



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 23 812 T2** 2008.11.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 412 486 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 7/02** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 23 812.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP02/07280**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 740 758.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/008533**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.07.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.01.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.11.2008**

(30) Unionspriorität:
200101122 18.07.2001 DK

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

(73) Patentinhaber:
Bavarian Nordic A/S, Kvistgaard, DK

(72) Erfinder:
HOWLEY, Paul, Berwick, VIC 3806, AU; HELLER, Karl, 85774 Unterföhring, DE; RÄTHER, Ingmar, 82140 Olching, DE

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR VIRUSVERMEHRUNG**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Amplifizieren von Chordopoxvirus, wobei das Poxvirus bei einer Temperatur von etwa 35°C oder unter 35°C vermehrt wird, wobei das Chordopoxvirus ein modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), vorzugsweise MVA-BN, wie bei der ECACC unter der Nr. V00083008 hinterlegt, oder ein Derivat davon ist. Zudem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus in Hühnerembryofibroblastenzellen bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 32°C vermehrt wird. Das Verfahren führt zu verstärkter Virusvermehrung bei der verringerten Temperatur.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Poxviridae umfassen eine große Familie komplexer DNA-Viren, die sich im Zytoplasma von Wirbeltier- und Wirbellosen zellen replizieren. Die Familie der Poxviridae kann in die Unterfamilien Chordopoxvirinae (Wirbeltier-Poxviren) und Entomopoxvirinae (Insekten-Poxviren) unterteilt werden (Fields Virology/Hrsg.: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M.; 3. Aufl./ISBN 0-7817-0253-4/siehe insbesondere Kapitel 83).

[0003] Die Chordopoxvirinae umfassen zahlreiche (in unterschiedliche Gattungen klassifizierte) tierische Poxviren, wie Kamel-Poxviren, Schaf-Poxvirus, Ziegen-Poxvirus oder Avipoxviren, insbesondere Geflügel-Poxvirus, und auch Poxviren, die für Menschen von Bedeutung sind, wie das Variolavirus und das Vacciniavirus.

[0004] Poxviren, insbesondere Chordopoxvirinae, sind bedeutende Krankheitserreger bei Menschen und Tieren. Es gibt auch eine lange Geschichte der Schutzimpfung gegen Pockenvireninfektionen. Vor fast zwei Jahrhunderten wurden Menschen prophylaktisch mit Kuhpocken geimpft, um sie gegen Pocken zu immunisieren. Eine spätere Immunisierung erfolgte mit dem Vacciniavirus. Jedoch führt die Pockenschutzimpfung mit diesem Vacciniavirus gelegentlich zu ernststen Komplikationen, wie postvaccinaler Gehirnentzündung, generalisierter Vaccinia- oder Kontaktinfektion. Dann wurde von Anton Mayr ein neuer Impfstoff entwickelt, der diese Komplikationen nicht zeigt. Der Pocken-Impfstoff besteht aus dem Poxvirus modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) und wurde zur Schutzimpfung gegen Pocken bei etwa 150 000 Schutzimpfungen verwendet, ohne dass er irgendwelche Komplikationen hervorrief, die mit der Schutzimpfung zusammenhingen. Sogar Kinder mit immunologischen Mängeln zeigten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. Das MVA wurde durch Mutation und Selektion des ursprünglichen Vacciniavirus Ankara nach 575 Passagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen erreicht. Die Sicherheit dieses MVA spiegelt sich in den biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. MVA hat ein verringertes Molekulargewicht, sechs Deletionen im Genom und ist für Säugerzellen in hohem Grade attenuiert, d. h. DNA und Protein werden synthetisiert, aber praktisch keine Viruspartikel werden produziert.

[0005] Die Schutzimpfung gegen Pocken war sehr erfolgreich. Im Jahr 1979 erklärte die Weltgesundheitsorganisation die Pocken für ausgerottet. Folglich wurde die Massenschutzimpfung von Kindern eingestellt, und nur Laboranten und Mitglieder der Streitkräfte einiger Länder werden geimpft.

[0006] Mit der Ausrottung der Pocken wurde die überwiegende Ursache einer Pockenvireninfektion bei Menschen beseitigt. Jedoch haben einige nicht-menschliche Poxviren eine verringerte Wirtsspezifität, d. h. sie verursachen Infektionen nicht nur in ihrem typischen Wirt (z. B. bei Kuhpocken die Kuh), sondern auch in anderen Tieren (z. B. Ratten und Katzen). Menschen können auf diesem Weg ebenfalls angesteckt werden. Da Teile der Bevölkerung nicht mehr gegen Pocken immun sind, können Poxvirus-Infektionen von Tierspezies für sie gefährlich sein. Haustiere sind die Hauptquelle für eine Infektion bei Menschen. Dementsprechend ist die Schutzimpfung von Haustieren gegen Poxviren von zunehmender Bedeutung. Zusätzlich sind Poxviren wichtige Vektoren für die Expression fremder Gene, zum Beispiel für die Verwendung als Impfstoff oder zur Gentherapie, d. h. um Nukleinsäuresequenzen in eine Zielzelle einzubringen, in der sie exprimiert werden. Infolgedessen wird ein effizientes und kostenwirksames Produktionsverfahren für Poxviren benötigt.

[0007] Poxviren können in unterschiedlichen Zelltypen amplifiziert werden. Zum Beispiel werden Chordopoxvirinae, insbesondere MVA, in Zellkulturen von primären oder sekundären Hühnerembryofibroblasten (CEF) amplifiziert. Die Zellen werden von Embryonen von Hühnereiern erhalten, die 10 bis 12 Tage bebrütet wurden. Die Zellen der Embryonen werden dann dissoziiert und gereinigt. Diese primären CEF-Zellen können entweder direkt oder nach einer weiteren Zellpassage als sekundäre CEF-Zellen verwendet werden. Anschließend werden die primären oder sekundären CEF-Zellen mit dem MVA infiziert. Für die Amplifizierung von MVA werden die infizierten Zellen für 2–3 Tage bei 37°C inkubiert (siehe z. B. Meyer, H. et al. 1991; J. of General Virology 72, 1031–1038; Sutter et al. 1994, Vaccine, Bd. 12, Nr. 11, 1032–1040). Obgleich andere Chordopoxviren in

unterschiedlichen Zelltypen amplifiziert werden, wird in diesen Fällen die gleiche Temperatur von 37°C gewählt. Zum Beispiel wird auch Vacciniavirus, das von der ATCC (Nr. VR1354) erhältlich ist und in Hela-S3-Zellen (humanen Cervixkarzinomzellen) kultiviert wird, für 3 Tage bei 37°C inkubiert (Current protocols in molecular biology 1998, Kapitel 16, Einheit 16.16, John Wiley & Sons, Inc.). Außerdem wird das MVA, das an das Wachstum in Verozellen (Affennierezellen) angepasst ist, ebenfalls bei 37°C amplifiziert (PCT/EP01/02703). Infolgedessen wird unabhängig von den zur Amplifizierung verwendeten Zellen und unabhängig von der Spezies oder dem Stamm des Chordopoxvirus die Amplifizierung der Viren bei 37°C durchgeführt. Diese gewählte Temperatur entspricht dem Allgemeinwissen des Facharztes: praktisch ausschließlich in Labors amplifizierte Pockenviren werden von warmblütigen Tieren mit einer Körpertemperatur von etwa 37°C erhalten. Da Chordopoxviren an das Wachstum in diesen Tiere angepasst sind, sind sie an das Wachstum bei 37°C angepasst, d. h. sie sollten sich bei 37°C am effizientesten vermehren.

[0008] Aus ähnlichen Gründen werden Entomopoxviren bei Temperaturen unterhalb von 37°C kultiviert: Die Körpertemperatur von Insekten ist signifikant niedriger als 37°C und hängt in einem größeren Ausmaß von der Temperatur der Umgebung ab. So sind im Gegensatz zu Chordopoxviren die Entomopoxviren an das Wachstum bei niedrigeren Temperaturen angepasst. US 5,721,352 und US 5,174,993 offenbaren eine optimale Temperatur für das Wachstum der Entomopoxvirus-Spezies *Amsacta moorei* Entomopoxvirus (AmEPV) von 28°C im Labor. Jedoch offenbaren diese Patente nicht die Kultivierung von Chordopoxviren unter diesen Temperaturbedingungen.

[0009] Außerdem wird die Produktion von Impfstoffen gegen andere Virusinfektionen im allgemeinen bei 37°C durchgeführt. Nur einige Masern-Impfstoffe werden bei einer niedrigeren Temperatur produziert. In diesem Fall wurde ein Masern-Impfstoff, der ursprünglich bei 37°C produziert worden war und häufig schwerwiegende Nebenwirkungen verursachte, durch kontinuierliches Passagieren des Virus bei 32°C attenuiert. Nach 85 Passagen des Stammes bei 32°C war der Stamm attenuiert, d. h. die krankheitsverursachende Fähigkeit des Virus war beträchtlich verringert (Plotkin, Orenstein: Vaccines, 3. Auflage, 230–232). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass von Viren warmblütiger Tiere und insbesondere von Vacciniaviren erwartet wird, dass sie sich bei 37°C am effizientesten vermehren, weil sie in Tieren mit dieser Körpertemperatur gefunden werden und eine Anpassung an eine niedrigere Temperatur nur nach mehrfachen Passagen bei dieser niedrigeren Temperatur erzielt wird. Außerdem geht die Anpassung an eine niedrigere Temperatur mit einer Attenuation und folglich häufig mit einer verringerten Reproduktionskapazität des Virus einher.

[0010] US 5,616,487 offenbart ein Verfahren zur Herstellung eines stabilisierten Virus, insbesondere eines stabilisierten Retrovirus, durch Kultivieren virusproduzierender Zellen mit einem Stabilisierungsmittel bei einer Temperatur unterhalb von 37°C. Die Stabilisierungsmittel sind Lipide oder oberflächenaktive Mittel. Das Patent offenbart spezifisch Pluronic F-68 und Lipid-Konzentrat als Stabilisierungsmittel. Von Lipid-Konzentrat wird gesagt, dass es Cholesterin, Kabeljauleberöl, Pluronic F-68, D-alpha-Tocopherolacetat und Tween 80 enthält. In einer alternativen Ausführungsform offenbart US 5,616,487 ein Verfahren zur Kultivierung spezifischer retrovirusproduzierender Zellen bei einer Temperatur unterhalb von 37°C, wobei das produzierte Retrovirus unter Verwendung eines Stabilisators, wie oben definiert, stabilisiert wird.

Aufgabe der Erfindung

[0011] Es war eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Vermehren von Chordopoxviren bereitzustellen, das zu einer höheren Ausbeute an Viruspartikeln pro infizierter Zelle führt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0012] Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus gelöst, wobei die virusproduzierenden Zellen bei einer Temperatur von etwa 35°C oder unter 35°C kultiviert werden, wobei das Chordopoxvirus ein modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) ist.

[0013] Weiterhin wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus gelöst, wobei das Virus in Hühnerembryofibroblasten bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 32°C vermehrt wird.

[0014] Es wurde überraschenderweise gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren zu einer viel effizienteren Amplifizierung des Virus bei der niedrigeren Temperatur (bei etwa 35°C oder unterhalb von 35°C) führt, was wiederum zu einer höheren Virusausbeute im Verhältnis zu der Anzahl der infizierten Zellen führt. Infolgedessen sind weniger Zellen erforderlich, um die gleiche Virusmenge zu produzieren. Dies ist besonders vor-

teilhaft für modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), da die Produktion von CEF-Zellen, die für die MVA-Amplifizierung erforderlich sind, mühsam und kostspielig ist. Außerdem gestattet die Verringerung der Inkubationstemperatur die Einsparung von Energie während des Amplifizierungsverfahrens des Poxvirus und spart folglich Kosten bei der Produktion der Viren.

[0015] Der Begriff "Poxvirus", wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet, betrifft vorzugsweise Poxviren der Unterfamilie Chordopoxvirinae (Wirbeltier-Poxviren) (Fields Virology/Hrsg.: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M.; 3. Aufl./ISBN 0-7817-0253-4/siehe insbesondere Kapitel 83). Die Begriffe "Chordopoxviren", "Chordopoxvirinae" und "Wirbeltier-Poxviren" werden in der vorliegenden Anmeldung austauschbar verwendet. Bevorzugte Chordopoxviren sind Poxviren der Gattungen Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Lepripoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus und Yatapoxvirus. Am stärksten bevorzugt sind Poxviren der Gattungen Orthopoxvirus und Avipoxvirus.

[0016] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Chordopoxvirus, das durch das erfindungsgemäße Verfahren produziert wird, ein Chordopoxvirus, das als Impfstoff verwendbar ist oder das als gentherapeutischer Vektor verwendet werden kann, um Gene von Interesse in eine Wirtszelle einzubringen. Geeignete Virusstämme sind dem Fachmann bekannt. Geeignete Stämme können z. B. von der American Type Culture Collection (ATCC) oder der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) erhalten werden.

[0017] Wie oben erwähnt, sind besonders bevorzugte Chordopoxviren für die Produktion gemäß dem vorliegenden Verfahren Avipoxviren und Orthopoxviren. Beispiele für Orthopoxviren sind Vacciniaviren, wie die Vacciniavirus-Stämme Elstree, Western Reserve, Wyeth, NYVAC, NYCBOH, Paris, Kopenhagen, stärker bevorzugt die verschiedenen MVA-Stämme und am stärksten bevorzugt MVA-BN, das bei der ECACC unter V00083008 hinterlegt wurde, oder Derivate davon. MVA-BN und seine Derivate sind im Detail in der PCT-Anmeldung PCT/EP01/13628 mit dem Titel "Modified Vaccinia Ankara Virus Variant" beschrieben.

[0018] Ein "Derivat" des hinterlegten Virus ist ein Virus, das im Wesentlichen die gleichen Wachstumseigenschaften, insbesondere die gleiche Temperaturabhängigkeit, zeigt wie der hinterlegte Stamm, sich aber in mindestens einem Teil seines Genoms unterscheiden kann.

[0019] Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit Wildtyp-Viren, attenuierten Viren bzw. rekombinanten Viren durchgeführt werden.

[0020] Ein "attenuiertes Virus" ist ein Virus, das von einem pathogenen Virus abstammt, das aber nach Infektion der Wirtsorganismus zu einer niedrigeren Sterblichkeit und/oder Morbidität verglichen mit dem nicht-attenuierten Parentalvirus führt. Beispiele für attenuierte Poxviren sind dem Fachmann bekannt. Ein Beispiel für ein attenuiertes Vacciniavirus ist der Stamm MVA, insbesondere der Stamm, der bei der ECACC unter der Hinterlegungsnummer V00083008 hinterlegt worden ist (siehe oben).

[0021] Der Begriff "rekombinantes Virus" bezieht sich ein Virus, in dessen Virengenom ein heterologes Gen eingesetzt worden ist, das nicht natürlicherweise Teil des Virengenoms ist. Ein heterologes Gen kann ein therapeutisches Gen, ein Gen, das für ein Peptid kodiert, das mindestens ein Epitop umfasst, so dass eine Immunantwort hervorgerufen wird; eine Antisense-Expressionskassette oder ein Ribozymgen sein. Die Verfahren zur Konstruktion rekombinanter Viren sind dem Fachmann bekannt. Der am stärksten bevorzugte Poxvirus-Vektor ist MVA, insbesondere MVA 575 und MVA-BN (siehe oben).

[0022] Im Gegensatz zu allen vorhergehenden Lehren im Stand der Technik fanden die Erfinder der vorliegenden Erfindung, dass aus sechs Temperaturen zwischen 26°C und 37°C die Poxviren, insbesondere die Chordopoxviren, sich am wenigsten effizient bei einer der Inkubations-(Kultivierungs-)temperatur von 37°C vermehrten. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Verfahren zur Amplifizierung von Poxvirus, insbesondere Chordopoxvirus, zu höheren Ausbeuten an Virus führt, wenn die virusproduzierenden Zellen bei einer Temperatur unterhalb von 37°C, vorzugsweise zwischen 36,5°C und 26°C oder zwischen etwa 26°C und etwa 36°C, stärker bevorzugt zwischen 28°C und 33°C, noch stärker bevorzugt zwischen 28°C und 32°C, am stärksten bevorzugt bei 30°C kultiviert werden.

[0023] Ein weiterer bevorzugter Temperaturbereich ist 30°C bis 36,5°C. Besonders gute Ergebnisse wurden in den Unterbereichen 30°C bis 35°C, 30°C bis 33°C und 30°C bis 32°C erzielt. Die am stärksten bevorzugte Temperatur ist 30°C.

[0024] Der Begriff "etwa" in Zusammenhang mit Temperaturwerten verweist vorzugsweise auf die spezifisch

erwähnten Temperaturen und auf Temperaturen, die bis 0,5°C höher oder niedriger sind als die spezifisch erwähnten Temperaturen. Zum Beispiel soll eine Temperatur von "etwa 30°C" als Temperatur im Bereich von 29,5°C bis 30,5°C interpretiert werden.

[0025] Allgemeiner gesagt, wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren das jeweilige Poxvirus durch Kultivierung einer infizierten Zelle bei einer Temperatur produziert, die niedriger als die Körpertemperatur des Tieres, einschließlich eines Menschen, d. h. des natürlichen Wirtes des jeweiligen Poxvirus ist. Soweit es Vacciniavirus betrifft, werden Büffel als natürlicher Wirt angesehen (Baxby, D.: Jenner's smallpox vaccine: the riddle of vaccinia virus and its origin. London: Heinemann Educational; 1981: 1–214).

[0026] Die Kultivierung von virusproduzierenden Zellen wird vorzugsweise für mindestens 24 Stunden, stärker bevorzugt für mindestens 2 Tage oder für mindestens 3 Tage durchgeführt. Normalerweise werden virusfreie Zellen bei 37°C gezüchtet, bis eine genügende Menge an Zellen erhalten wird. Dann wird die Zellkultur mit dem Virus angeimpft, und die Temperatur wird dann auf die oben angegebene Temperatur verringert. Bei einer alternativen Ausführungsform wird die Zellkultur auf die oben genannte Temperatur gebracht, bevor sie mit dem Virus angeimpft wird.

[0027] Die Medien, die für die Kultivierung der Zellen vor der Infektion und für die Produktion des Virus unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden, können gleich oder unterschiedlich sein. Alle Medien sind herkömmliche Standardmedien, die dem Fachmann bekannt sind. Bei Bedarf ist es möglich, weitere Zusatzstoffe, wie Antibiotika, zusätzliche Aminosäuren und/oder fötales Kälberserum, hinzuzufügen.

[0028] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die Medien, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, keine Lipide oder oberflächenaktive Mittel zur Stabilisierung der viralen Lipidhülle. Stärker bevorzugt enthalten die Medien, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, keine der folgenden Stabilisierungsmittel: Pluronic F-68, die Kombination von Pluronic F-68 und Tween 80TM oder Lipid-Konzentrat (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, Katalognr.: 21900-014), das Cholesterin, Kabeljauleberöl, Pluronic F-68, D-alpha-Tocopherolacetat und Tween 80 enthält.

[0029] Für die Chordopoxviren sind dem Fachmann Zellen bekannt, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Der Typ und die Natur der Zellen ist nicht entscheidend, solange die Zellen mit dem jeweiligen Virus infiziert werden können und solange Virusnachkommen aus den infizierten Zellen produziert werden. Vorzugsweise sollte die Infektionsmultiplizität niedriger als 1 sein.

[0030] Besonders bevorzugte Zellen sind Wirbeltierzellen, z. B. Säuger- oder Vogelzellen.

[0031] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Wirbeltierzellen, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren für Vacciniaviren, insbesondere für die Vacciniavirus-Stämme Elstree und MVA, verwendet werden können, Hühnerembryofibroblasten (CEF). Es war besonders unerwartet, dass das erfindungsgemäße Verfahren für CEF-Zellen verwendet werden kann, da Hühner eine normale durchschnittliche Körpertemperatur von 41°C haben. Somit sind die erfindungsgemäß verwendeten Temperaturen von etwa 35°C oder unterhalb von 35°C, vorzugsweise von zwischen 35°C und 26°C, stärker bevorzugt zwischen 28°C und 33°C, noch stärker bevorzugt zwischen 28°C und 32°C, am stärksten bevorzugt von 30°C, so verschieden von der normalen Körpertemperatur des Huhns, dass man angenommen hätte, dass diese Zellen nicht für die Vermehrung von Vacciniaviren bei diesen Temperaturen verwendet werden können. Die gleichen Überlegungen gelten für Temperaturen im Bereich von 30°C bis 36,5°C, 30°C bis 33°C, 30°C bis 32°C und insbesondere für die Temperatur von 30°C.

[0032] Außerdem wird das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise in stationären Kolben durchgeführt.

[0033] Ein weiterer Vorteil ist, dass das Verfahren zu erhöhten Ausbeuten mit "normalen" Virusstämmen führt, die keine temperatursensitive Mutation oder lange und schwierige Attenuation auf die verringerte Temperatur erfordern. Anders gesagt, ist es nicht erforderlich, temperaturattenuierte oder temperatursensitive Mutanten zu verwenden, um höhere Ausbeuten an Viruspartikeln bei der niedrigeren Temperatur verglichen mit 37°C zu erzielen.

[0034] Von temperaturattenuiertem Virus oder temperatursensitiven Mutanten ist bekannt, dass sie besser bei der niedrigeren Temperatur amplifiziert werden; jedoch sind solche Stämme normalerweise weniger reproduktiv als nicht-attenuierte oder nicht-temperatursensitive Mutanten. Folglich liegt der große Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens in der Tatsache, dass es auf alle Arten von normalen, hochgradig reproduktiven

Virusstämmen angewendet werden kann.

[0035] Das erfindungsgemäß hergestellte Virus wird vorzugsweise als Impfstoff oder zur Herstellung einer Zusammensetzung, die bei einem Gentherapieprotokoll verwendet wird, verwendet. Solche Anwendungen von Poxvirus sind im Stand der Technik gut etabliert.

Kurze Beschreibung der Figuren

[Fig. 1](#)

[0036] In [Fig. 1](#) sind einzelne Werte aus Experiment 1 in Doppelansätzen durchgeführt worden (als Punkte dargestellt). Balken stellen die Mittelwerte dar. Einzelne Werte siehe in Tabelle 1.

[Fig. 2](#)

[0037] In [Fig. 2](#) sind einzelne Werte aus Experiment 2 in Doppelansätzen durchgeführt worden (als Punkte dargestellt). Balken stellen die Mittelwerte dar. Einzelne Werte siehe in Tabelle 2.

[Fig. 3](#)

[0038] In [Fig. 3](#) sind die Punkte einzelne Werte aus den Experimenten mit den vier verschiedenen Temperaturen (Experiment 3), die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Balken stellen die Mittelwerte dar. Einzelne Werte siehe in Tabelle 3.

[Fig. 4](#)

[0039] In [Fig. 4](#) sind die Punkte einzelne Werte aus den Experimenten mit den vier verschiedenen Temperaturen (Experiment 4), die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Balken stellen die Mittelwerte dar. Einzelne Werte siehe in Tabelle 4.

[Fig. 5](#)

[0040] In [Fig. 5](#) sind die Balken die Mittelwerte der in Dreifachansätzen bei 30°C und 37°C durchgeführten Experimente. Einzelne Werte siehe in Tabelle 5.

Zusammenfassung der Erfindung

[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft folgende Ausführungsformen:

- ein Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 35°C oder unter 37°C vermehrt wird, wobei das Chordopoxvirus ein modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) ist. Vorzugsweise MVA-BN, wie bei der ECACC unter der Nr. V00083008 hinterlegt, oder ein Derivat davon. Das vorstehende Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass das Virus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 35°C vermehrt wird;
- das vorstehende Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Virus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 28°C bis etwa 33°C vermehrt wird;
- das vorstehende Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Virus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30°C bis etwa 33°C vermehrt wird;
- ein Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus in Hühnerembryofibroblastenzellen bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 32°C vermehrt wird;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Virus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30°C vermehrt wird;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Virusvermehrung für mindestens 24 Stunden durchgeführt wird;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Virusvermehrung für mindestens 2 bis 3 Tage durchgeführt wird;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Chordopoxvirus ein als Impfstoff oder Gentherapievektor geeignetes Virus ist;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Chordopoxvirus aus der Gruppe ausgewählt ist, die Avipoxvirus und Orthopoxvirus umfasst;
- die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Virus ein Vacciniavirus ist;

die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Virus modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), vorzugsweise MVA-BN, wie bei der ECACC unter der Nr. V00083008 hinterlegt, oder ein Derivat davon ist;

die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Verfahren in einem stationären Kolben durchgeführt wird;

die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Poxvirus kein temperatursensitives mutiertes Virus ist;

die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Poxvirus kein temperaturattenuiertes Virus ist;

die vorstehenden Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Virus in Hühnerembryofibroblastenzellen vermehrt wird;

ein gemäß einem der vorstehenden Verfahren hergestelltes Virus;

eine Zusammensetzung, die das Virus, wie vorstehend, enthält;

ein Impfstoff, der das Virus, wie vorstehend, enthält;

eine Zusammensetzung zur Verwendung bei der Gentherapie, die ein Virusgenom des Virus umfasst, das gemäß einem der vorstehenden Verfahren hergestellt wurde;

Verwendung eines gemäß einem der vorstehenden Verfahren hergestellten Virus als Impfstoff;

Verwendung eines gemäß einem der vorstehenden Verfahren vorgeschlagenen Virus bei der Gentherapie.

Beispiele

[0042] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung weiter.

Beispiel 1: Wirkung der Temperatur auf die Multiplikation von MVA

Zellkulturbedingungen

[0043] Primäre CEF-Zellen wurden in einer Impfzelldichte von 2×10^7 CEF-Zellen/185 cm² in stationäre Kolben überimpft. Die Zellen wurden in VP-SFM + 4 mM L-Glutamin und 1% Antibiotika/Antimykotika überimpft. Am Tag vier nach dem Überimpfen wurde eine Zelldichte von 5×10^7 CEF-Zellen/185 cm² angenommen. Die Zellen wurden mit 0,1 TCID₅₀/Zelle MVA-BN (hinterlegt bei der ECACC unter der Hinterlegungs-Nr. V 00083008) unter Verwendung von RPMI mit/ohne FCS infiziert. Die Infektion, auf die eine Inkubation für 72 Std. folgte, wurde bei 30°C und 37°C (in den Experimenten 1 und 2 mit zwei unterschiedlichen CEF-Zubereitungen), bei 30, 33, 35 und 37°C (Experiment 3) und 26, 28, 30 und 33°C (Experiment 4) durchgeführt. Die Experimente wurden für jede Temperatur in Doppelansätzen durchgeführt. Die Virusreplikation wurde durch Abkratzen der Zellen in die Medien und durch Einfrieren der Medien und Zellen zusammen bei -20°C gestoppt. Dieses Gemisch wurde weitere zweimal eingefroren/aufgetaut, um das Virus mechanisch aus den Zellen freizusetzen. Für die Experimente mit 4 verschiedenen Infektionstemperaturen wurde die Virusreplikation durch Einfrieren stationärer Kolben bei -20°C abgestoppt. Dieses Gemisch wurde weitere dreimal eingefroren/aufgetaut, um das Virus mechanisch aus den Zellen freizusetzen.

[0044] Die Virustiter aus jedem stationären Kolben wurden unter Verwendung eines immunhistochemischen Assays festgestellt. Infizierte Zellen wurden mit einem für Vacciniavirus spezifischen Antikörper angefärbt. Als zweites wurde ein mit HRP gekoppelter Antikörper, der gegen den Vacciniavirus-Antikörper gerichtet war, hinzugefügt. Nach Zugabe eines Substrates erscheinen infizierte Zellen in blauer oder brauner Farbe. Die Auswertung des Assays erfolgte unter Verwendung der Formel von Spearman und Kaerber, wobei die TCID₅₀/ml (Gewebekultur-infektiöse Dosis) bestimmt wurde. Die Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Als ein Akzeptanzkriterium für Titrationsergebnisse wurde ein MVA-BN-Standard mit bekanntem Titer als interne Kontrolle für jedes Titrationsexperiment verwendet. Die Ergebnisse der Experimente wurden nur verwendet, wenn die Werte für den MVA-BN-Standard nicht mehr als $\pm 0,5$ logs von dem gesamten Durchschnitt abwichen.

Ergebnisse

[0045] Um mögliche Wachstumsschwankungen der primären CEF-Zellen einzuschließen, wurden die Experimente mit zwei verschiedenen Zellzubereitungen durchgeführt, wenn die Infektionstemperaturen 30°C und 37°C verglichen wurden. Die Ergebnisse aus den zwei unabhängigen Infektionsexperimenten sind in Tabelle 1–2 und [Fig. 1–Fig. 2](#) gezeigt.

[0046] Die Ergebnisse der Experimente 1 und 2 zeigen eine deutlichen Zunahme der Virusausbeute bei 30°C verglichen mit 37°C. In Experiment 1 wurde eine Zunahme von 0,5 logs und in Experiment 2 von etwa 0,7 logs

erzielt.

Tabelle 1: Tabelle 1 zeigt Werte aus Experiment 1.

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 37°C
Kolben a	7,50 E + 07	3,20 E + 07
Kolben b	1,30 E + 08	3,20 E + 07
Mittelwert	1,00 E + 08	3,20 E + 07

Tabelle 2: Tabelle 2 zeigt Werte aus Experiment 2.

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 37°C
Kolben a	1,30 E + 08	3,20 E + 07
Kolben b	1,30 E + 08	2,40 E + 07
Mittelwert	1,30 E + 08	2,70 E + 07

[0047] Die Daten aus den ersten 2 Experimenten sind sehr viel versprechend, dass eine Zunahme in der Ausbeute an MVA durch Verringern der Inkubationstemperatur nach Infektion erzielt werden kann. Folglich wurde entschieden, weiterzumachen und auch andere Temperaturen auszuprobieren, um eine optimale Infektionstemperatur zu finden. Die verwendeten Temperaturen waren 30, 33, 35 und 37°C. Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Tabelle 3 und [Fig. 3](#) dargestellt.

[0048] Ein Vergleich der Ausbeuten von 37°C und niedrigeren Infektionstemperaturen (35, 33, 30°C) zeigte eine deutliche Zunahme bei den niedrigeren Temperaturen. Der beste Virustiter [TCID₅₀/ml] wurde in diesem Experiment mit einer Infektionstemperatur von 30°C erhalten und war 0,8 logs höher verglichen mit 37°C.

Tabelle 3: Tabelle 3 zeigt die bei 30, 33, 35 und 37°C erhaltenen Virustiter [TCID₅₀/ml].

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 33°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 35°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 37°C
Kolben a	1,30 E + 08	5,60 E + 07	3,20 E + 07	3,20 E + 07
Kolben b	1,30 E + 08	1,00 E + 08	7,50 E + 07	1,30 E + 07
Mittelwert	1,30 E + 08	7,50 E + 07	4,90 E + 07	2,10 E + 07

[0049] Im nächsten Experiment wurden in stationären Kolben sogar noch niedrigere Temperaturen als 30°C getestet, um zu untersuchen, ob 30°C wirklich die optimale Temperatur für die Verdopplung von MVA in CEF-Zellen ist. Deshalb wurden 26, 28, 30 und 33°C verwendet. Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Tabelle 4 und [Fig. 4](#) gezeigt.

Tabelle 4: Tabelle 4 zeigt die bei 26, 28, 30 und 33°C erhaltenen Virustiter [TCID₅₀/ml].

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 26°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 28°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] bei 33°C
Kolben a	3,20 E + 07	1,00 E + 08	4,20 E + 08	1,80 E + 08
Kolben b	1,00 E + 08	1,80 E + 08	2,40 E + 08	1,00 E + 08
Mittelwert	5,60 E + 07	1,30 E + 08	3,20 E + 08	1,30 E + 08

[0050] Die höchste Ausbeute wurde in diesem Experiment bei einer Inkubationstemperatur nach Infektion von 30°C gefunden. Bei einem Vergleich der Daten aus dem vorherigen Experiment (4 Temperaturen zwischen 30 und 37°C) und diesem wurde 30°C als die optimale Temperatur für die Inkubation nach Infektion für die Multiplikation von MVA auf CEF-Zellen in stationären Kolben identifiziert.

[0051] Bei einer Analyse der Virustiter der einzelnen Temperaturen dieser zwei Experimente wurde deutlich, dass die Inkubation bei 37°C sogar die niedrigste Virusausschüttung von den 6 verwendeten Temperaturen ergeben könnte. Die beobachtete Reihenfolge für die Ausschüttungen bei den verwendeten Temperaturen ist wie folgt: 30°C > 33°C/28°C > 35°C/26°C > 37°C.

Beispiel 2: Wirkung der Temperatur auf die Multiplikation des Vacciniavirus-Stammes Elstree

[0052] Bei einem anderen Ansatz wurde der Vacciniavirus-Stamm Elstree zusätzlich zu MVA-BN hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit untersucht. MVA-BN und Elstree wurden auf CEF-Zellen vermehrt. Für das Experiment wurden primäre CEF-Zellen mit einer Impfdichtede von 2×10^7 CEF-Zellen/175 cm² in stationäre Kolben überimpft. Die Zellen wurden in Kulturmedien + 4 mM L-Glutamin und 1% Antibiotika/Antimykotika überimpft. Am Tag vier nach dem Überimpfen wurde eine Zelldichte von 5×10^7 CEF-Zellen/175 cm² angenommen. Die Zellen wurden mit 0,1 TCID₅₀/Zelle MVA-BN unter Verwendung von RPMI mit/ohne FCS beziehungsweise mit Elstree infiziert. Die Infektion, auf die eine Inkubation für 72 Std. folgte, wurde bei 30°C und 37°C durchgeführt. Das Experiment wurde für jede Temperatur in Dreifachansätzen durchgeführt. Die Virusreplikation wurde durch Einfrieren stationärer Kolben bei -20°C abgestoppt. Dieses Gemisch wurde weitere dreimal eingefroren/aufgetaut, um das Virus mechanisch aus den Zellen freizusetzen.

[0053] Die Virustiter jedes stationären Kolbens wurden durch Titrieren gemäß SOP/MVA/04 bestimmt. Als Akzeptanzkriterium für Titrationsergebnisse wurde ein MVA-F6-Standard mit bekanntem Titer als interne Kontrolle für jedes Titrationsexperiment verwendet. Die Ergebnisse der Experimente wurden nur verwendet, wenn die Werte des MVA-F6-Standards sich um nicht mehr als ±0,5 logs unterschieden.

[0054] Die Ergebnisse der Infektionsexperimente sind in Tabelle 5 und [Fig. 5](#) gezeigt.

[0055] Die Daten des Experimentes mit MVA-BN zeigen eine deutliche Zunahme der Virusausschüttung bei 30°C verglichen mit 37°C (0,667 logs). In den Experimenten mit Elstree wurde eine Zunahme von 1,125 s log bei 30°C verglichen mit 37°C gefunden.

Tabelle 5: Tabelle 5 zeigt die bei 30 und 37°C für MVA-BN und den Vacciniavirus-Stamm Elstree erhaltenen Virustiter [\log_{10} TCID₅₀/ml].

	MVA 30°C	MVA 37°C	Elstree 30°C CEF-Zellen	Elstree 37°C CEF-Zellen
Kolben a	9,0	7,88	7,25	6,375
Kolben b	8,0	8,0	8	6,5
Kolben c	8,25	7,38	7,5	6,5
Mittelwert	8,42	7,75	7,583	6,458

Patentansprüche

1. Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Virus in Kulturmedien bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 35°C oder unter 35°C vermehrt wird, wobei das Chordopoxvirus ein modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), vorzugsweise MVA-BN, wie bei der ECACC unter der Nr. V00083008 hinterlegt, oder ein Derivat davon ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Poxvirus in Hühnerembryofibroblastenzellen vermehrt wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Chordopoxvirus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 35°C vermehrt wird.

4. Verfahren zum Amplifizieren eines Chordopoxvirus, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Virus in Hühnerembryofibroblastenzellen bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 26°C bis 32°C vermehrt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Chordopoxvirus aus der Gruppe ausgewählt ist, die Avipoxvirus und Orthopoxvirus umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Orthopoxvirus ein Vacciniavirus ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Vacciniavirus aus dem Stamm Elstree und modifiziertem Vacciniavirus Ankara (MVA), vorzugsweise MVA-BN, wie bei der ECACC unter der Nr. V00083008 hinterlegt, oder einem Derivat davon ausgewählt ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Chordopoxvirus bei einer Kultivierungstemperatur von 28°C bis 35°C vermehrt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Chordopoxvirus bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30°C vermehrt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Virusvermehrung für mindestens 24 Stunden durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Virusvermehrung für mindestens 2 bis 3 Tage durchgeführt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Chordopoxvirus ein als Impfstoff oder Gentherapievektor geeignetes Virus ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Verfahren in einem stationären Kolben durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Poxvirus kein temperatursensitives mutiertes Virus ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Poxvirus kein temperaturattenuiertes Virus ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei keine Lipide oder oberflächenaktiven Mittel zu den Kulturmedien hinzugefügt werden.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

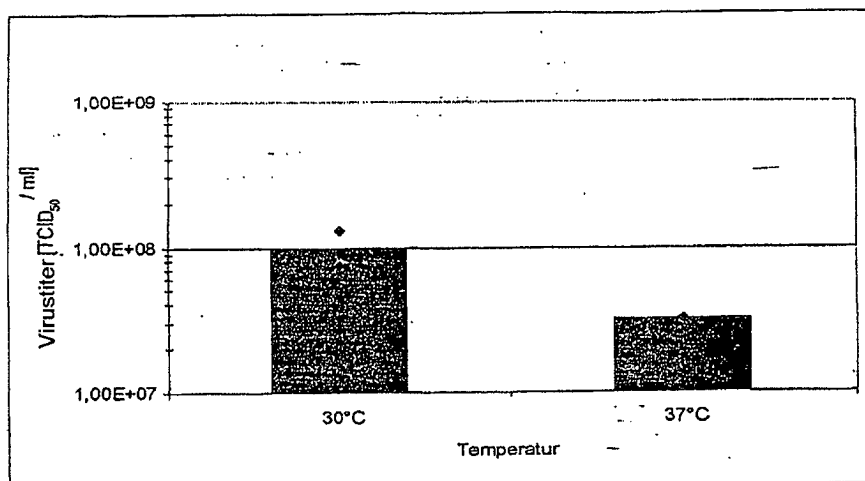


Fig. 2

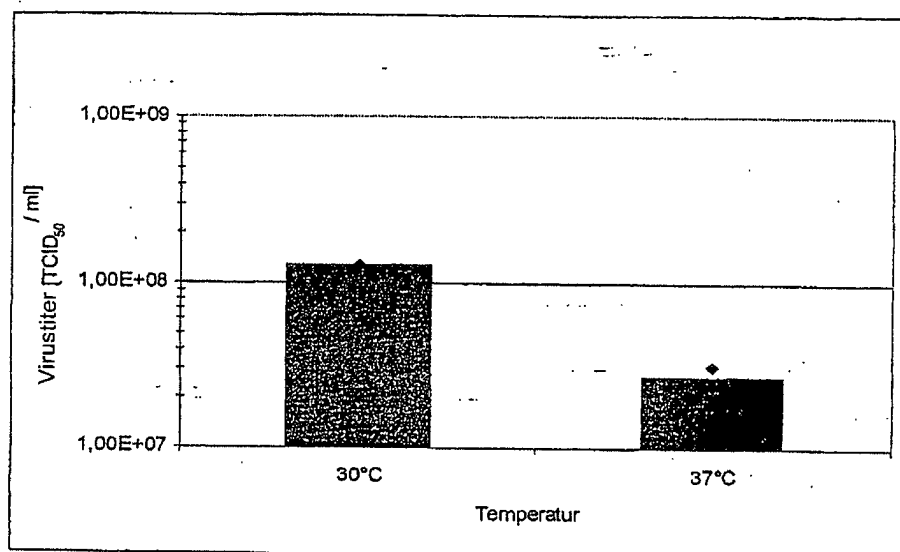


Fig. 3

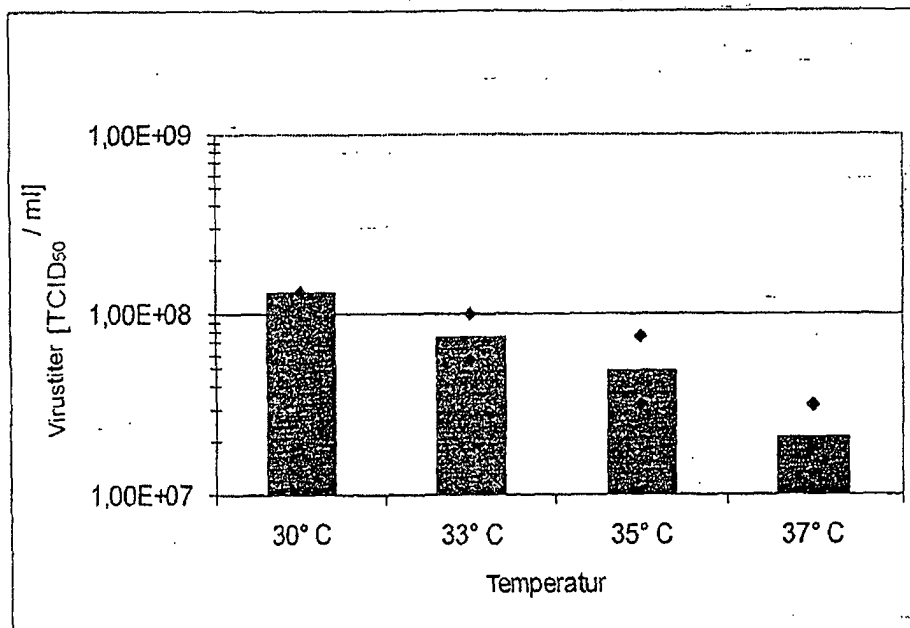


Fig. 4

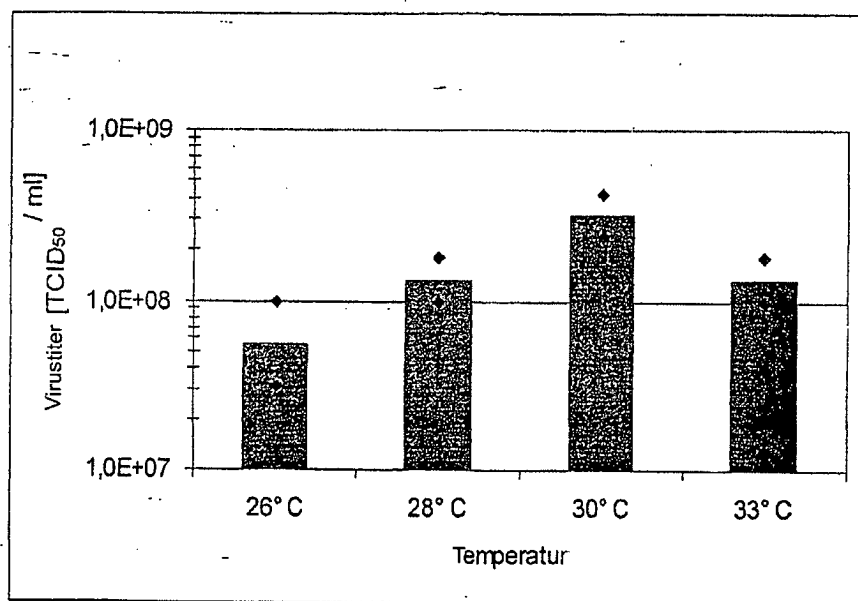


Fig. 5

