh2 schützen die hoch empfänglichen Tiere vor jeglicher Erkrankung nach

Belastungsinfektion. Mit nicht-rekombinantem MVA geimpfte Kontrolltiere entwickelten dagegen schwere akute Pneumonien mit ausgeprägter Schädigung des Lungengewebes nach intratrachealer Belastungsinfektion mit H7N9 Influenzavirus A/Anhui/1/2013 (Kreijtz et al., 2015).

Seit dem Jahr 2003 stehen immer wieder verschiedene Coronaviren als neue Zoonoseerreger im Fokus des öffentlichen Interesses. Zwei Vertreter der Gruppe der Beta-Coronaviren sprangen von Tieren, das Hauptreservoir bilden offenbar verschiedene Fledermausarten, auf den Menschen und verursachten atypische Pneumonien mit z. T. fatalem Verlauf durch akutes Lungenversagen, das SARS (severe acute respiratory syndrome) Coronavirus (SARS-CoV) und das Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (Übersicht: Graham et al., 2013). Für beide Erreger stehen bisher noch keine für die Anwendung im Menschen zugelassenen Impfstoffe zur Verfügung, die bei Ausbrüchen zur sofortigen Notimpfung von Risikogruppen (z. B. Ersthelfer und Krankenhauspersonal) eingesetzt werden könnten. Nach der großen SARS Epidemie in Asien im Jahr 2003 und der Verschleppung des Virus nach Europa und Nordamerika wurden im letzten Jahrzehnt keine neuen Infektionen des Menschen mit SARS-CoV festgestellt. Vermutlich persistiert das Virus in einem Reservoirwirt, der nur selten eine Übertragung in die Humanpopulation ermöglicht. Das im Jahr 2012 erstmals als Krankheitserreger entdeckte MERS-CoV verursacht dagegen regelmäßige Neuinfektionen des Menschen (Zaki et al., 2012). Bisher sind nach Angaben der WHO (Stand 6. Juli 2015) insgesamt 1368 durch Laboruntersuchungen bestätigte Infektionen mit MERS-CoV aufgetreten, davon verliefen mindestens 487 Fälle tödlich. Der Hauptteil der Humaninfektionen betrifft das Königreich Saudi Arabien und die Golfstaaten im Mittleren Osten. Dromedare werden als ein wichtiges Tierreservoir des MERS-CoV angesehen und spielen vermutlich eine Rolle bei der Erstinfektion des Menschen. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung des Virus ist möglich. Bekannt sind begrenzte Infektketten im Familienbereich, in Krankenhäusern und Pflegestationen sowie Verbreitung des Virus durch erkrankte Reisende nach Europa, Nordamerika und Asien. Als besonders gefährdet für einen schweren Verlauf der Infektion gelten ältere Patienten mit Vorerkrankungen und Personen mit geschwächtem Immunsystem (zur Übersicht: Milne Price et al., 2014). Personal in medizinischen Einrichtungen gilt daher auch als wichtige Zielgruppe für den möglichen Einsatz eines prophylaktischen Impfstoffes. Bereits ein Jahr nach der Entdeckung des MERS-CoV stand ein rekombinantes MVA als potenzieller Impfstoffkandidat zur Verfügung, das die stabile Expression des Spike (S) Glykoproteins des MERS-CoV erlaubte (MVA-MERS-S; Song et al., 2013). Das Spike-Oberflächenprotein der Coronaviren gilt als ein vielversprechendes Impfantigen, da es ein wesentliches Zielprotein für Virus-neutralisierende Antikörper darstellt. Inzwischen ist die präklinische Charakterisierung des MVA-MERS-S-Impfstoffes weiter fortgeschritten (Volz et al., 2015). Immunisierungen im Mausmodell belegten eine Dosis-abhängige Bildung von MERS-CoV neutralisierenden Antikörpern und virusspezifischen CD8+ T Zellen nach subkutaner oder intramuskulärer Applikation des Testimpfstoffes. Des Weiteren konnten wichtige Daten erhoben werden, die die Sicherheit und Wirksamkeit einer MVA-MERS-S Impfung unterstützen. In Mäusen, die gentechnologisch mit dem funktionellen Rezeptor für das MERS-CoV ausgestattet wurden, verhinderte eine zweimalige Verabreichung des MVA-MERS-S-Impfstoffs die Vermehrung des MERS-CoV und schützte vor akuten Entzündungen des Lungengewebes infolge der Belastungsinfektion. Diese Ergebnisse sind erfolgversprechend im Hinblick auf die angestrebte klinische Prüfung des MVA-MERS-S-Vektorimpfstoffes.

Ausblick

Rekombinante MVA zählen derzeit zu den aussichtsreichsten viralen Vektorimpfstoffen in der präklinischen und klinischen Forschung. Eine obligat Virus-spezifische Steuerung der Genexpression, genetische Stabilität, Unbedenklichkeit für die allgemeine Umwelt, etablierte Produktionsverfahren, Immunogenität sowie bereits umfangreiche Daten zur klinischen Sicherheit sind wichtige Eigenschaften des Ausgangsvirus MVA, die die Erprobung zahlreicher MVA-Vektorimpfstoffe beim Menschen ermöglichten. Besonders bemerkenswert sind hier jüngste Erkenntnisse, dass auch wiederholte Immunisierungen in Anwesenheit von starker Orthopockenvirus-spezifischer Immunität im Menschen die spezifischen Immunantworten gegen das rekombinante Zielantigen signifikant steigern können (Kreijtz et al., 2014). Auch in der Veterinärmedizin eröffnet der Einsatz gentechnologisch entwickelter Arzneimittel vielfältige neue Möglichkeiten in Prophylaxe und Therapie. Erste Ergebnisse aus der Untersuchung von MVA-Vektorimpfstoffen in verschiedenen Zieltierspezies sind sehr vielversprechend. Rekombinante MVA werden durch die flexible Nutzungsmöglichkeit als Plattformtechnologie in der veterinärmedizinischen Immunprophylaxe und Immuntherapie sicher zunehmend an Bedeutung gewinnen. Das in der Humanmedizin dokumentierte exzellente Sicherheitsprofil der Viren bietet viele Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Impfstoffe für Haus- und Nutztiere. Gerade bei der Immunisierung von Tieren, die zur Gewinnung von Lebensmitteln dienen, sollten die fehlende Vermehrungsfähigkeit und die rasche Eliminierung des Impfvirus eine gute Akzeptanz der Vektorimpfstoffe sicherstellen.

Conflict of interest

Asisa Volz, Robert Fux und Gerd Sutter sind Erfinder in Patentanträgen oder Patenten im Bereich MVA-Vektorimpfstoffe. Ansonsten bestehen keine finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

Alberca B, Bachanek-Bankowska K, Cabana M, Calvo-Pinilla E, Viaplana E, Frost L, Gubbins S, Urniza A, Mertens P, Castillo-Olivares J (2014): Vaccination of horses with a recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA) expressing African horse sickness (AHS) virus major capsid protein VP2 provides complete clinical protection against challenge. Vaccine 32: 3670–3674.

Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG (1998): The complete genomic sequence of the Modified Vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses. Virology 244: 365–396.

Antonis AFG, Van Der Most RG, Suezer Y, Stockhofe-Zurwieden N, Daus F, Sutter G, Schrijver RS (2007): Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge. Vaccine 25: 4818–4827.

Breathnach CC, Clark HJ, Clark RC, Olsen CW, Townsend HGG, Lunn DP (2006): Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge. Vaccine 24: 1180–1190.

Breathnach CC, Rudersdorf R, Lunn DP (2004): Use of recombinant modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. Vet Immunol Immunopathol 98: 127–136.

Broder C, Earl P (1999): Recombinant vaccinia viruses. Mol Biotechnol 13: 223–245.

Broyles SS (2003): Vaccinia virus transcription. J Gen Virol 84: 2293–2303.

Büttner M, Czerny CP, Lehner KH, Wertz K (1995): Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. Vet Immunol Immunopathol 46: 237–250.

Carson C, Antoniou M, Ruiz-Argüello MB, Alcami A, Christodoulou V, Messaritakis I, Blackwell JM, Courtenay O (2009): A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. Vaccine 27: 1080–1086.

Castillo-Olivares J, Calvo-Pinilla E, Casanova I, Bachanek-Bankowska K, Chiam R, Maan S, Nieto JM, Ortego J, Mertens PPC (2011): A Modified Vaccinia Ankara virus (MVA) vaccine expressing African Horse Sickness Virus (AHSV) VP2 protects against AHSV challenge in an IFNAR –/– mouse model. PLoS ONE 6: e16503.

Chandran D, Reddy KB, Vijayan SP, Sugumar P, Rani GS, Kumar PS, Rajendra L, Srinivasan VA (2010): MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge. Ind J Microbiol 50: 266–274.

Chiam R, Sharp E, Maan S, Rao S, Mertens P, Blacklaws B, Davis-Poynter N, Wood J, Castillo-Olivares J (2009): Induction of Antibody Responses to African Horse Sickness Virus (AHSV) in Ponies after Vaccination with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA). PLoS ONE 4: e5997.

Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel Q-G, Le Roy D, Knaup Reymond M, Akira S, Petrilli V, Gomez CE, Perdiguero B, Tschopp J, Pantaleo G, Esteban M, Calandra T (2009): Innate Immune Sensing of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Is Mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 Inflammasome. PLoS Pathog 5: e1000480.

De Vries RD, De Gruyter HLM, Bestebroer TM, Pronk M, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Sutter G, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF (2015): Induction of influenza (H5N8) antibodies by Modified Vaccinia virus Ankara H5N1 vaccine. Emerg Infect Dis 21:1086-1088.

Drexler I, Staib C, Kastenmüller W, Stevanović S, Schmidt B, Lemonnier FA, Rammensee H-G, Busch DH, Bernhard H, Erfle V, Sutter G (2003): Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines. Proc Natl Acad Sci USA 100: 217–222.

European Medicines Agency (2013): Imvanex: modifiziertes Vacciniavirus Ankara lebend. EMA/490157/2013. European Medicines Agency, London,United Kingdom.

Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID (1988): Smallpox and its Eradication. World Health Organization, 6th ed. Geneva.

Förster R, Wolf G, Mayr A (1994): Highly attenuated poxviruses induce functional priming of neutrophils in vitro. Arch Virol 136: 219–226.

Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Y (2013): Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. N Eng J Med 368: 1888–1897.

Gilbert SC (2013): Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. Vaccine 31: 4241–4246.

Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M (2013): Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. Expert Rev Vaccines 12: 1395–1416.

Graham RL, Donaldson EF, Baric RS (2013): A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. Nat Rev Micro 11: 836–848.

Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, Suezer Y, Hämmerling G, Garbi N, Sutter G, Worbs T, Förster R (2009): Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. J Exp Med 206: 2593–2601.

Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S (2014): Poxviruses and the evolution of host range and virulence. Infect Gen Evolut 21: 15–40.

Herrlich A, Mayr A (1957): Pockenimpfstoff aus Zungengewebekulturen vom Rind. Arch ges Virusforsch 7: 284–296.

Hirsch VM, Fuerst TR, Sutter G, Carroll MW, Yang LC, Goldstein S, Piatak M, Elkins WR, Alvord WG, Montefiori DC, Moss B, Lifson JD (1996): Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. J Virol 70: 3741–3752.

Imai M, Herfst S, Sorrell EM, Schrauwen EJA, Linster M, De Graaf M, Fouchier RaM, Kawaoka Y (2013): Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. Virus Res 178: 10.1016/j.virusres.2013.1007.1017.

Kreijtz JHCM, Gilbert SC, Sutter G (2013): Poxvirus vectors. Vaccine 31: 4217–4219.

Kreijtz JHCM, Goeijenbier M, Moesker FM, Van Den Dries L, Goeijenbier S, De Gruyter HLM, Lehmann MH, Mutsert GD, Van De Vijver DaMC, Volz A, Fouchier RaM, Van Gorp ECM, Rimmelzwaan GF, Sutter G, Osterhaus ADME (2014): Safety and immunogenicity of a modified-vaccinia-virus-Ankara-based influenza A H5N1 vaccine: a randomised, double-blind phase 1/2a clinical trial. The Lancet Infect Dis 14: 1196–1207.

Kreijtz JHCM, Suezer Y, De Mutsert G, Van Amerongen G, Schwantes A, Van Den Brand JMA, Fouchier RaM, Löwer J, Osterhaus ADME, Sutter G, Rimmelzwaan GF (2009a): MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. PLoS ONE 4: e7790.

Kreijtz JHCM, Suezer Y, de Mutsert G, van Den Brand JMA, van Amerongen G, Schnierle BS, Kuiken T, Fouchier RaM, Löwer J, Osterhaus ADME, Sutter G, Rimmelzwaan GF (2009b): Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. Vaccine 27: 6296–6299.

Kreijtz JHCM, Suezer Y, Van Amerongen G, de Mutsert G, Schnierle BS, Wood JM, Kuiken T, Fouchier RaM, Löwer RaM, Osterhaus ADME, Sutter G, Rimmelzwaan GF (2007): Recombinant Modified Vaccinia virus Ankara–based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. J InfectDis 195: 1598–1606.

Kreijtz JHCM, Wiersma LCM, De Gruyter HLM, Vogelzang-Van Trierum SE, Van Amerongen G, Stittelaar KJ, Fouchier RaM, Osterhaus ADME, Sutter G, Rimmelzwaan GF (2015): A single immunization with Modified Vaccinia virus Ankara–based influenza virus H7 vaccine affords protection in the influenza A(H7N9) pneumonia ferret model. J Infect Dis 211: 791–800.

Kremer M, Suezer Y, Volz A, Frenz T, Majzoub M, Hanschmann K-M, Lehmann MH, Kalinke U, Sutter G (2012a): Critical role of perforin-dependent CD8+ T cell immunity for rapid protective vaccination in a murine model for human smallpox. PLoS Pathog 8: e1002557.

Kremer M, Volz A, Kreijtz JHCM, Fux R, Lehmann MH, Sutter G (2012b): Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA. Meth Mol Biol 890: 59–93.

Lane JM, Millar JD (1969): Routine childhood vaccination against smallpox reconsidered. N Engl J Med 281: 1220–1224.

Lehmann MH, Kastenmüller W, Kandemir J, Brandt F, Suezer Y, Sutter G (2009): Modified Vaccinia virus Ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. J Virol 83: 2540–2552.

Mackett M, Smith GL, Moss B (1982): Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proc Natl Acad Sci USA 79: 7415–7419.

Mayr A, Munz E (1964): Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen. Zentralbl Bakteriol Parasit Infek Hyg 1. Orig 195: 24–35.

Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H (1975): Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3: 6–14.

Mayr A, Stickl H, Müller H (1978): The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. Zentralbl Bakteriol B 167: 375–390.

McFadden G (2005): Poxvirus tropism. Nat Rev Micro 3: 201–213.

Meyer H, Sutter G, Mayr A (1991): Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J GenVirol 72: 1031–1038.

Milne Price S, Miazgowicz KL, Munster VJ (2014): The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus, Vol 71, 121–136 pp.

Moss B (1996): Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proc Natl Acad Sci 93: 11341–11348.

Nam J-H, Wyatt LS, Chae S-L, Cho H-W, Park Y-K, Moss B (1999): Protection against lethal Japanese encephalitis virus infection of mice by immunization with the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus expressing JEV prM and E genes. Vaccine 17: 261–268.

Nam Jh CS, Hw Cho (2002): Immunogenicity of a recombinant MVA and a DNA vaccine for Japanese encephalitis virus in swine. Microbiol Immunol 46: 23–28.

Panicali D, Paoletti E (1982): Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4927–4931.

Paran N, Suezer Y, Lustig S, Israely T, Schwantes A, Melamed S, Katz L, Preuß T, Hanschmann K-M, Kalinke U, Erez N, Levin R, Velan B, Löwer J, Shafferman A, Sutter G (2009): Postexposure immunization with Modified Vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox. J Infect Dis 199: 39–48.

Price P, Torres-Dominguez L, Brandmuller C, Sutter G, Lehmann MH (2013): Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. Vaccine 31: 4231–4234.

Price P, Bánki Z, Scheideler A, Stoiber H, Verschoor A, Sutter G, Lehmann MH (2015): Complement component C5 recruits neutrophils in the absence of C3 during respiratory infection with Modified Vaccinia virus Ankara. J Immunol 194: 1164–1168.

Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, Larraga V (2008): Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. Vaccine 26: 333–344.

Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DS (1987): Disseminated Vaccinia in a Military Recruit with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Disease. N Eng J Med 316: 673–676.

Rosales R, López-Contreras M, Rosales C, Magallanes-Molina J-R, Gonzalez-Vergara R, Arroyo-Cazarez JM, Ricardez-Arenas A, Del Follo-Valencia A, Padilla-Arriaga S, Guerrero MV, Pirez MA, Arellano-Fiore C, Villarreal F (2014): Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine. Hum Gen Ther 25: 1035–1049.

Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Chaplin P, Suter M, O'keeffe M, Hochrein H (2008): Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. J Clin Invest 118: 1776–1784.

Sivan G, Ormanoglu P, Buehler EC, Martin SE, Moss B (2015): Identification of restriction factors by human genome-wide RNA interference screening of viral host range mutants exemplified by discovery of SAMD9 and WDR6 as inhibitors of the vaccinia virus K1L-C7L-mutant. mBio 6: e01122-15.

Song F, Fux R, Provacia LB, Volz A, Eickmann M, Becker S, Osterhaus ADME, Haagmans BL, Sutter G (2013): Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike protein delivered by Modified Vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies. J Virol 87: 11950–11954.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A (1974): MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. Dtsch med Wochenschr 99: 2386–2392.

Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S (2015): The epidemiology, evolution and recent outbreaks of avian influenza viruses in China: A Review. J Virol 89: 8671–8676.

Sutter G (1990): Das Genom des Vacciniavirusstammes Ankara und seine Änderung während der Attenuierung. München, LMU Tierärztliche Fakultät, Diss.

Sutter G, Moss B (1992): Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10847–10851.

Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B (1994): A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. Vaccine 12: 1032–1040.

Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet J-C, Cox WI, Davis SW, an Der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, Languet B, Paoletti E (1992): NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. Virology 188: 217-232.

Valdez Graham V, Sutter G, José MV, García-Carranca A, Erfle V, Moreno Mendoza N, Merchant H, Rosales R (2000): Human tumor growth is inhibited by a vaccinia virus carrying the E2 gene of bovine papillomavirus. Cancer 88: 1650–1662.

Van Den Doel P, Volz A, Roose JM, Sewbalaksing VD, Pijlman GP, Van Middelkoop I, Duiverman V, Van De Wetering E, Sutter G, Osterhaus ADME, Martina BEE (2014): Recombinant Modified Vaccinia virus Ankara expressing glycoprotein E2 of Chikungunya virus protects AG129 mice against lethal challenge. PLoS Negl Trop Dis 8: e3101.

Veits J, Römer-Oberdörfer A, Helferich D, Durban M, Suezer Y, Sutter G, Mettenleiter TC (2008): Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions. Vaccine 26: 1688–1696.

Volz A, Kupke A, Song F, Jany S, Fux R, Shams-Eldin H, Schmidt J, Becker C, Eickmann M, Becker S, Sutter G (2015): Protective efficacy of recombinant Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) delivering Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein. J Virol 89: 8651–8656.

Volz A, Langenmayer M, Jany S, Kalinke U, Sutter G (2014): Rapid expansion of CD8+ T cells in wild-type and type I interferon receptor-deficient mice correlates with protection after low-dose emergency immunization with Modified Vaccinia virus Ankara. J Virol 88: 10946–10957.

Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, Schwantes A, Pöhlmann C, Ludwig H, Palomo-Otero M, Alcamí A, Sutter G, Kalinke U (2009): Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses Is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. J Virol 83: 1563–1571.

Wyatt LS, Earl PL, Eller LA, Moss B (2004): Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. Proc Natl Acad Sci USA 101: 4590–4595.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RaM (2012): Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med 367: 1814–1820.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Gerd Sutter
Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen
Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13
80539 München
gerd.sutter@lmu.de