



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 173 T2 2006.07.13**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 312 679 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 173.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 001 379.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **03.07.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/863 (2006.01)**

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
78295 04.07.1995 DK

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

(73) Patentinhaber:
**GSF - Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit GmbH, 80807 München, DE**

(72) Erfinder:
**Sutter, Gerd, 80802 München, DE; Ohlmann,
Marion, 81927 München, DE; Erfle, Volker, 81679
München, DE**

(54) Bezeichnung: **Rekombinante MVA Viren und deren Verwendung**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante Vaccinia-viren, die von dem modifizierten Vaccinia-virus Ankara (MVA) abgeleitet sind und Fremdgene enthalten und exprimieren können, die an der Stelle einer natürlich vorkommenden Deletion im MVA-Genom eingefügt sind, und die Verwendung derartiger rekombinanter MVA-Viren zur Produktion von Polypeptiden, z.B. Antigenen oder therapeutischen Mitteln, oder virale Vektoren zur Gentherapie und die Verwendung derartige Antigene kodierender rekombinanter MVA-Viren als Impfstoffe.

Aufgaben der Erfindung

[0002] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein rekombinantes MVA-Virus bereitzustellen, das als effizienter und außergewöhnlich sicherer Expressionsvektor dienen kann.

[0003] Bei einer anderen Aufgabe der vorliegenden Erfindung handelt es sich um die Bereitstellung eines einfachen, effizienten und sicheren Verfahrens zur Produktion von Polypeptiden, z.B. Antigenen oder therapeutischen Mitteln, rekombinanter Viren für Impfstoffe und viralen Vektoren zur Gentherapie.

[0004] Bei noch einer anderen Aufgabe der vorliegenden Erfindung handelt es sich um die Bereitstellung eines Expressionssystems auf der Basis eines rekombinanter MVA-Virus, das Human Tyrosinase exprimiert, und von Verfahren zur Produktion von Polypeptiden, z.B. Antigenen oder therapeutischen Mitteln, oder zum Bilden von viralen Vektoren zur Gentherapie oder für Impfstoffe auf der Basis dieses Expressionssystems.

Allgemeiner Stand der Technik

[0005] Das Vaccinia-virus, ein Vertreter der Gattung Orthopoxvirus in der Poxviridae-familie, wurde als Lebendimpfstoff zur Immunisierung gegen die Pockenerkrankung beim Menschen verwendet. Eine erfolgreiche weltweite Schutzimpfung mit dem Vaccinia-virus erreichte ihren Höhepunkt in der Ausrottung des Variolavirus, dem Pockenerreger (The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication. History of Public Health, Nr. 4, Geneva: World Health Organization, 1980). Seit dieser Bekanntmachung der WHO wurde die Schutzimpfung, mit Ausnahme für Menschen mit einem hohen Risiko für Poxvirusinfektionen (z.B. Laborarbeiter) allgemein fortgesetzt.

[0006] Unlängst wurden Vaccinia-viren auch zum Konstruieren von viralen Vektoren zur rekombinanter Genexpression und zur möglichen Verwendung als rekombinante Lebendimpfstoffe verwendet (Mackett, M., Smith, G. L., und Moss, B. [1982] P. N. A. S. USA 79, 7415–7419; Smith, G. L., Mackett, M. und Moss, B. [1984] Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2, 383–407). Dies bedingt DNA-Sequenzen (Gene), die für Fremdantigene kodieren, die mit Hilfe von DNA-Rekombinationstechniken in das Genom des Vaccinia-virus eingebracht werden. Wird das Gen an einer für die Lebensdauer des Virus unwichtigen Stelle in der viralen DNA integriert, ist es möglich, dass das neu produzierte rekombinante Vaccinia-virus infektiös ist, d.h. Fremdzellen infizieren und folglich die integrierte DNA-Sequenz exprimieren kann (EP-Patentanmeldungen Nr. 83,286 und Nr. 110,385). Die auf diese Weise hergestellten rekombinanter Vaccinia-viren können einerseits als Lebendimpfstoffe zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen und andererseits zur Herstellung von heterologen Proteinen in eukaryontischen Zellen verwendet werden.

[0007] Das rekombinante Vaccinia-virus, das das Bakteriophage-T7-RNA-Polymerasegen exprimiert, gewährte die Etablierung von allgemein anwendbaren Expressionssystemen zur Synthese von rekombinanter Proteinen in Säugerzellen (Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A. und Fuerst T. R. [1990] Nature 348, 91–92.) In allen Protokollen beruht die rekombinante Genexpression auf der Synthese der T7-RNA-Polymerase im Cytoplasma von eukaryontischen Zellen. Besonders beliebt wurde ein Protokoll über eine transiente expression (Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. und Moss, B. [1986] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122–8126, und die US-Patentanmeldung 7,648,971). Zuerst wird ein Fremdgen von Interesse unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerasepromoters in ein Plasmid eingefügt. Anschließend wird dieses Plasmid mit einem T7-RNA-Polymerase produzierenden rekombinanter Vaccinia-virus unter Verwendung von Standardtransfektionsverfahren in das Cytoplasma von Zellen eingefügt.

[0008] Dieses Transfektionsprotokoll ist einfach, da kein neues rekombinantes Virus hergestellt werden muss und es mit mehr als 80% der das Gen von Interesse exprimierenden Zellen sehr effizient ist (Elroy-Stein, O. und Moss, B. [1990] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6743–6747). Der Vorteil des Vaccinia-virus/T7-RNA-Polymerase-Hybridssystems gegenüber anderen transienten Expressionssystemen liegt sehr wahrscheinlich in dessen Unabhängigkeit von dem Transport von Plasmiden zum Zellkern. In der Vergangenheit war das System

für analytische Zwecke in der Virologie und Zellbiologie äußerst nützlich (Buonocore, L. und Rose, J. K. [1990] *Nature* 345, 625–628, Pattnaik, A. K. und Wertz, G. W. [1991] *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1379–1383, Karschin, A., Aiyar, J., Gouin, A., Davidson, N. und Lester, H. A. [1991] *FEBS Leit.* 278, 229–233, Ho, B. Y., Karschin, A., Raymond, J., Branchek, T., Lester, H. A. und Davidson, N. [1992] *FEBS Lett.* 301, 303–306, Buchholz, C. J., Retzler C., Homann, H. E. und Neubert, W. J. [1994] *Virology* 204, 770–776). Jedoch könnten wichtige künftige Anwendungen des Vacciniaivirus/T7-RNA-Polymerase-Hybridsystems wie z.B. zum Bilden von rekombinanten Proteinen oder rekombinanten viralen Teilchen für neue therapeutische oder prophylaktische Vorgehensweisen bei Menschen durch die produktive Replikation des rekombinanten Vaccinievektors behindert werden.

[0009] Das Vacciniaivirus ist für Menschen infektiös, und nach einer Schutzimpfung während der Pockenausrottungskampagne wurden gelegentliche schwere Komplikationen beobachtet. Der beste Überblick über das Auftreten von Komplikationen ist von einem nationalen Gutachten in den Vereinigten Staaten bereitgestellt, das die Schutzimpfung von etwa 12 Millionen Menschen mit einem Impfstoff auf der Basis des Vacciniaivirusstamms der New York City Board of Health überwachte (Lane, J., Ruben, F., Neff, J. und Millar, J. [1969] *New Engl. J. Med.* 281, 1201–1208). Deshalb wurde die aufregendste Möglichkeit der Verwendung des Vacciniaivirus als Vektor zur Entwicklung von rekombinanten Lebendimpfstoffen von Sicherheitsbedenken und Verordnungen beeinträchtigt. Weiterhin basiert der Hauptteil der in der Literatur beschriebenen rekombinanten Vacciniairen auf dem Vacciniairusstamm von Western Reserve. Andererseits ist es bekannt, dass dieser Stamm eine hohe Neurovirulenz aufweist und folglich zur Verwendung in Menschen und Tieren schlecht geeignet ist (Morita et al., *Vaccine* 5, 65–70 [1987]).

[0010] Für Vektoranwendungen wäre das Gesundheitsrisiko durch die Verwendung eines stark abgeschwächten Vacciniaivirusstamms vermindert. Einige derartige Vacciniaivirusstämme wurden insbesondere entwickelt, um unerwünschte Nebenwirkungen der Pockenschutzimpfung zu vermeiden. Folglich wurde das modifizierte Vaccinisvirus Ankara (MVA) durch Langzeitseriendurchgänge des Ankarastamms des Vacciniaivirus (CVA) bei Hühnerembryofibroblasten gebildet (für einen Überblick, siehe Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. und Stickt, H. [1975] *Infection* 3, 6–14; Swiss Patent No. 568, 392). Das MVA-Virus wurde unter Befolgung der Anforderungen des Budapest Vertrags beim CNCM (Institut Pasteur, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) am 15. Dezember 1987 unter der Hinterlegungsnummer. 1-721 hinterlegt. MVA unterscheidet sich durch seine große Abschwächung, d.h. durch eine verminderte Virulenz oder Infektiosität unter Beibehaltung von guter Immunogenität. Das MVA-Virus wurde analysiert, um Abänderungen im Genon in Bezug auf den CVA-Stamm vom Wildtyp zu bestimmen. Sechs Hauptdeletionen von genomicscher DNA (Deletion I, II, III, IV, V, und VI), insgesamt 31.000 Basenpaare, wurden identifiziert (Meyer, H., Sutter, G. und Mayr A. [1991] *J. Gen. Virol.* 72, 1031–1038). Das resultierende MVA-Virus wurde streng auf Hühnerwirtszellen beschränkt. Des Weiteren ist MVA durch seine extreme Abschwächung charakterisiert. Beim Testen in einer Vielzahl von Tiermodellen erwies sich MVA sogar in immunsupprimierten Tieren als avirulent. Wichtiger zeigten sich die ausgezeichneten Eigenschaften des MVA-Stamms in intensiven klinischen Versuchen (Mayr et al., *Zbl. Bakt. Hyg.* 1, Abt. Org. B 167, 375–390 [1987], Stick, et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386–2392 [1974]). Während diesen Studien in über 120.000 Menschen, einschließlich Patienten mit hohem Risiko, waren keine Nebenwirkungen mit der Verwendung von MVA-Impfstoff verbunden.

[0011] Es wurde gefunden, dass eine MVA-Replikation in menschlichen Zellen bei der Infektion, die den Zusammenschluss von reifen infektiösen Virionen verhindert, spät blockiert wurde. Nichtsdestotrotz konnte MVA virale und rekombinante Gene mit hohen Gehalten sogar in nicht-toleranten Zellen exprimieren, und es wurde vorgeschlagen, dass es als effizienter und außergewöhnlich sicherer Genexpressionsvektor dient (Sutter, G. und Moss, B. [1992] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10847–10851). Unlängst etablierten sich neue Vaccinievektorsysteme auf der Basis von MVA, die Fremd-DNA-Sequenzen aufweisen, die an der Stelle von Deletion III im MVA-Genom oder im TK-Gen eingefügt waren (Sutter, G. und Moss, B. [1995] *Dev. Biol. Stand.* Basel, Karger 84, 195–200 und US-Patent 5.185.146).

[0012] Um die Verwendung von MVA weiter zu verwerten, wurde nach einem neuen möglichen Weg zum Einbringen von Fremdgenen durch DNA-Rekombination in den MVA-Stamm des Vacciniaivirus gesucht. Da eine Abänderung des Genoms des MVA-Virus nicht vorgesehen war, war es nötig, ein Verfahren zu finden, das dieses Erfordernis erfüllte. Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde eine Fremd-DNA-Sequenz in die virale DNA genau an der Stelle einer natürlich vorkommenden Deletion des MVA-Genoms rekombiniert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung umfasst folglich unter anderem Folgendes allein oder in Kombination:
ein rekombinantes MVA-Virus, das ein menschliches Tryosinaseantigen (hTyr-Antigen) enthält und dieses exprimieren kann;
das wie vorstehende rekombinante MVA-Virus, wobei das hTyr-Gen unter der Transkriptionskontrolle des frühen/späten Vacciniaivirus-Promoters P7.5 steht;
das wie vorstehende rekombinante MVA-Virus, das im Wesentlichen frei von zur Replikation in menschlichen Zellen fähigen Viren ist;
eine eukaryotische Zelle, die in vitro oder ex vivo mit einem wie vorstehenden rekombinanten MVA-Virus infiziert ist;
die Verwendung des wie vorstehenden rekombinanten MVA-Virus zur in-vitro-Produktion von rekombinantem hTyr-Protein;
einen Impfstoff, der ein wie vorstehendes rekombinantes MVA-Virus in einem physiologisch unbedenklichen Träger enthält;
die Verwendung des wie vorstehenden rekombinanten MVA-Virus zur Herstellung eines Impfstoffs;
das wie vorstehende rekombinante MVA-Virus und/oder den wie vorstehenden Impfstoff zur Immunisierung eines lebenden Tierkörpers, einschließlich des Menschen;
das wie vorstehende rekombinante MVA-Virus und/oder den wie vorstehenden Impfstoff zur Vorbeugung oder Behandlung von Melanomen.

[0014] Der Begriff „Gen“ bedeutet eine beliebige DNA-Sequenz, die für ein Protein oder Peptid kodiert.

[0015] Der Begriff „Fremdgen“ bedeutet ein Gen, das in eine DNA-Sequenz eingefügt ist; in welcher es normalerweise nicht zu finden ist.

Die vorliegende Erfindung

[0016] Das modifizierte Vacciniaivirus Ankara (MVA), ein auf einen bestimmten Wirtsbereich beschränkter und stark abgeschwächter Vacciniaivirusstamm, kann sich in Menschen und in den meisten anderen getesteten Säugerzelllinien nicht vervielfachen. Da jedoch die virale Genexpression in nicht-toleranten Zellen unbeeinträchtigt bleibt, können die erfindungsgemäßen rekombinanten MVA-Viren als außergewöhnlich sichere und effiziente Expressionsvektoren verwendet werden.

Rekombinante MVA-Viren

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante MVA-Vacciniaviren, die ein Gen enthalten, das für ein Fremdgen, vorzugsweise von einem pathogenen Erreger, kodiert, und Impfstoffe, die ein Virus in einer physiologisch unbedenklichen Form enthalten. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung derartiger rekombinanter MVA-Vacciniaviren oder Impfstoffe und die Verwendung dieser Impfstoffe zur Prophylaxe von Infektionen, die durch derartige pathogene Erreger verursacht werden.

[0018] Als Vergleichsbeispiel handelt es sich bei einem in das MVA-Virus eingefügten Fremdgen um ein HIV-*nef* kodierendes Gen.

[0019] Wir konstruierten rekombinante MVA-Viren, die die Expression des HIV-1-*nef*-Gens unter der Kontrolle des frühen/späten Vacciniaivirus-Promoters P7.5 gewähren. Das steuernde *nef*-Protein von Primat-Lentiviren wird im viralen Replikationszyklus früh synthetisiert, und es zeigte sich, dass es für eine Virusreplikation mit hohem Titer und eine Erkrankungsherbeiführung *in vivo* wichtig ist. Dies legt nahe, dass HIV-*nef* in der AIDS-Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen könnte. Der (die) molekulare(n) Mechanismus (Mechanismen), durch welchen (welche) *Nef* zur erhöhten viralen Infektiösität und zur HIV-Pathogenese beiträgt, bleibt noch zu klären. Jedoch ist *Nef* immunogen, und ein *Nef*-spezifisches Antigen kann als Impfstoff gegen eine HIV-Infektion und AIDS verwendet werden.

[0020] In diesem Kontext kann das das HIV-*nef*-Gen exprimierende rekombinante MVA-Virus zur Immunisierung von menschlichen Wesen einerseits als prophylaktischer Impfstoff gegen Human-HIV und andererseits zur Immuntherapie von HIV-infizierten oder AIDS-Patienten verwendet werden. Des Weiteren kann das das HIV-*nef*-Gen exprimierende rekombinante MVA-Virus zur Produktion von rekombinantem HIV-*nef*-Protein verwendet werden.

[0021] Bei einer erfindungsgemäßen Ausführungsform, dem in das MVA-Virus eingefügten Fremdgen handelt es sich um ein Humantryrosinase kodierendes Gen.

[0022] Wir konstruierten rekombinante MVA-Viren, die die Expression des Humantryrosinasegens unter der Kontrolle des frühen/späten Vaccinia-virus-Promoters P7.5 gewähren. Unlängst wurde Humantryrosinase als Melanom-spezifisches Tumorantigen identifiziert, das die Bildung von Antitumor-cytolytischen T-Lymphozyten gewährt (Brichard, V. et al. [1993] J. Exp. Med. 178, 489–495). Da es scheint, dass unter normalen Zellen nur Melanozyten das Humantryrosinasegen exprimieren, ist Humantryrosinase ein nützliches Zielantigen zur Immuntherapie von Melanomen. Deshalb kann das das Humantryrosinasegen exprimierende rekombinante MVA-Virus bei Melanopatienten verwendet werden, um Immunantworten herbeizuführen, die eine Tumorabstoßung hervorrufen oder einer Metastasenbildung vorbeugen. Das Humantryrosinasegen exprimierende rekombinante MVA-Virus kann direkt als Antimelanom-Impfstoff verwendet werden, oder das Virus kann zur Herstellung von Antimelanom-Impfstoffen verwendet werden. In einem Beispiel kann das das Humantryrosinasegen exprimierende rekombinante MVA-Virus, zur Produktion eines rekombinanten Humantryrosinaseproteins verwendet werden, das als Antigen in Impfstoffpräparaten verwendet wird. In einem anderen Beispiel können unter Verwendung des das Humantryrosinasegen exprimierenden rekombinanten MVA-Virus als Expressionsvektor, von einem Tumopatienten stammende Zellen zum Expressieren von Humantryrosinase in vitro modifiziert und dann zum Herbeiführen von Antitumor-Immunantworten zurück in den Patienten überführt werden. Ein Impfstoff, der auf der Basis von das Humantryrosinasegen exprimierendem rekombinantem MVA hergestellt ist, kann entweder parenteral oder lokal an der Tumorstelle verwendet werden, um Tumormetastasenbildung vorzubeugen oder den Tumor z.B. in der Größe, Form, Konsistenz, Vaskularisierung oder anderen Merkmalen phenotypisch zu verändern. Ein Impfstoff, der auf der Basis von dem Humantryrosinasegen exprimierendem rekombinantem MVA hergestellt ist, kann vor, während oder nach einer chirurgischen Exzision des Tumors verwendet werden.

[0023] Zur Herstellung von Impfstoffen werden die erfindungsgemäßen MVA-Vaccinia-viren in eine physiologisch unbedenkliche Form umgewandelt. Dies kann auf der Basis der Erfahrung bei der Herstellung von zur Schutzimpfung gegen Pocken verwendeten MVA-Impfstoffen durchgeführt werden (wie beschrieben von Stickl, H. et al. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386–2392). Typischerweise werden etwa 10^6 – 10^8 Teilchen des rekombinanten MVA in 100 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in Gegenwart von 2% Pepton und 1% Humanalbumin in einer Ampulle, vorzugsweise einer Glasampulle gefriergetrocknet. Das Lyophilisat kann Streckmittel (wie Mannit, Dextran, Zucker, Glycerin, Lactose oder Polyvinylpyrrolidon) oder andere zur parenteralen Verabreichung geeignete Hilfsmittel (wie Antioxidationsmittel, Stabilisatoren usw.) enthalten. Die Glasampulle wird dann versiegelt und kann vorzugsweise bei Temperaturen für eine Dauer von einigen Monaten unter -20°C aufbewahrt werden.

[0024] Zur Schutzimpfung oder Therapie kann das Lyophilisat in 0,1 bis 0,5 ml einer wässrigen Lösung, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung gelöst und entweder parenteral, z.B. durch intramuskuläre Impfung, oder lokal, z.B. durch eine Impfung in einen Tumor oder an der Stelle eines Tumors, verabreicht werden. Erfindungsgemäße Impfstoffe oder Therapeutika werden vorzugsweise intramuskulär injiziert (Mayr, A. et al. [1978] Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. B 167, 375–390). Der Verabreichungsmodus, die Dosis und die Anzahl an Verabreichungen kann vom Fachmann in bekannter Weise optimiert werden: Es ist zweckmäßig, falls geeignet, den Impfstoff mehrmals über eine längere Zeitdauer zu verabreichen, um geeignete Immunantworten gegen das Fremdgen zu erhalten.

Die Verwendung von rekombinanten MVA-Viren zur Produktion von heterologen Polypeptiden

[0025] Die erfindungsgemäßen rekombinanten MVA-Vaccinia-viren können auch zur Herstellung von heterologen Polypeptiden in eukaryontischen Zellen verwendet werden. Dies bedingt Zellen, die mit den rekombinanten MVA-Vaccinia-viren infiziert sind. Das für das Fremd-Polypeptid kodierende Gen wird in den Zellen exprimiert und das exprimierte heterologe Polypeptid isoliert. Die zur Produktion derartiger heterologer Polypeptide verwendeten Verfahren sind dem Fachmann allgemein bekannt (EP-A-206, 920 und EP-A-205, 939). Die mit Hilfe der rekombinanten MVA-Viren produzierten Polypeptide sind wegen der speziellen Eigenschaften der MVA-Viren zur Verwendung als Medikamente bei Menschen und Tieren geeigneter.

Rekombinante MVA-Viren, die T7-RNA-Polymerase kodieren, und deren Verwendung zur Expression von DNA-Sequenzen unter der Transkriptionskontrolle eines RT7-RNA-Polymerasepromoters.

[0026] Wir konstruierten ferner rekombinante MVA-Viren, die die Expression des Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerasegens unter der Kontrolle des frühen/späten vaccinia-virus-Promoters P7.5 gewähren.

Die Nützlichkeit von rekombinanten MVA-T7pol-Viren als Expressionssystem wurde in transienten Transfektionstests zum Herbeiführen einer Expression von rekombinanten Genen unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters getestet. Unter Verwendung des Chloramphenicolacetyltransferase(CAT)-Gens von *E. coli* als Reportergen fanden wir, dass MVA-T7pol eine CAT-Genexpression genauso effizient wie ein von dem replikationskompetenten WR-Stamm des Vacciniaivirus stammendes rekombinantes Vaccinia/T7pol-Virus herbeiführte.

[0027] Das erfindungsgemäße MVA-T7-Polymerase-Hybridsystem kann folglich als einfaches, effizientes und sicheres Säugerexpressionssystem zur Produktion von Polypeptiden in Abwesenheit einer produktiven Vacciniaivirusreplikation verwendet werden.

[0028] Diese Expressionssystem kann mit allen oder einigen der Gene enthaltenden DNA-Konstrukten und dem Genom oder rekombinanten Genom, das zum Bilden der viralen Teilchen, z.B. von MVA-Teilchen oder retroviralen Teilchen unter der Transkriptionskontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters nötig ist, auch zum Bilden von rekombinanten viralen Teilchen zur Schutzimpfung oder Gentherapie durch Transformation von Zelllinien, die mit rekombinantem MVA exprimierender T7-RNA-Polymerase infiziert sind, verwendet werden.

[0029] Retrovirale Vektorsysteme bestehen aus zwei Komponenten:

1) Der retrovirale Vektor selbst ist ein modifiziertes Retrovirus (Vektorplasmid), in welchem die für die viralen Proteine kodierenden Gene durch therapeutische Gene und Markergene ersetzt sind, um in die Zielzelle überführt zu werden. Da der Ersatz der für die viralen Proteine kodierenden Gene das Virus wirksam lähmt, muss es durch die zweite Komponente im System, die die fehlenden viralen Proteine für das modifizierte Retrovirus bereitstellt, eingefangen werden.

[0030] Bei der zweiten Komponente handelt es sich um:

2) eine Zelllinie, die große Mengen der viralen Proteine produziert, welcher es jedoch an der Fähigkeit zum Produzieren eines replikationskompetenten Virus mangelt. Diese Zelllinie ist als Packzelllinie bekannt und besteht aus einer Zelllinie, die mit einem oder mehreren Plasmiden transfektiert ist, die die Gene (Gene, die die gag-, pol- und env-Polypeptide kodieren) tragen, wodurch es ermöglicht wird, dass der modifizierte retrovirale Vektor verpackt wird.

[0031] Zum Bilden des verpackten Vektors wird das Vektorplasmid in die Packzelllinie transfektiert. Unter diesen Bedingungen wird das die eingefügten therapeutischen und Markergene einschließende retrovirale Genom von dem Vektorplasmid transkribiert und in die modifizierten retroviralen Teilchen (rekombinanten viralen Teilchen) gepackt. Dieses rekombinante Virus wird dann zum Infizieren von Zielzellen verwendet, in welchen das Vektorgenom und jeglicher getragene Marker oder jegliche therapeutischen Gene in der DNA der Zielzelle integriert werden. Eine mit einem derartigen rekombinanten viralen Teilchen infizierte Zelle kann kein neues Vektorvirus produzieren, da in diesen Zellen keine viralen Proteine vorliegen. Jedoch wird die DNA des Vektors, der die t-therapeutischen und Marker-Gene trägt, in die DNA der Wirtszelle integriert und kann nun in der infizierten Zelle exprimiert werden.

[0032] Das T7-RNA-Polymerase exprimierende rekombinante MVA-Virus kann zum Produzieren des zum Packen von retroviralen Vektoren nötigen Proteins verwendet werden. Zur Durchführung dessen werden die gag-, pol- und env-Gene eines Retrovirus (z.B. des Mäuse-Leukämievirus (MLV)) unter die Transkriptionskontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters in einem oder mehreren Expressionsvektoren (z.B. Plasmiden) gestellt. Die Expressionsvektoren werden dann zusammen mit einem ein retrovirales Vektorkonstrukt tragenden Expressionsvektor möglicherweise unter der Transkriptionskontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters in Zellen eingebracht, die mit dem T7-RNA-Polymerase exprimierenden rekombinanten MVA-Virus infiziert sind.

[0033] WO 94/29437, WO 89/11539 und WO 96/07748 beschreiben verschiedene Typen von retroviralen Vektorkonstrukten, die unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Packsystems verpackt werden können.

[0034] Eine weitere Verwendung des T7-RNA-Polymerase exprimierenden rekombinanten MVA-Virus ist die Bildung von rekombinanten Proteinen, nicht infektiösen Virusteilchen oder infektiösen Mutantvirusteilchen zur Produktion von Impfstoffen oder Therapeutika (Buchholz et al., *Virology*, 204, 770–776 (1994) und EP-B1-356695). Zur Durchführung dessen werden virale Gene (z.B. die gag-, pol- und env-Gene von HIV-1) unter die Transkriptionskontrolle des T7-Promoters in einem Expressionsvektor (z.B. Plasmid oder einem anderen rekombinanten MVA-Virus) gestellt. Dieses Konstrukt wird dann in Zellen eingebracht, die mit dem T7-RNA-Polymerase exprimierenden rekombinanten MVA-Virus infiziert sind. Die rekombinanten viralen Gene

werden mit hoher Effizienz transkribiert, rekombinante Proteine werden in hohen Mengen hergestellt und können gereinigt werden. Zudem können sich exprimierte rekombinante virale Proteine (z.B. HIV-1 env, gag) zu viralen Pseudoteilchen, die von den Zellen knospen, zusammenschließen und von dem Gewebekulturmedium isoliert werden. Virale Proteine (z.B. vom HIV-, SIV-, Measlesvirus), die durch das MVA-T7-pol-System exprimiert werden, können ein zusätzlich eingebrachtes Mutantivirus (das z.B. vom HIV-, SIV-, Measlesvirus stammt) durch Überwinden eines Anlagerungs- und Infektionsdefekts, Abdecken, Nukleinsäurereplikation, virale Genexpression, Zusammenschluss, Knospenbildung, oder einen anderen Schritt in der viralen Vervielfältigung zum Gewähren der Produktion und Reinigung des vorstehend erwähnten Mutantivirus befreien.

[0035] MVA-T7-pol kann auch zusammen mit DNA-Sequenzen, die das Gen eines Antigens von Interesse (z.B. das Gen von HIV, nev, tat, gag, pol oder env oder anderen) tragen, zur Immunisierung verwendet werden. Zuerst wird eine Kodierungssequenz eines vorgegebenen Antigens (z.B. HIV-, HCV-, HPV-, HSV-, Measlesvirus, Influenzavirus oder andere) unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters vorzugsweise in einem Plasmidvektor geklont und das resultierende DNA-Konstrukt amplifiziert und unter Verwendung von Standardlaborverfahren gereinigt. Als zweites wird die Vektor-DNA gleichzeitig oder mit geeigneten zeitlichen Verzögerungen zusammen mit MVA-T7-pol eingeimpft. An der Impfstelle wird das rekombinante Gen von Interesse transient in sowohl die Vektor-DNA als auch MVA-T7-pol enthaltende Zellen exprimiert und das entsprechende Antigen dem Wirtsimmunsystem unter Stimulierung einer antigenspezifischen Immunantwort angeboten. Dieses Protokoll unter Verwendung des Nichtreplikationsvaccinvektors MVA-T7-pol stellt eine viel versprechende neue Vorgehensweise zur Nukleinsäureschutzimpfung dar, die eine effiziente transiente Expression eines vorgegebenen Antigens gewährt, jedoch das mögliche Risiko einer konstitutiven Genexpression vermeidet.

[0036] Die rekombinanten MVA-Vacciniaviren können wie hier nachstehend dargelegt hergestellt werden.

[0037] Ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz enthält, die für ein Fremdpolypeptid kodiert, das durch MVA-DNA-Sequenzen eingegrenzt ist, die an eine natürlich vorkommende Deletion, z.B. Deletion II im MVA-Genom angrenzen, wird in mit MVA infizierte Zellen eingebracht, um eine homologe Rekombination zu gewähren.

[0038] Nach dem Einbringen des DNA-Konstrukts in die eukaryotische Zelle und dem Rekombinieren der Fremd-DNA mit der viralen DNA ist es möglich, das gewünschte rekombinante Vacciniavirus in einer an sich bekannten Weise, vorzugsweise mit Hilfe eines Markers zu isolieren (vergleiche Nakano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1593–1596 [1982], Franke et al., Mol. Cell. Biol. 1918–1924 [1985], Chakrabarti et al., Mol. Cell. Biol. 3403–3409 [1985], Fathi et al., Virology 97–105 [1986]).

[0039] Das einzufügende DNA-Konstrukt kann linear oder kreisförmig sein. Eine kreisförmige DNA, insbesondere ein Plasmid ist bevorzugt. Das DNA-Konstrukt enthält Sequenzen, die die linke und die rechte Seite einer natürlich vorkommenden Deletion, z.B. Deletion II, im MVA-Genom eingrenzen (Altenburger, W., Suter, C. P. und Altenburger J. (1989) Arch. Virol. 105, 15–27). Die Fremd-DNA-Sequenz wird zwischen die Sequenzen eingefügt, die die natürlich vorkommende Deletion eingrenzen. Bei der Fremd-DNA-Sequenz kann es sich um ein Gen, das für ein therapeutisches Polypeptid, z.B. t-PA oder Interferon kodiert, oder eine antigene Bestimmungsgröße für einen pathogenen Erreger handeln. Bei pathogenen Erregern kann es sich um eine Erkrankung hervorruhende Viren, Bakterien und Parasiten sowie Tumorzellen, die sich uneingeschränkt in einem Organismus vervielfachen und folglich zu pathologischem Wachstum führen, handeln. Beispiele für derartige pathogene Erreger sind in Davis, B. D. et al., (Microbiology, 3. Ausgabe, Harper International Edition) beschrieben. Bevorzugte Antigene von pathogenen Erregern sind diejenigen von Humanimmundefektviren (z.B. HIV-1 und HIV-2), von Tuberkulose verursachenden Mycobakterien, des Parasiten Plasmodium falciparum und von Melanomzellen.

[0040] Zur Expression einer DNA-Sequenz oder eines Gens ist es nötig, dass die für die Transkription des Gens erforderlichen Regulationssequenzen auf der DNA vorliegen. Derartige Regulationssequenzen (Promoter genannt) sind dem Fachmann bekannt und schließen z.B. diejenigen des wie in EP-A-198, 328 beschriebenen Vacciniagens mit 11 kDa und diejenigen des Gens mit 7.5 kDa (EP-A-110, 385) ein.

[0041] Ein DNA-Konstrukt kann in die MVA-infizierten Zellen durch Transkription, z.B. durch Calciumphosphatausfällung (Graham et al., Virol. 52, 456–467 [1973]; Wigler et al., Cell 777–785 [1979]), durch Elektroporation (Neumann et al., EMBO J. 1, 841–845 [1982]), durch Mikroinjektion (Graessmann et al., Meth. Enzymology 101, 482–492 (1983)), durch Liposome (Straubinger et al., Methods in Enzymology 101, 512–527 (1983)), durch Spheroplasten (Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2163–2167 (1980)) oder durch andere dem

Fachmann bekannte Verfahren eingebracht werden. Eine Transfektion durch Calciumphosphatausfällung ist bevorzugt.

[0042] Die folgenden detaillierten Beispiele sollen zu einem besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung beitragen. Es ist jedoch nicht beabsichtigt, den Eindruck zu erwecken, dass die Erfindung auf die Thematik der Beispiele begrenzt ist.

Die Zeichnungen

[0043] [Fig. 1](#): Schematische Abbildung des MVA-Genoms und Plasmids zur Einfügung von Fremd-DNA durch homologe Rekombination: Die HindIII-Restriktionsstellen mit dem MVA-Genom sind auf dem oberen Teil angegeben. Das HindIII-HindIII-N-Fragment mit 900 bp, das die Verbindungsstelle von Deletion II mit dem MVA-Genom überlappt, ist dargestellt. MVA-DNA-Sequenzen, die an die Deletion II angrenzen (Angrenzung 1 und Angrenzung 2) wurden durch PCR amplifiziert und zur Konstruktion von Einfügungsplasmid pUC II LZ verwendet.

[0044] [Fig. 2](#): pUC II LZ P7.5: MVA-Vektorplasmid zur Einfügung in Deletion II, enthaltend eine P11-LacZ-Expressionskassette und den frühen/späten Vacciniaivirus-Promoter P7.5 zum Expressieren von Genen von Interesse, die in die SmaI-Stelle des Plasmids geklont werden können.

[0045] [Fig. 3](#): pUC II LZdel P7.5: MVA-Vektorplasmid zur Einfügung von Fremdgenen an der Stelle von Deletion II im MVA-Genom, enthaltend eine selbst-deletierende P11-LacZ-Expressionskassette und den frühen/späten Vacciniaivirus-Promoter P7.5 zum Expressieren von Genen von Interesse, die in die SmaI/NotI-Klonstelle des Plasmids geklont werden können.

[0046] [Fig. 4](#): Konstruktion des rekombinanten Virus MVA-T7-pol: Schematische Abbildungen des MVA-Genoms (HindIII-Restriktionsendonukleasestellen) und des Vektorplasmids pUC II LZ T7pol, das die Einfügung des T7-RNA-Polymerasegens an der Seite von Deletion II im HindIII-N-Fragment des MVA-Genoms gewährt.

[0047] [Fig. 5](#): Southern-Blot-Analyse von viraler MVA-T7pol-DNA.

[0048] [Fig. 6](#): Metabolisches Markieren von Proteinen unter Verwendung von ^{35}S Methionin. SDS-PAGE-Analyse. Spur 1: MVA-T7pol, Spur 2: MVA, Spur 3: CV-1-Zellen.

[0049] [Fig. 7](#): CAT-Test: CV1-Zellen, transfektiert mit Plasmid, enthaltend CAT-Gen, unter der Kontrolle von T7-RNA-Polymerasepromoter und infiziert mit MVA-T/pol oder WR-T7pol. Die Lysate wurden auf CAT-Aktivität getestet. C bedeutet Chloramphenicol und 1-AcC und 3-AcC bedeuten mono- und triacetylierte Formen von Chloramphenicol. Die CAT-Aktivität wird als Prozentanteil acetyliertes Produkt, das innerhalb von 60 Minuten gebildet wird, ausgedrückt.

[0050] [Fig. 8](#): Konstruktion von MVA-LAInef: Schematische Abbildungen des MVA-Genoms (HindIII-Restriktionsendonukleasestellen) und des Vektorplasmids pUC II LZdel P7.5-LAInef, das die Einfügung des nef-Gens von HIV-1 LAI an der Stelle von Deletion II im HindIII-N-Fragment des MVA-Genoms gewährt.

[0051] [Fig. 9](#): Konstruktion von MVA-hTYR: Schematische Abbildungen des MVA-Genoms (HindIII-Restriktionsendonukleasestellen) und des Vektorplasmids pUC II LZdel P7.5-TYR, das die Einfügung des Humantryosinasegens an der Stelle von Deletion II im HindIII-N-Fragment des MVA-Genoms gewährt.

Beispiele

1. Wachsen und Reinigung der Viren.

1.1 Wachsen des MVA-Virus

[0052] Das MVA-Virus ist ein stark abgeschwächtes Vacciniaivirus, das von dem Vacciniairusstamm Ankara (CVA) durch Langzeitseriendurchgänge von primären Hühnerembryofibroblast(CEF)-Kulturen abgeleitet wurde. Für einen allgemeinen Überblick über die Geschichte der Produktion, die Eigenschaften und die Verwendung des MVA-Stamms kann auf die Zusammenfassung Bezug genommen werden, die von Mayr et al. in Infection 3, 6–14 [1975] veröffentlicht wurde. Auf Grund der Abschwächung des CEF repliziert das MVA-Virus in dieser Hühnerwirtszelle auf hohe Titer. In Säugerzellen ist das Wachstum von MVA jedoch stark eingeschränkt,

und eine typische Plaquebildung des Virus ist nicht nachweisbar. Deshalb ließ man das MVA-Virus auf CEF-Zellen wachsen. Zur Herstellung von CEF-Zellen wurden 11 Tage alte Embryos aus inkubierten Hühnereiern isoliert, die Extremitäten entfernt und die Embryos in einer Lösung, zusammengesetzt aus 0,25% Trypsin bei 37°C für eine Dauer von 20 Minuten zerhackt und dissoziiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde filtriert, und die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 2000 UpM in einer Zentrifuge des Typs Sorvall RC-3B bei Raumtemperatur für eine Dauer von 5 Minuten sedimentiert, in 10 Volumina Medium A (MEM Eagle, z.B. erhältlich von Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation mit 2000 UpM in einer Zentrifuge des Typs Sorvall RC-3B bei Raumtemperatur für eine Dauer von 5 Minuten sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Medium A, enthaltend 10% fötales Kalbserum (FCS), Penicillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (100 mg/ml) und 2 mM Glutamin, wiedergebildet, um eine Zellsuspension zu erhalten, die 500.000 Zellen/ml enthielt. Die auf diese Weise erhaltenen CEF-Zellen wurden auf Zellkulturplatten gesprührt. Man ließ sie in Medium A in einem CO₂-Inkubator bei 37°C für eine Dauer von 1 bis 2 Tagen, je nach gewünschter Zelldichte, wachsen, und sie wurden zur Infektion entweder direkt oder nach einem weiteren Zell durchgang verwendet. Eine detaillierte Beschreibung über die Herstellung von Primärkulturen sind in dem Buch von R. I. Freshney, "Culture of animal cell", Alan R. Liss Verlag, New York [1983] Kapitel 11, Seite 99 ff zu finden.

[0053] MVA-Viren wurden zur Infektion wie folgt verwendet. CEF-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 175 cm² gezüchtet. Bei einer Konfluenz von 90–100% wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden für eine Dauer von 1 Stunde mit einer MVA-Virussuspension (0,01 infektiöse Einheiten(IU) pro Zelle, 0,02 ml/cm² in Medium A inkubiert. Dann wurde mehr Medium A zugesetzt (0,2 ml/cm²), und die Flaschen wurden bei 37°C für eine Dauer von 2–3 Tagen (bis etwa 90% der Zellen cytopathogene Wirkung zeigten) inkubiert. Rohes Virusmaterial wurde durch Kratzen von Zellmonoschichten in das Medium und Pelletieren des Zellmaterials durch Zentrifugation mit 3000 UpM in einer Zentrifuge des Typs Sorvall RC-3B bei 4°C für eine Dauer von 5 Minuten hergestellt. Das rohe Viruspräparat wurde vor dem weiteren Verarbeiten (z.B. Virusreinigung) bei –20°C aufbewahrt.

1.2 Reinigung der Viren

[0054] Die Reinigungsschritte, die zum Erhalt eines Viruspräparats unternommen wurden, das so rein wie möglich und frei von für die Wirtszelle spezifischen Komponenten war, ähnelten denjenigen, die von Joklik (Virology 18, 9–18 [1962]) beschrieben wurden. Rohes Virusmaterial, das bei –20°C aufbewahrt wurde, wurde aufgetaut und einmal in PBS (10–20-faches Volumen des Sediments) suspendiert und die Suspension wie vorstehend zentrifugiert. Das neue Sediment wurde in 10-fachem Volumen Tris-Puffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 9,0) suspendiert und die Suspension kurz mit Ultraschall (Labsonic L, B. Braun Biotech International, Melsungen Deutschland; 2 × 10 Sekunden bei 60 Watt bei Raumtemperatur) behandelt, um die Zelldebris weiter abzusprengen und die Virusteilchen vom Zellmaterial abzulösen. Die Zellkerne und die größere Zelldebris wurden in der anschließenden Kurzzentrifugation (Sorvall GSA Rotor, erhältlich von DuPont Co., D-6353 Bad Nauheim, Deutschland; 3 Minuten mit 3000 UpM und bei 10°C) von der Suspension entfernt. Das Sediment wurde noch einmal in Tris-Puffer 1 suspendiert, mit Ultraschall gehandelt und wie vorstehend beschrieben zentrifugiert. Die aufgefangenen Überstände, enthaltend die freien Virusteilchen, wurden vereinigt und auf ein Kissen aus 10 ml 36%iger Saccharose in 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, aufgetragen und in einem Rotor des Typs Beckman SW 27/SW 28 für eine Dauer von 80 Minuten mit 13.500 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das die Virusteilchen enthaltende Sediment in 10 ml 1 mM Tris-HCl, pH 9,0, aufgenommen, durch Kurzbehandlung mit Ultraschall (2 × 10 Sekunden bei Raumtemperatur, Apparatur wie vorstehend) homogenisiert und auf einen 20–40%igen Saccharosegradienten (Saccharose in 1 mM Tris-HCl, pH 9,0) zur weiteren Reinigung aufgebracht. Der Gradient wurde in einem Rotor des Typs Beckman SW 41 mit 13.000 UpM für eine Dauer von 50 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden abgesonderte Virusteilchen enthaltende Banden nach Absaugen des Volumens der oberen Bande durch Pipettieren geerntet. Die erhaltene Saccharoselösung wurde mit 3 Volumina PBS verdünnt, und die Virusteilchen wurden durch Zentrifugation (Beckman SW 27/SW 28, 60 Minuten mit 13.500 UpM, 4°C) erneut sedimentiert. Das Pellet, das nun hauptsächlich aus reinen Virusteilchen bestand, wurde in PBS resuspendiert und auf Viruskonzentrationen, die durchschnittlich 1–5 × 10⁹ IU/ml entsprachen, äquilibriert. Die gereinigte Virusmateriallösung wurde bei –80°C aufbewahrt und entweder direkt oder verdünnt mit PBS für anschließende Versuche verwendet.

1.3 Klonen des MVA-Virus

[0055] Zum Bilden von homogenen Virusmaterialpräparaten wurde der von Professor Anton Mayr erhaltene MVA-Virus durch einschränkende Verdünnung während drei aufeinander folgenden Durchgängen in CEF, gezüchtet in 96-Mulden Gewebekulturplatten, geklont. Der MVA-Klon F6 wurde ausgewählt und in CEF amplifi-

ziert, um Arbeitsmaterial des Virus zu erhalten, das als Ausgangsmaterial für die Bildung von in dieser Patentanmeldung beschriebenen rekombinanten MVA-Viren sowie zum Bilden von früher beschriebenen rekombinanten MVA-Viren, (Sutter, G. und Moss, B. [1992] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847–10851; Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. and Moss, B. [1994] Vaccine 12, 1032–1040; Hirsch, V., Fuerst, T., Sutter, G., Carroll, M., Yang, L., Goldstein, S., Piatak, M., Elkins, W., Alvord, G., Montefiori, D., Moss, B. and Lifson, J. [1996] J. virol. 70, 3741–3752) verwendet wurde.

2. Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten MVA-Viren

2.1 Konstruktion von Vektorplasmiden

[0056] Zum Gewähren der Bildung von rekombinanten MVA-Viren wurden neue Vektorplasmide konstruiert. Die Einfügung von Fremdgenen in das MVA-Genom wurde genau auf die Stelle der natürlich vorkommenden Deletion II im MVA-Genom gezielt. Sequenzen der MVA-DNA-Eingrenzung der Stelle einer Deletion mit 2.500 bp im HindIII-N-Fragment des MVA-Genoms (Altenburger, W., Suter, C. P. und Altenburger, J. [1989], J. Arch. Virol. 105, 15–27) wurden durch PCR amplifiziert und in die Mehrfachklonstelle von Plasmid pUC18 geklont. Die Primer für die linke DNA-Eingrenzung 600 bp waren 5'-CAG CAG GGT ACC CTC ATC GTA CAG GAC GTT CTC-3' und 5'-CAG CAG CCC GGG TAT TCG ATG ATT ATT TTT AAC AAA ATA ACA-3' (die Stellen für die Restriktionsenzyme KpnI und SmaI sind unterstrichen). Die Primer der rechten DNA-Eingrenzung mit 550 bp waren 5'CAG CAG CTG CAG GAA TCA TCC ATT CCA CTG AAT AGC-3' and 5'-CAG CAG GCA TGC CGA CGA ACA AGG AAC TGT AGC AGA-3' (die Stellen für die Restriktionsenzyme PstI und SphI sind unterstrichen). Zwischen diesen Eingrenzungen von MVA-DNA, eingefügt in pUC18, wurde das lacZ-Gen von Escherichia coli unter der Kontrolle des späten Vacciniaivirus-Promoters P11 (hergestellt durch Restriktionsverdau von pIII LZ, Sutter, G. und Moss, B. [1992] PNAS USA 89, 10847–10851) unter Verwendung der BamHI-Stelle eingefügt, um den MVA-Einfügungsvektor pUCII LZ [Fig. 1] zu bilden. Danach wurde ein Fragment mit 289 bp, enthaltend den frühen/späten Vacciniaivirus-Promoter P7.5 zusammen mit einer SmaI-Stelle zum Klonen (hergestellt durch Restriktionsverdau mit EcoRI und XbaI von dem Plasmidvektor pSC11 [Chakrabarti et al. 1985, Molecular and Cellular Biology 5, 3403–3409]), in die SmaI-Stelle von pUCII LZ eingefügt, um den MVA-Vektor pUCII LZ P7.5 [Fig. 2] zu erhalten. Zum Konstruieren eines Vektorplasmids, das die Isolierung von rekombinanten MVA-Viren über transiente Synthese des Reporterenzymes β-Galactosidase gewährt, wurde ein DNA-Fragment mit 330 bp vom 3'-Ende des LacZ Offenleserahmens von E. coli durch PCR amplifiziert (die Primer waren 5'-CAG CAG GTC GAC CCC GAC CGC CTT ACT GCC GCC-3' und 5'-GGG GGG CTG CAG ATG GTA GCG ACC GGC GCT CAG-3') und in die Sall- und PstI-Stelle von pUC II LZ P7.5 geklont, um den MVA-Vektor pUC II LZdel P7.5 [Fig. 3] zu erhalten. Unter Verwendung der SmaI-Stelle kann dieses Vektorplasmid zum Einfügen von DNA-Sequenzen verwendet werden, die ein Fremdgen unter der Transkriptionskontrolle des Vacciniaivirus-Promoters P7.5 in das MVA-Genom verwendet werden. Nach dem Isolieren des gewünschten rekombinanten Virus durch Durchmustern auf Expression von β-Galactosidase-Aktivität führt eine weitere Vermehrung des rekombinanten Virus zur Selbstdeletion der wieder konstruierten P11-LacZ-Expressionskassette durch homologe Rekombination.

2.2 Konstruktion und Charakterisierung des rekombinanten Virus MVA T7pol.

[0057] Ein DNA-Fragment mit 3,1 kbp, enthaltend das gesamte Gen der Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des frühen/späten Vacciniaivirus-Promoters P7.5, wurde mit EcoRI von Plasmid pTF7-3 exzidiert (Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. und Moss, B., 1986, P. N. A. S. USA 83, 8122–8126), durch Inkubation mit Klenow-DNA-Polymerase zum Bilden von stumpfen Enden modifiziert und in eine einheitliche SmaI-Restriktionsstelle von pUCII LZ geklont, um den Plasmidtransfervektor pUCII LZ T7pol [Fig. 4] herzustellen. Als Transkriptionsregulator für die Expression des T7-RNA-Polymerasegens wurde der frühe/späte Vacciniaivirus-Promoter P7.5 ausgewählt. Im Gegensatz zu späten Vacciniaivirus-Promotoren (z.B. P11) gewährt dieses Promotersystem die Expression von rekombinanten Genen unmittelbar nach der Infektion von Zielzellen. Das Plasmid pUCII LZ T7pol, das die Einfügung der Fremdgene in die Stelle von Deletion II des MVA-Genoms leitet, wurde zum Bilden des rekombinanten Virus MVA T7pol verwendet.

[0058] CEF-Zellen, die mit MVA mit einer Multiplizität von 0,05 TCID₅₀ pro Zelle infiziert waren, wurden mit DNA von Plasmid pUCII LZ T7pol wie früher beschrieben transfektiert (Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. und Moss, B. (1994) Vaccine 12, 1032–1040). Das die T7-RNA-Polymerase exprimierende und β-D-Galactosid (MVA P7.5-T7pol) coexprimierende rekombinante MVA-Virus wurde durch 5 aufeinander folgenden Runden der Plaquereinigung in mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (300 µg/ml) gefärbten CEF-Zellen ausgewählt. Anschließend wurden rekombinante Viren durch Infektion von CEF-Monoschichten amplifiziert, und die DNA wurde durch PCR analysiert, um die genetische Homogenität des Virusmaterials zu bestätigen. Eine

Southern-Blot-Analyse von viraler MVA-T7pol-NA zeigte eine stabile Integration der rekombinanten Gene an der Stelle von Deletion II im MVA-Genom [Fig. 5]. Zum Überwachen der Expression von T7-RNA-Polymerase durch rekombinantes MVA-T7pol wurden mit [³⁵S]Methionin markierte Polypeptide von mit Virus infizierter GeWEBEKULTUR analysiert. Monoschichten der in Platten mit 12 Mulden gewachsenen Affennierenzelllinie CV-1 wurden mit Virus mit einem Multiplizität von 20 TCID₅₀ pro Zelle infiziert. 3–5 Stunden nach der Infektion wurde das Medium entfernt, und die Kulturen wurden einmal mit 1 ml Methioninfreiem Medium gewaschen. Jeder Mulde wurden 0,2 ml Methionin-freies Medium, ergänzt mit 50 µCi [³⁵S]Methionin zugesetzt, und es wurde für eine Dauer von 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Cytoplasmatische Extrakte von infizierten Zellen wurden durch Inkubieren jeder Mulde in 0,2 ml 0,5%igem Nonidet-P-40-Lysebuffer für eine Dauer von 10 Minuten bei 37°C hergestellt und Proben durch SDS-PAGE analysiert. Das metabolische Markieren der CV-1-Zellen mit MVA-T7pol entwickelte die Synthese von zwei zusätzlichen Polypeptiden (i) eines Proteins mit etwa 116.000 Da, das die β-Galactosidase von *E. coli* coexprimiert darstellt, zum Gewähren des Durchmusterns auf rekombinanten Virus und (ii) eines Proteins mit 98.000 Da mit der erwarteten Größe der bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase [Fig. 6]. Die große Menge an β-Galactosidase, die durch MVA-T7pol hergestellt wurde, ist bemerkenswert. Die Ergebnisse aus den in-vivo-Markierungsversuchen zeigen eine sehr starke Expression des P11-LacZ-Genkonstrukts, wenn es in das MVA-Genom an die Stelle von Deletion II eingefügt wurde, was darauf hinwies, dass rekombinante Gene in MVA-Vektorviren effizienter exprimiert werden könnten, wenn sie in diesen Lokus des MVA-Genoms eingefügt werden würden.

[0059] Die Nützlichkeit von rekombinanten MVA-T7pol-Viren als Expressionssystem im Vergleich zu dem rekombinanten WR-T7pol-Virus vTF7-3 (Fuerst et al. 1986) wurde durch Cotransfektion von DNA eines Plasmidvektors getestet, der von pTM1 abgeleitet ist (Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A. und Fuerst T. R. (1990) Nature 348, 91–92) und der (geklont in die Ncol-BamHI-Stellen der mehrfachen pTM1-Klonstelle) die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen von *E. coli* unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerasepromoters (PT₇) enthält. Transfektierte und infizierte CV-1-Zellen wurden in 0,2 ml 0,25 M Tris-HCl (pH 7,5) suspendiert. Nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen wurden die Lysate durch Zentrifugation gesäubert, der Proteingehalt der Überstände wurde bestimmt und Proben, enthaltend 0,5, 0,25, 0,1 µg Gesamtprotein, wurden wie beschrieben von Mackett, M., Smith, G. L. und Moss, B. (1984) J. Virol. 49, 857–864 auf Enzymaktivität getestet. Nach einer Autoradiographie wurden markierte Punkte unter Verwendung des Fuji-Abbildungsanalyseystems quantifiziert.

[0060] Die Ergebnisse zeigen, dass es durch Verwendung des stark abgeschwächten Vacciniavektors MVA möglich ist, das Vacciniaivirus T7-RNA-Polymerasesystem so effizient wie unter Verwendung eines vollständigen replikationskompetenten Vacciniaivirus-Rekombinanten [Fig. 7] zu verwerten.

2.3. Konstruktion und Charakterisierung des rekombinanten Virus MVA-LAInef

[0061] Ein DNA-Fragment mit 648 bp, enthaltend das gesamte nef-Gen von HIV-1 LAI, wurde durch PCR von Plasmid-DNA (pTG1166, freundlicherweise bereitgestellt von M.-P. Kieny, Transgene S. A., Strasburg; PCR-Primer waren 5'-CAG CAG GGA TCC ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AGT-3' und 5'-CAG CAG GGA TCC ATG TCA GCA GTT CTT GAA GTA CTC CGG-3') hergestellt, mit Restriktionsendonuklease BamHI verdaut, durch Inkubation mit Klenow-DNA-Polymerase zum Bilden von stumpfen Enden modifiziert und in die SmaI-Stelle von pUC II LZdel P7.5 geklont, um den Vektor pUC II LZdel P7.5-LAInef [Fig. 8] herzustellen. Dieses Plasmid könnte zum Konstruieren eines rekombinanten MVA-Virus verwendet werden, das das nef-Gen von HIV-1-LAI unter der Kontrolle des frühen/späten Vacciniaivirus-Promoters P7.5 exprimiert.

[0062] CEF-Zellen, die mit MVA mit einer Multiplizität von 0,05 TCID₅₀ pro Zelle infiziert waren, wurden mit der DNA von Plasmid pUC II LZdel P7.5-LAInef wie früher beschrieben transfektiert (Sutter, G, Wyatt, L, Foley, P., Bennink, J. und Moss, B. [1994] Vaccine 12, 1032–1040). Rekombinante MVA-Viren, enthaltend das nef-Gen und transient coexprimierend das LacZ-Markergen von *E. coli*, wurden durch aufeinander folgende Runden der Plaquereinigung in mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (300 µg/ml) gefärbten CEF-Stellen ausgewählt. Danach wurden rekombinante MVA-Viren, die das nef-Gen enthielten und bei welchen das LacZ-Markergen deletiert wurde, durch drei zusätzliche aufeinander folgende Runden der Plaquereinigung, Durchmuster auf Nichtfärbung von viralen Punkten in CEF-Zellen in Gegenwart von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (300 µg/ml) isoliert. Anschließend wurden rekombinante Viren durch Infektion von CEF-Monoschichten amplifiziert und die virale MVA-LAInef-DNA wurde durch PCR analysiert, um die genetische Homogenität des Virusmaterials zu bestätigen. Eine Southern-Blot-Analyse der viralen DNA bestätigte die genetische Stabilität von MVA-LAInef und zeigte genau die Integration des nef-Gens und die Deletion des LacZ-Markergens von *E. coli* an der Stelle von Deletion II im viralen Genom.

[0063] Eine effiziente Expression des rekombinanten nef-Proteins wurde durch Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten von mit MVA-LAInef infizierten CEF-Zellen unter Verwendung von gegen HIV-1-Nef gerichteten monoklonalen Mäuseantikörpern (freundlicherweise bereitgestellt von K. Krohn und verwendet wie von Ovod, V., Lagerstedt, A., Ranki, A., Gombert, F., Spohn, R., Tähtinen, M., Jung, G. und Krohn, K. [1992] AIDS 6, 25–34 beschrieben) bestätigt.

2.4. Konstruktion und Charakterisierung des rekombinanten Virus MVA-hTYR

[0064] Ein DNA-Fragment mit 1,9 kb, enthaltend das gesamte Humantryrosinase kodierende Gen [Tyrosinase-c-DNA-Klon 123.B2, isoliert von der Melanomzelllinie SK29-MEL von Patient SK29 (AV), Genbank Zugangsnummer UO1873; Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P. und Boon, B. (1993), J. Exp. Med. 178, 489–495] wurde aus dem Plasmid pcDNA1/Amp-Tyr [Wölfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Büschenfelde, K. und Boon, T. (1994) Eur. J. Immunol. 24, 759–764] durch EcoRI-Verdau, modifiziert durch Inkubation mit Klenow-DNA-Polymerase zum Bilden von stumpfen Enden hergestellt und in die SmaI-Stelle von pUC II LZdel P7.5 geklont, um den Vektor pUC II LZdel P7.5-TYR [[Fig. 9](#)] herzustellen. Dieses Plasmid könnte zum Konstruieren eines rekombinanten MVA-Virus verwendet werden, das das Humantryrosinasegen unter der Kontrolle des frühen/späten Vaccincvirus-Promoters P7.5 exprimiert.

[0065] CEF-Zellen, die mit MVA mit einer Multiplizität von 0,05 TCID₅₀ pro Zelle infiziert waren, wurden mit der DNA von Plasmid pUC II LZdel P7.5-TYR wie früher beschrieben transfektiert (Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. und Moss, B. (1994) Vaccine 12, 1032–1040). Der rekombinante MVA-Virus, der das Gen für Humantryrosinase stabil exprimiert und das LacZ-Gen von *E. coli* transient coexprimiert, wurde durch aufeinander folgende Runden der Plaquereinigung in mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (300 µg/ml) gefärbten CEF-Zellen ausgewählt. Danach wurde das rekombinante MVA-Virus, das das Humantryrosinase kodierende Gen exprimiert und bei welchem das LacZ-Markogen deletiert wurde, durch drei zusätzliche aufeinander folgende Runden der Plaquereinigung, Durchmustern auf Nichtfärbung von viralen Punkten in CEF-Zellen in Gegenwart von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (300 µg/ml) isoliert. Anschließend wurden rekombinante Viren durch Infektion von CEF-Monoschichten amplifiziert, und die virale MVA-hTYR-DNA wurde durch PCR analysiert, um die genetische Homogenität des Virusmaterials zu bestätigen. Eine Southern-Blot-Analyse von viraler DNA bestätigte die genetische Stabilität von MVA-hTYR und zeigte genau die Integration des rekombinanten Tyrosinasegens und die Deletion des LacZ-Markogens von *E. coli* an der Stelle von Deletion II im viralen Genom.

[0066] Eine effiziente Expression von rekombinanter Humantryrosinase wurde durch Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten von mit MVA-hTYR infizierten CEF-Zellen unter Verwendung von polyklonalen Kaninchenantikörpern (freundlicherweise bereitgestellt von V. Hearing und wie von Jimenez, M., Kameyama, K., Maloy, L., Tomita, Y. und Hearing, V. [1988] P. N. A. S. USA 85, 3830–3834 beschrieben verwendet) oder monoklonalen Mäuseantikörpern (freundlicherweise bereitgestellt von L. Old und wie von Chen, Y., Stockert, E., Tsang, S., Coplan, K. und Old, L. [1995] P. N. A. S. USA 92, 8125–8129 beschrieben verwendet), die direkt gegen Tyrosinase gerichtet waren, bestätigt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
- (B) STRASSE: Ingolstaedter Landstr. 1, Neuherberg
- (C) STADT: Oberschleissheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85764

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante MVA-Viren und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.30 (EPO)

(vi) FRÜHERE PATENTANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DK 0782/95
- (B) ANMELDETAG: 4. Juli 1995

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAGCAGGGTA CCCTCATCGT ACAGGACGTT CTC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAGCAGCCCCG GGTATTCGAT GATTATTTT AACAAAATAAA CA

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAGCAGCTGC AGGAATCATC CATTCCACTG AATAGC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CAGCAGGCAT GCCGACGAAC AAGGAACTGT AGCAGA

36

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAGCAGGTCTG ACCCCGACCG CCTTACTGCC GCC

33

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGGGGGCTGC AGATGGTAGC GACCGGCGCT CAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAGCAGGGAT CCATGGGTGG CAAGTGGTCA AAAAGTAGT

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „DNA-primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CAGCAGGGAT CCATGTCAGC AGTTCTTGAA GTACTCCGG

39

Patentansprüche

1. Rekombinantes MVA-Virus, das ein menschliches Tryosinaseantigen (hTyr-Antigen) enthält und dieses exprimieren kann.
2. Rekombinantes MVA-Virus nach Anspruch 1, wobei das hTyr-Gen unter der Transkriptionskontrolle des frühen/späten Vacciniavirus-Promotors P7.5 steht.

3. Rekombinantes MVA-Virus nach Anspruch 1 oder 2, im wesentlichen frei von zur Replikation in menschlichen Zellen fähigen Viren.
4. Eukaryontische Zelle, infiziert in vitro oder ex vivo mit einem rekombinanten MVA-Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Verwendung des rekombinanten MVA-Virus nach Anspruch 1 bis 3 zur In-vitro-Produktion von rekombinantem hTyr-Protein.
6. Impfstoff mit einem rekombinanten MVA-Virus nach Anspruch 1 bis 3 in einem physiologisch unbedenklichen Träger.
7. Verwendung des rekombinanten MVA-Virus nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung eines Impfstoffs.
8. Rekombinantes MVA-Virus nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3 und/oder Impfstoff nach Anspruch 6 zur Immunisierung eines lebenden Tierkörpers, einschließlich des Menschen.
9. Rekombinantes MVA-Virus und/oder Impfstoff nach Anspruch 8 zur Vorbeugung oder Behandlung von Melanomen.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

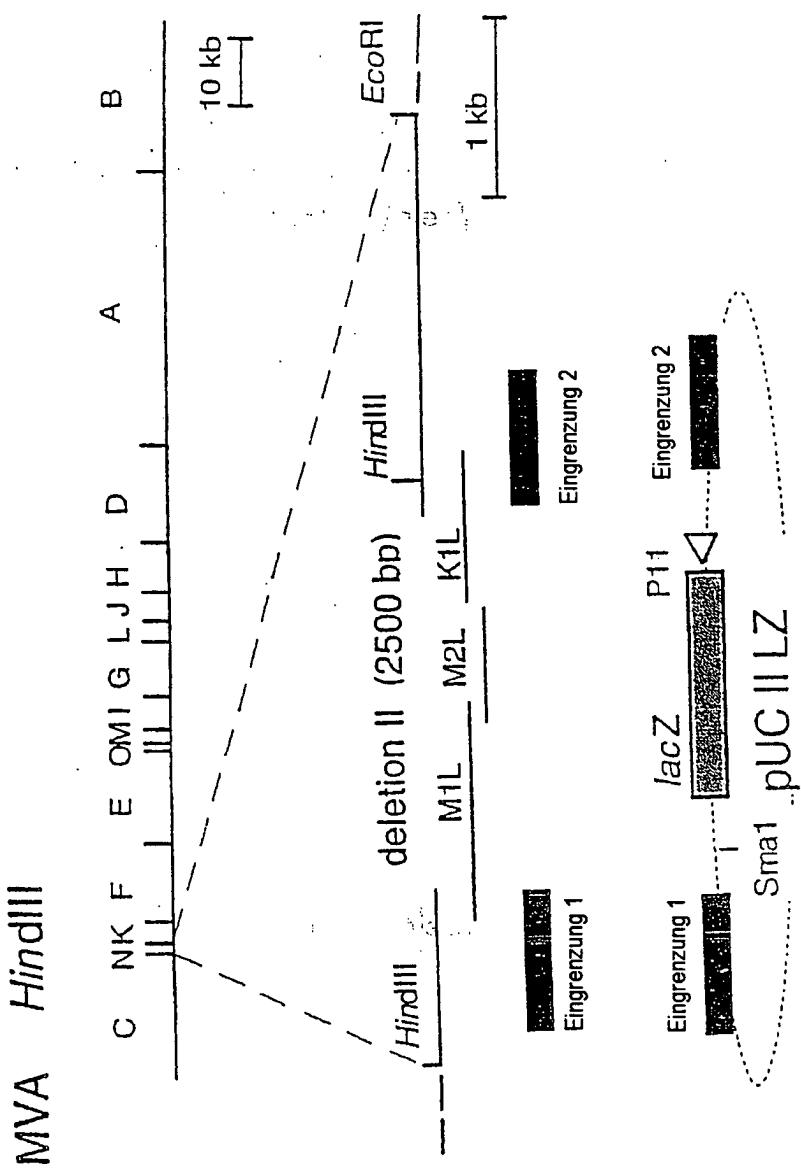


FIG. 1

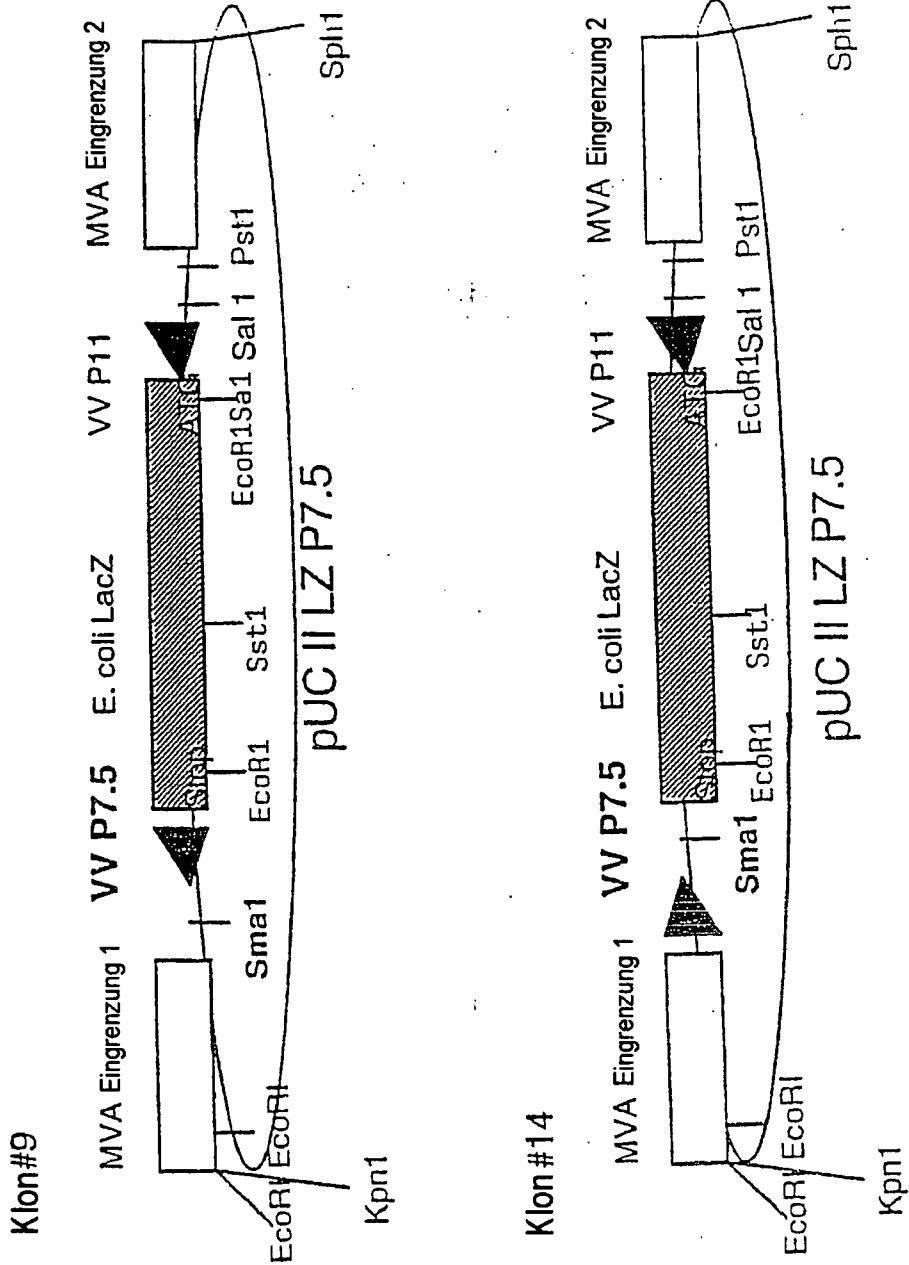


FIG. 2

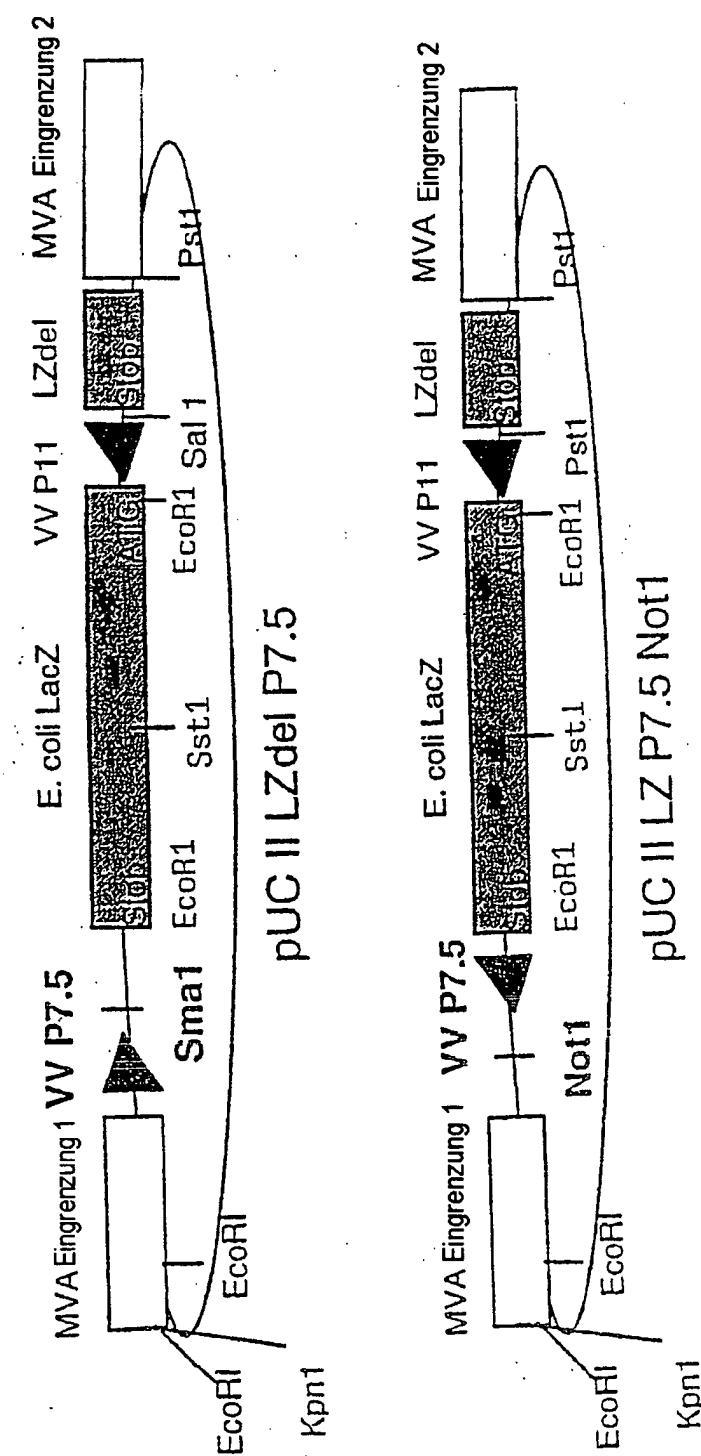


FIG. 3

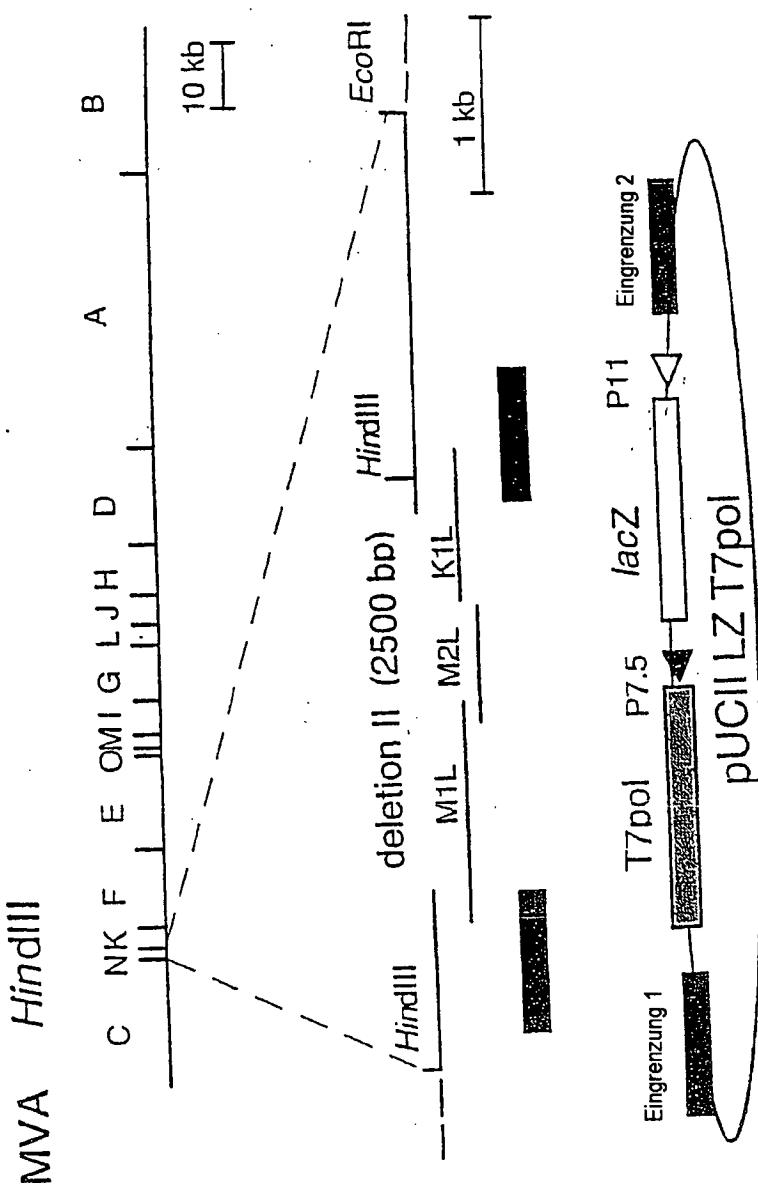


FIG. 4

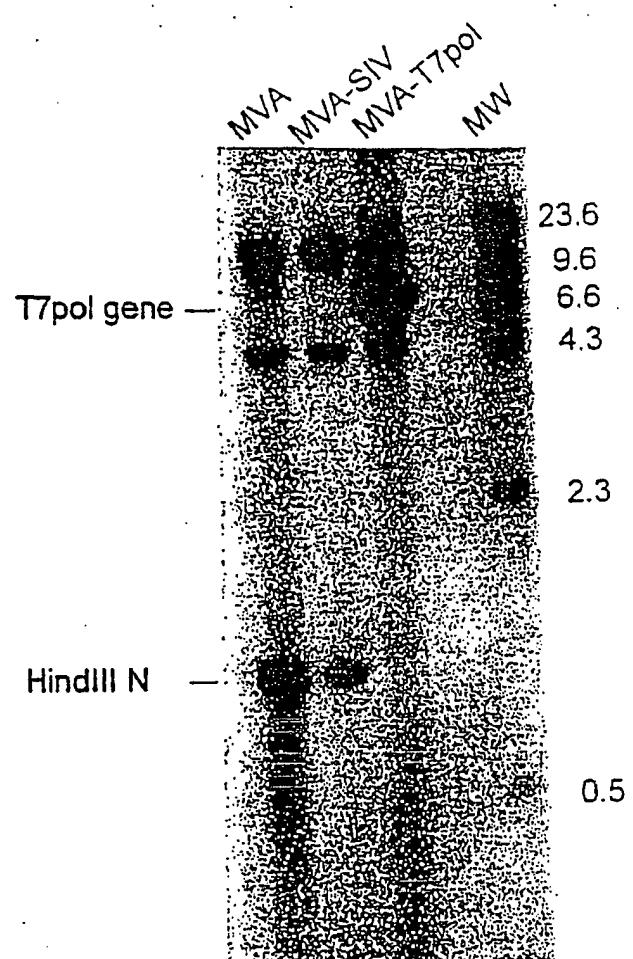


FIG. 5

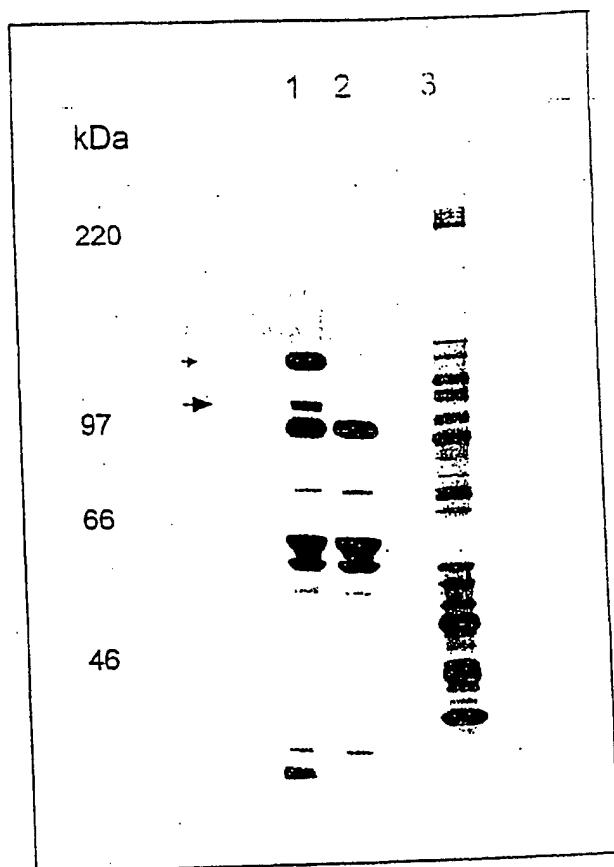


FIG. 6

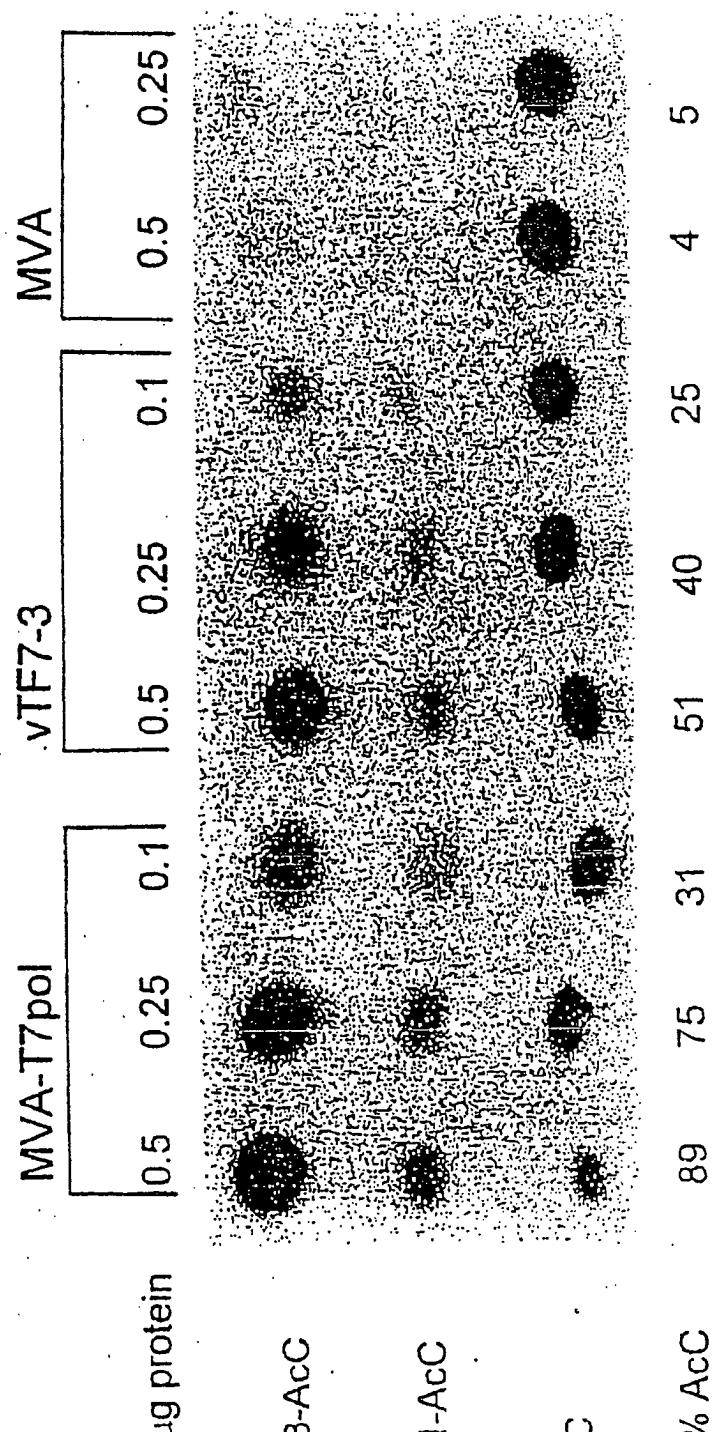


Fig. 7

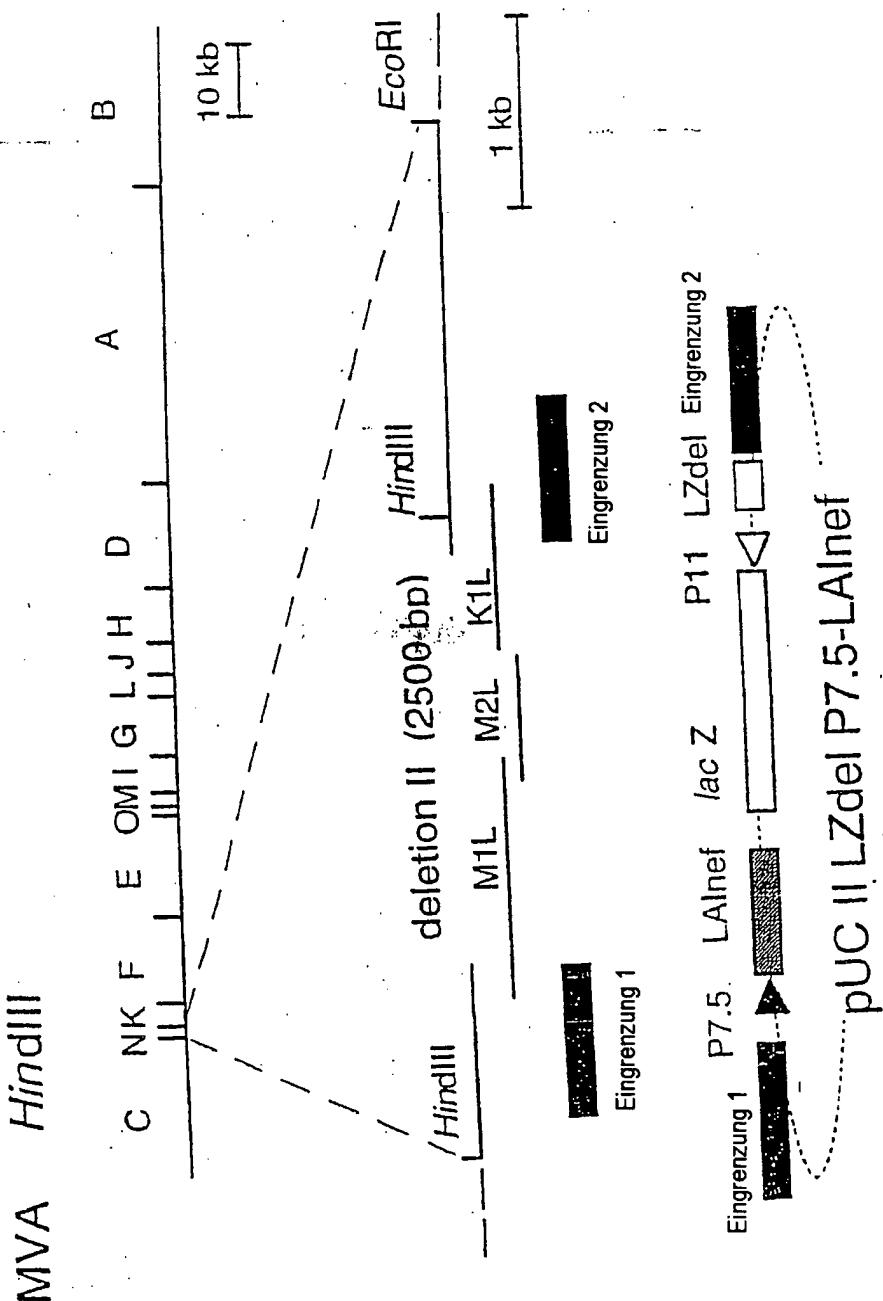


FIG. 8

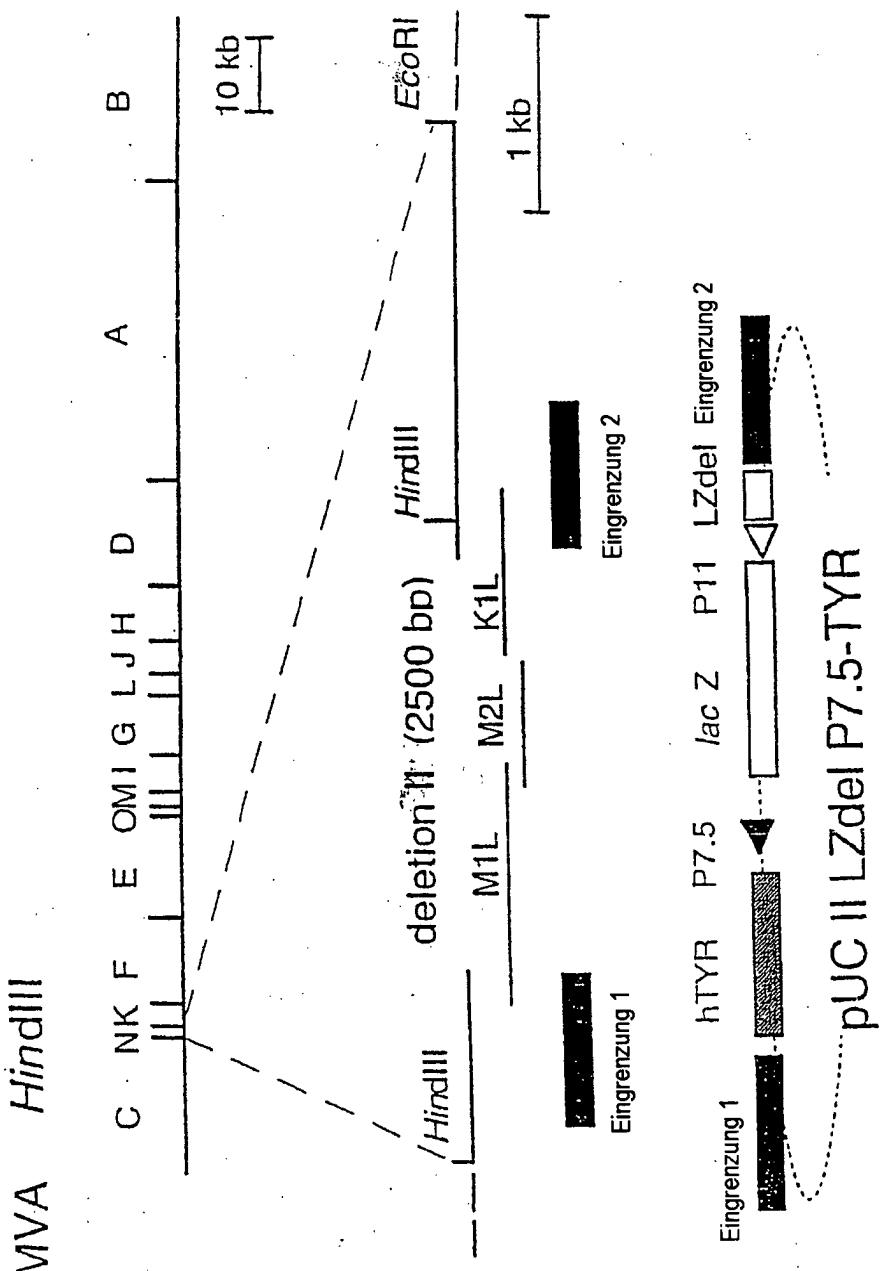


FIG. 9