



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 34 360 T2 2005.12.29

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 846 160 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 34 360.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/13745

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 929 066.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/008292

(86) PCT-Anmeldetag: 22.08.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 06.03.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.06.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 16.02.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29.12.2005

(51) Int Cl.⁷: C12N 1/04
C07K 14/555

(30) Unionspriorität:

2621 P 22.08.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:

LAU, S., Allan, San Francisco, US

(74) Vertreter:

WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: **METHODEN ZUR ERHÖHUNG DER PRODUKTION VON VIRALEN IMPSTOFFEN IN ZELLKULTUR
DURCH UNTERDRÜCKUNG VON INTERFERON**

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**EINFÜHRUNG****Technisches Gebiet**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung eines Virus für die Impfstoffproduktion in einer Zellkultur.

Hintergrund

[0002] Eine wirksame Kontrolle einer Influenza-Pandemie hängt von einer frühzeitigen Impfung mit dem inaktivierten, aus neu identifizierten Influenzastämmen gebildeten Virus ab. Allerdings sind für eine wirksamere pandemische Kontrolle Verbesserungen bei der Herstellung und dem Testen des Impfstoffs notwendig. Influenza-Viren sind sehr häufigen Mutationen der Oberflächenantigene ausgesetzt. Demgemäß können Impfstoffhersteller nicht Millionen von Dosen für eine Verwendung bei einer Epidemie lagern. Gegenwärtige Influenzakontrollverfahren erfordern eine konstante internationale Überwachung und Identifikation von allen neu auftauchenden Stämmen zusammen mit der Impfstoffherstellung, die für die neu identifizierten Stämme spezifisch ist. Die gegenwärtige Influenzaimpfstoffherstellung, die die Verwendung von embryonalen Eiern für die Virusinokulation und Inkubation erfordert, ist mühsam und teuer. Sie kann bei der Bereitstellung von geeigneten Qualitätseiern auch aufgrund jahreszeitlicher Schwankungen begrenzt sein. Daher wäre es für die Herstellung von Massendosen eines monovalenten Impfstoffs innerhalb kurzer Zeit vorteilhaft, eine wechselnde, von Eiern unabhängige Herstellungs-technik zu entwickeln. In dieser Hinsicht kann die Herstellung eines Influenza-Impfstoffs auf einer stabilen Zelllinie viele Probleme der Massenproduktion lösen. Allerdings ist die Ausbeute von menschlichen Influenza-Viren auf Gewebekulturen enttäuschenderweise viel niedriger als in angebrüteten Eiern (Tannock u.a., Vaccine, 1985, 3: 333-339). Um diese Einschränkungen zu überwinden und die Qualität der Impfstoffe zu verbessern, wäre es vorteilhaft, Zellkul-turlinien zu entwickeln, die gegenüber den gegenwärtig zur Verfügung stehenden eine erhöhte Vi-rusausbeute vorzusehen.

[0003] Bei der Verwendung von Säugetier-Zelllinien für die Impfstoffherstellung mittels ganzer Virionen besteht ein übliches Problem für die Impfstoffhersteller darin, dass Säugetierzellen intrinsische antivirale Eigenschaften, insbesondere das Interferon(IFN)-System, aufweisen, das die Virusreplikation stört. IFN können auf der Grundlage ihrer primären Sequenz in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Interferone vom Typ I, IFN- α und IFN- β , werden durch eine Superfamilie von intronlosen Genen kodiert, die aus der IFN- α -Genfamilie und einem einzelnen

IFN- β -Gen bestehen. Interferon vom Typ II oder IFN- γ besteht nur aus einem einzelnen Typ und be-schränkt sich auf Lymphocyten (T-Zellen und natürliche Killerzellen). Interferone vom Typ I vermitteln ver-schiedene biologische Vorgänge, einschließlich die Induktion von antiviralen Aktivitäten, die Regulation des Zellwachstums und die Differenzierung sowie die Modulation von Immunfunktionen (Sen, G. C. & Len-gyel, P., (1992), J. Biol. Chem. 267, 5017-5020, Pest-ka, S. & Langer, J. A., (1987), Ann. Rev. Biochem. 56, 727-777). Die induzierte Expression von IFN des Typs I, die die IFN- α - und IFN- β -Genfamilie umfas-sen, wird typischerweise nach einer viralen Infektion festgestellt. In vielen Studien wurden Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an der Regulation der Expression von IFN des Typs I be-teiligt sind (Du, W., Thanos, D. & Maniatis, T., (1993), Cell 74, 887-898; Matsuyama, T., Kimura, T., Kitaga-wa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kun-dig, T. M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A., Potter, J., Furlonger, C. L., Narendran, A., Suzuki, H., Ohashi, P. S., Paige, C. J., Taniguchi, T. & Mak, T. W., (1993), Cell 75, 83-97; Tanaka, N. & Taniguchi, T., (1992), Adv. Immunol. 52, 263-81). Allerdings bleibt unklar, was die besonderen biochemischen Hinweise sind, die virale Infektionen der Zelle und die signalisierenden, damit verbundenen Mechanismen kenn-zeichnen (für einen neueren Überblick des Interfe-ronsystems siehe Jaramillo u.a. Cancer Investigati-on, 1995, 13: 327-337).

[0004] IFN gehören zu einer Klasse von negativen Wachstumsfaktoren mit der Fähigkeit, das Wachstum einer großen Zahl von Zellen sowohl mit normalen als auch transformierten Phänotypen zu hemmen. Wie gezeigt wurde, ist eine IFN-Therapie bei der Behandlung von menschlichen bösartigen Tumoren, wie bei-spielsweise dem Kaposi-Sarkom, der chronischen myelogenen Leukämie, dem Non-Hodgkin-Lymphom und der Haarzellenleukämie, sowie bei der Behandlung von infektiösen Erkrankungen, wie beispielswei-se dem Papillomavirus (Genitalwarzen) und der Hepatitis B und C (von Guterman, Proc. Natl Acad Sci. 91: 1198-1205, 1994 besprochen) hilfreich. Kürzlich wurde gentechnisch verändertes, mit Bakterien er-zeugtes IFN- β zur Behandlung von Multipler Sklero-se zugelassen, einer relativ häufigen neurologischen Erkrankung, die allein in den USA mindestens 250.000 Patienten betrifft.

[0005] IFN zeigen ihre biologischen Aktivitäten durch Binden an ihre verwandten Rezeptoren und anschließende Signalweitergabe, was zur Induktion von mit IFN stimulierten Genen, ISG, führt. Während eine Zahl von ISG identifiziert wurde, sind nur einige von ihnen beschrieben und ihre biologischen Aktivitäten untersucht worden. Die am besten untersuchten Beispiele für ISG umfassen eine von doppelsträngi-ger RNA (dsRNA) abhängigen Kinase (PKR, früher als p68 Kinase bekannt), 2'-5'-verknüpfte Oligoade-

nylat(2-5A)-Synthetase und Mx Proteine (Taylor JL, Grossberg SE, Virus Research, 1990, 15: 1–26; Williams BRG, Eur. J. Biochem. 1991 200: 1–11). Menschliches Mx-A Protein ist ein 76 kD-Protein, das die Vermehrung von Influenza-Viren und vesikulären Stomatitis-Viren (Pavlovic u.a. (1990), J. Virol. 64, 3370–3375) hemmt.

[0006] 2'-5'-Oligoadenylylat-Synthetase (2-5A-Synthetase) verwendet ATP, um kurze Oligomere von bis zu 12 Adenylatresten zu synthetisieren, die über 2'-5'-Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Die sich ergebenden Oligoadenylylatmoleküle aktivieren allosterisch eine latente Ribonuklease, RNase L, die virale und zelluläre RNA abbaut. Der 2-5A-Synthetaseweg scheint für die reduzierte Synthese von viralen Proteinen in zellfreien Proteinsynthetisierungssystemen, die aus mit IFN behandelten Zellen isoliert wurden, und vermutlich für eine Resistenz gegen eine virale Infektion *in vivo*, zumindest für einige Virusklassen, wichtig zu sein.

[0007] PKR (Abkürzung für Proteinkinase-RNA-abhängig) ist das einzige identifizierte dsRNA-bindende Protein, das bekanntermaßen eine Kinaseaktivität aufweist. PKR ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren enzymatische Aktivierung eine dsRNA-Bindung und konsequente Autophosphorylierung erfordert (Galabru, J. & Hovanessian, A. (1987), J. Biol. Chem. 262, 15538–15544; Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S., Kerr, I. M., Williams, B. R. G. & Hovanessian, A. G. (1990), Cell 62, 379–390). Es ist auf PKR in der Literatur auch als dsRNA-aktivierte Proteinkinase, P1/e1F2-Kinase, DAI oder dsI für dsRNA-aktivierten Inhibitor und p68 (menschlich) oder p65 (Mäuse-)Kinase Bezug genommen worden. Analoge Enzyme sind in Kaninchenretikulozyten, verschiedenen Mäusegeweben und menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen beschrieben worden (Farrel u.a. (1977), Cell 11, 187–200; Levin u.a. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75, 1121–1125; Hovanessian (1980), Biochimie 62, 775–778; Krust u.a. (1982), Virology 120, 240–246; Buffet-Janvresse u.a. (1986), J. Interferon Res. 6, 85–96). Das am besten beschriebene In-vivo-Substrat von PKR ist die alpha-Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors-2 (eIF-2a), der, sobald er einmal phosphoryliert wurde, letztlich zur Inhibition der zellulären und viralen Proteinsynthese führt (Hershey, J. W. B. (1991), Ann. Rev. Biochem. 60, 717–755). PCK kann den Initiationsfaktor eIF-2a *in vitro* phosphorylieren, wenn er durch doppelsträngige RNA aktiviert wurde (Chong u.a. (1992), EMBO J. 11, 1553–1562). Es ist nahe gelegt worden, dass diese besondere Funktion von PKR einer der Mechanismen ist, die für die Vermittlung der antiviralen und antiproliferativen Aktivitäten von IFN- α und IFN- β verantwortlich ist. Eine zusätzliche biologische Funktion für PKR ist seine vermeintliche Rolle als Signalamplifier. Kumar u.a. haben gezeigt, dass PKR IxB α

phosphorylieren kann, was zur Freisetzung und Aktivierung des nukleären Faktors xB (NF-xB) führt (Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J. & Williams, B. R. G. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91, 6288–6292). Angesichts der gut beschriebenen NF-xB-Stelle im IFN- β -Promotor kann dies einen Mechanismus darstellen, durch den PKR die dsRNA-Aktivierung der IFN- β -Transkription vermittelt (Visvanathan, K. V. & Goodbourne, S. (1989), EMBO J. 8, 1129–1138).

[0008] Die katalytische Kinase-Subdomäne von PKR (d. h. von (menschlicher) p68-Kinase und (Maus)-p65-Kinase) hat eine starke Sequenzidentität (38%) mit der Hefe-GCN2-Kinase (Chou u.a. (1992), EMBO J. 11, 1553–1562; Fen u.a. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89, 5447–5451). Die rekombinante p68-Kinase, die in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert ist, zeigt einen das Wachstum unterdrückenden Phänotyp. Dies wird der Aktivierung der p68-Kinase und der nachfolgenden Phosphorylierung des Hefeäquivalents von Säuretier-eIF2a zugeschrieben (Chong u.a.; Cigan u.a. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2784–2788).

[0009] Der vorliegende Erfinder hat überraschenderweise entdeckt, dass das Manipulieren der Expression von bestimmten ISG nützliche Verwendungen aufweisen kann. Er hat festgestellt, dass die Unterdrückung der Expression des PKR-Proteins oder des 2-5A-Synthetaseproteins oder von beidem zu einer im Wesentlichen höheren viralen Ausbeute von mit Viren infizierten Zellen führt, was für die Erhöhung der Produktion von Impfstoffen in Tierzellkulturen nützlich ist.

Wichtige Literatur

[0010] Ein üblicher Ansatz, um die biologische Rolle von PKR zu untersuchen, beinhaltet die Erzeugung von Mutanten, die einen Mangel an Kinaseaktivitäten aufweisen. Da das PKR eine regulatorische Stelle für die dsRNA-Bindung und eine katalytische Stelle für die Kinaseaktivität besitzt, haben Forscher eine Blockdeletion oder ortsgerichtete Mutagenese verwendet, um an der regulatorischen oder katalytischen Stelle Mutanten zu bilden. Eine dominante, negative PKR-Mutante, [Arg²⁹⁶]PKR, die eine einzelne Aminosäuresubstitution von Arginin für das unveränderliche Lysin in der katalytischen Domäne II in der Position 296 enthält, ist beschrieben worden (Visvanathan, K. V. & Goodbourne, S., (1989), EMBO J. 8, 1129–1138; D'Addario, M., Roulston, A., Wainberg, M. A. & Hiscott, J. (1990), J. Virol. 64, 6080–6089). Dieses Mutantenprotein [Arg²⁹⁶]PKR kann spezifisch die Aktivität der endogenen Wildtyp-PKR *in vivo* unterdrücken. Zusätzliche Mutanten sind durch Ändern der dsRNA-Bindungsmotive gebildet worden. Zum Beispiel haben Feng u.a. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89: 5447–5451) die dsRNA-Bindungsfä-

higkeit von PKR durch Deletionsanalyse abgeschafft, um Mutanten mit Deletionen zwischen den Aminosäureresten 39–50 oder 58–69 zu erhalten. In ähnlicher Weise haben andere Forscher Aminosäurereste im N-terminalen Bereich mutiert, um die dsRNA-Bindungsfähigkeit zu unterdrücken, was zu einem Verlust an enzymatischen PKR-Aktivitäten führt (Green SR, Mathews MB, Genes & Development 1992, 6: 2478–2490; McCormack, SJ, Ortega LG, Doohan JP, Samuels CE, Virology 1994, 198: 92–99). In einem neueren Artikel wurden weiter zwei Aminosäurereste identifiziert, die für eine dsRNA-Bindung absolut notwendig sind, nämlich Glycin 57 und Lysin 60 (McMillan NAJ, Carpick BW, Hollis B, Toone WM, Zamanian-Daryoush und Williams BRG, J. Biol. Chem. 1995, 270: 2601–2606). Es wurde gezeigt, dass Mutanten in diesen Positionen nicht in der Lage sind, dsRNA in vitro zu binden und keine antiproliferative Wirkung in vivo besaßen, wenn sie in Maus-Makrophagenzellen exprimiert wurden.

[0011] Die physiologische Wichtigkeit des Verlusts der PKR-Aktivität in vivo ist bei Tieren untersucht worden. Die katalytisch inaktiven PKR-Mutanten (einschließlich [Arg²⁹⁶]PKR) bewirkten, wenn sie in NIH 3T3 (Mausfibroblast) Zellen transfiziert wurden, eine Unterdrückung der PKR-Aktivität in den Transfektanten. Bei Verabreichung an Nacktmäuse bewirkten diese transfizierten Zellen eine Tumorbildung, was eine Tumorsuppressoraktivität für PKR nahe legt (Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G. & Sonenberg, N. (1992) Science 257, 1685–1689; Meurs, E. F., Galabru, J., Barber, G. N., Katze, M. G. & Hovanessian, A. G. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90, 232–236). Meurs u.a. (J. Virol. 1992, 66: 5805) erzeugten stabile Transfektanten von NIH 3T3 Zellen entweder mit einem Wildtyp (wt) PKR-Gen oder einer dominanten negativen Mutante unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und zeigten, dass nur Transfektanten, die den wt-Klon erhielten, teilweise gegenüber einer Infektion mit dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) resistent waren. Lee u.a. (J. Virol. 1993, 193: 1037) bildeten einen rekombinanten Vaccinia-Virusvektor, der das PKR-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors hielt, und zeigten, dass HeLa-Zellen, die mit dem rekombinanten Virus infiziert und induziert waren, zu einer Inhibition des Vaccinia-Virus-Proteins und einem Gesamtabfall der Virusausbeute führten. Henry u.a. (J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents, 1994, 8: 15) zeigte, dass reovirale mRNA, die eine PKR-Aktivatorsequenz enthielten, im Vergleich zu anderen reoviralen mRNA schlecht exprimiert sind, aber dass das Hinzufügen von 2-Aminopurin, einem PKR-Inhibitor, oder eine Transfektion mit einer dominanten negativen PKR-Mutante die Expression von die Aktivatorsequenz enthaltender mRNA speziell erhöhte. Maran u.a. (Science 1994, 265: 789) zeigten, dass HeLa-Zellen, die für PKR mRNA durch Behandeln mit PKR-Antisenseoligos, welche mit 2'-5'-oligoA ver-

knüpften, selektiv deletiert wurden, nicht auf die Aktivierung von nukleärem Faktor-xB durch die RNA poly(I):poly(C) ansprachen.

[0012] Es sind mehrere Strategien in der Bemühung verwendet worden, die Ausbeute des von der Zellkultur erhaltenen Virus für die Impfstoffproduktion zu verbessern. Unterschiedliche Zelltypen sind getestet worden, um die beste Zelllinie für ein optimales Wachstum von speziellen Viren zu erhalten. Die diploiden menschlichen embryonalen Lungenzelllinien, MRC-5 und WI-38, sind speziell für die Impfstoffherstellung entwickelt worden (siehe Pearson. Devel. Biol. Standard, 1992 76: 13–17; MacDonald, C., Critical Reviews Biotech., 1990, 10: 155–178; Wood u.a. Biologicals 1990, 18: 143–146). Andere Versuche, die Impfstoffherstellung aus der Zellkultur zu verbessern, umfassen die Verwendung eines Serumersatzfaktors mit niedrigem Protein (Candal u.a., Biologicals, 1991, 19: 213–218) und die Behandlung der Zellkultur mit proteolytischen Enzymen (US-Patent Nr. RE 33,164).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines viralen Impfstoffs für ein Tier-Virus zur Verfügung, umfassend:

- (a) Infizieren einer Zelle mit einem Donor-Virus, wobei die Zelle eine angezielte Deletion in einem Doppelstrang RNA abhängigen Protein-Kinase (PKR) Gen, einem 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (2-5A Synthetase) Gen oder einem MxA Gen aufweist, wobei die Deletion in der Zelle einen Mangel an Aktivität des Genprodukts des PKR-Gens, des 2-5A Synthetase Gens oder des MxA Gens erzeugt;
- (b) Züchten der infizierten Zelle unter Bedingungen, die geeignet sind, ein effizientes Genwachstum zu ergeben, und
- (c) Ernten des gebildeten Virus.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] **Fig. 1.** PKR-Aktivität und Proteinniveaus in von U937 stammenden stabilen Transfektanten-Zelllinien. (A) Funktionale PKR-Aktivität wurde unter Verwendung eines Poly(I):Poly(C)-Celluloseassays für die PKR-Autophosphorylierung bestimmt. Zellextrakte wurden aus den unterschiedlichen U937 Transfektanten-Zelllinien nach Inkubation mit (+) oder ohne (–) rekombinantes menschliches IFN- α 2 (200 u/ml), wie angegeben, hergestellt, während L929 Zellen mit Maus-IFN- α/β in ähnlicher Weise behandelt wurden. Spur 1, HeLa; Spuren 2 und 3, U937-neo; Spur 4: U937-AS1; Spur 5: U937-AS3; Spur 6: U937-M13; Spur 7: U937-M22; Spur 8: L929. Die Positionen der menschlichen (68 kDa) und Maus (65 kDa) PKR-Proteine und die molekularen Größenstandards (80 und 50 kDa) werden angegeben. (B) Zellextrakte wurden wie oben nach Induktion mit IFN- α oder - γ hergestellt,

und PKR-Proteinniveaus wurden durch Western-Blot-Analyse bestimmt.

[0015] **Fig. 2.** Die Kinetik der EMCV-Replikation wird in Zellen mit einem Mangel an PKR erhöht. Die unterschiedlichen U937-Zelllinien wurden mit EMCV bei 0,1 (A) oder 0,001 (B) TCID₅₀/Zelle angeregt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet und virale Ausbeuten wurden im Hinblick auf TCID₅₀ gemessen.

BESCHREIBUNG VON SPEZIELLEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0016] Der vorliegende Erfinder hat überraschend festgestellt, dass Tierzellen, die einen Mangel an Interferon-vermittelten antiviralen Reaktionen aufweisen, insbesondere Zellen, die einen Mangel an dsRNA-abhängiger Kinase, 2'-5'-Oligoadenylylsynthetase oder beidem aufweisen, eine höhere Virus-Ausbeute erzielen, wenn sie mit einem Tier-Virus infiziert sind, als Zellen mit normalen Niveaus an diesen Proteinen. Eine Steigerung der Virus-Ausbeute um so viel wie 10³ oder 10⁴ oder mehr kann unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung erhalten werden. Die Fähigkeit, hohe Ausbeuten an Virus in einer Zellkultur mit einem Mangel an PKR oder 2-5A-Synthetase zu erhalten, macht es möglich, große Virusmengen innerhalb kurzer Zeit zu erzeugen. Dies ist besonders wichtig für die Herstellung von viralen Impfstoffen, insbesondere für RNA-Virus, einschließlich Influenza-Virus.

[0017] Das geerntete Virus, das durch das Verfahren der Erfindung erzeugt wird, kann zusätzlich für die Impfstoff-Verwendung durch Reinigung hergestellt werden, zum Beispiel durch Sterilfiltration, Ultrafiltration und/oder Konzentration durch Säulenchromatographie oder andere Verfahren. Das geerntete Virus kann wahlweise behandelt werden, um für die Herstellung von abgetöteten viralen Impfstoffen das Virus zu inaktivieren.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Zelle eine angezielte Deletion im PKR Gen auf. Unter PKR versteht man menschliche p68-Kinase oder jedes Analog oder Homolog der menschlichen p68-Kinase. Unter Analog der menschlichen p68-Kinase versteht man jede doppelsträngige RNA-abhängige Kinase, die die ds-RNA-Aktivierung der Interferontranskription vermittelt. Typischerweise sind solche ds-RNA-abhängigen Kinasen p68-Kinase-Äquivalente, die in anderen Arten, wie beispielsweise Kaninchen oder Mäusen, und in unterschiedlichen Geweben unter den verschiedenen Arten vorliegen. Zum Beispiel ist eine Maus-p65-Kinase ein Analog der menschlichen p68-Kinase. Ein anderes Beispiel für ein Analog der p68-Kinase ist in menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen beschrieben worden (Farrel u.a.). Unter Homolog ver-

steht man ein Protein, das homolog zu mindestens einer Domäne der menschlichen p68-Kinase, wie beispielsweise der dsRNA-Bindungsdomäne oder der Kinasedomäne, ist. Ein solches funktionales Kinasehomolog ist Hefe-GCN2-Kinase.

[0019] Verfahren für die angezielte Gendeletion („Gen-Knock-out“) werden zum Beispiel in Camper SA u.a., *Biology of Reproduction*, 1995, 52: 246–257 und Aguzzi A., Brandner S., Sure, U. u.a., *Brain Pathology*, 1994, 4: 3–20 beschrieben.

[0020] Die PKR-Aktivität kann durch eine Anzahl von Verfahren bestimmt werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind. Die Aktivität von PKR kann direkt zum Beispiel durch einen Autophosphorylierungssassay bestimmt werden, wie beispielsweise dem in Maran u.a. (*Science*, 265: 789–792, 1994) oder Silverman u.a. (Silverman, R. H. und Krause, D. (1986) in *Interferons: A practical approach*, Morris, A. G. und Clemens, M. J. Hrsg., Seite 71–74 IRL Press, Oxford-Washington, DC) beschriebenen. Typischerweise wird ein Autophosphorylierungssassay für die PKR-Aktivität wie folgt durchgeführt: Extrakte aus Zellen, die auf PKR-Aktivität untersucht werden sollen und etwa 100 µg Protein enthalten, werden mit 20 µl Poly(I):Poly(c)-Cellulosekügelchen 60 min auf Eis inkubiert. Die Kinase wird immobilisiert und auf den Kügelchen aktiviert. Nach dem Waschen der Polynukleotid-Cellulose-gebundenen Kinasefraktionen wird eine Autophosphorylierungsreaktion bei 30°C 30 min in einer Assaylösung durchgeführt. Die Assaylösung enthält 1 µCi [γ ³²P]ATP, 1,5 mM Magnesiumacetat, 10 µM ATP, pH 7,5, 0,5% NP 40 und 100 µg/ml Leupeptin. Die Proben werden bei 90°C 3 min in Gelprobenpuffer, enthaltend Natriumdodecylsulfat (SDS), erwärmt und die Proteine werden mittels 10% SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert. Die Gele werden getrocknet und Autoradiographen werden unter Verwendung von XAR-5 Röntgenfilm (Kodak) hergestellt.

[0021] Die PKR-Aktivität kann indirekt durch Analyseverfahren bestimmt werden, die das Vorhandensein von mRNA oder cDNA (z.B. Northern oder Southern Blots) oder das Vorhandensein des Proteins (z.B. Western Blot) ermitteln.

[0022] In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines viralen Impfstoffs in einer Zelle zur Verfügung, das eine angezielte Deletion in dem 2'-5'-Oligoadenylylatgen aufweist. Die 2-5A-Synthetaseaktivität kann durch Verfahren bestimmt werden, die ähnlich den zur Bestimmung der PKR-Aktivität verwendeten sind, d.h. Western Blots unter Verwendung von 2-5A-Synthetasespezifischen Antikörpern, Northern Blots unter Verwendung von Oligonukleotid- oder cDNA-Sonden, die für 2-5A-Synthetase- oder Enzymaktivitätsassays spezifisch sind (siehe Read u.a. *J. Infect.*

Dis., 1985, 152: 466–472; Hassel und Ts'o J. Virol. Methods, 1994, 50: 323–334). Typischerweise wird eine 2-5A-Synthetaseaktivität wie folgt bestimmt. Zu untersuchende Zellen werden mit IFN- α_2 (100 U/1 ml in RPMI plus 10% fötalem Rinderserum) behandelt. In Kürze werden die Zellkulturen 18 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und die Zellpellets werden mit Zelllysepuffer 10 min bei 4°C behandelt. Aliquote des Zellextrakts werden mit Poly(I):Poly(C)-Agarosekügelchen 30 min bei 30°C inkubiert, um die Bindung sowie die Aktivierung des 2-5A-Synthetaseenzyms zu ermöglichen. Die Kügelchen werden gewaschen und dann in einer Assaylösung mit 3 mM ATP, 4 μ Ci 3 H-ATP pro Assayprobe und 20 mM Hepespuffer, pH 7,5 20 h bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben bei 90°C erwärmt, um das Enzym zu inaktivieren und anschließend mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) behandelt. Das synthetisierte 2-5-OligoA ist gegenüber BAP resistent. Die Menge an 2-5-OligoA wird durch Platzieren einer Probe auf Filterpapier, Waschen und Zählen der 3 H-Radioaktivität mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Die Menge an erzeugtem OligoA-Produkt wird mit der Enzymaktivität durch herkömmliche Verfahren korreliert. Alternativ kann die 2-5A-Synthetase durch ein Radioimmun- und Radiobindungsverfahren untersucht werden (Knight M, u.a. Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2-5A and related oligonucleotides from intact cells, Nature, 1980 288: 189–192).

[0023] Es ist offensichtlich, dass sowohl Zellkulturen mit einem Mangel an PKR-Aktivität als auch 2-5A-Synthetaseaktivität durch eine Kombination der oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden können. Die Zellkulturen mit doppeltem Mangel können entweder sequentiell (d.h. durch erstes Auswählen der Kulturen mit einem Mangel in einer Aktivität und dann Verwenden dieser Zellkultur als Ausgangsmaterial zur Herstellung der zweiten Kultur mit Mangel) oder gleichzeitig (Auswahl beider Mängel auf einmal) hergestellt werden.

[0024] In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines viralen Impfstoffs in einer Zelle zur Verfügung, die eine angezielte Deletion im menschlichen MxA-Gen aufweist. Die MxA-Aktivität kann durch Verfahren ähnlich denen zum Bestimmen der restlichen PKR-Aktivität bestimmt werden, d.h. Western Blots mit spezifischen MxA-Antikörpern, Northern Blots mit Oligonukleotid- oder cDNA-Sonden, die für MxA- oder Enzymaktivitätsassays spezifisch sind (Garber u.a. (1991), Virology 180, 754–762; Zürcher u.a. (1992), Journal of Virology 66, 5059–5066). Typischerweise wird die MxA-Aktivität wie in Zürcher u.a. beschrieben bestimmt.

[0025] In der vorliegenden Erfindung können die Zellen in Gegenwart eines Inhibitors eines Interferon-

rezeptors gezüchtet werden. Alternativ können die Zellen manipuliert werden, um bei Fehlen eines normalen Interferonrezeptors einen Mutanteninterferonrezeptor zu exprimieren, der nicht auf Interferon anspricht.

[0026] In der vorliegenden Erfindung kann die Zellkultur einen Mangel an Interferonspezifischen Transkriptionsregulatoren aufweisen. Ein solcher Interferon-spezifischer Transkriptionsregulator ist IRF1. Zellen, die einen stabilen Mangel an Interferonspezifischen Transkriptionsregulatoren aufweisen, können durch jedes aus einer Anzahl Verfahren erhalten werden, die im Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise zufällige oder ortsgerichtete Mutagenese, angezielte Gendeletion oder Transfektion mit Antisensevektoren. Zellen mit einem transienten Mangel können durch Züchten von Zellen in Gegenwart von Antisenseoligonukleotiden oder bestimmten Inhibitoren der Interferontranskription erhalten werden.

[0027] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann mit einer Vielzahl von Tierzellkulturen durchgeführt werden, einschließlich primären Zellkulturen, diploiden Zellkulturen und kontinuierlichen Zellkulturen. Besonders nützlich sind Zellkulturen, die gegenwärtig für die Herstellung von Impfstoff verwendet werden, ganz besonders die Zellkulturen, die für die Impfstoffherstellung durch das USFDA und/oder die WHO zugelassen wurden, zum Beispiel MRC-5, eine menschliche diploide Zelllinie aus fötalem Lungengewebe (Nature Lond., 1970, 227: 168–170) und WI-38, eine menschliche diploide Zelllinie, die aus embryonalem Lungengewebe stammt (Am. J. Hyg., 1962, 75: 240; First International Conference on Vaccines Against Viral and Rickettsial Diseases of Man, Pan American Health Organization, Veröffentlichungsnummer 147: 581, Mai 1981). Auch nützlich sind Chang Leberzellen (Chang, RS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 87: 440), 0937 menschliche Promonocytenzellen (Sundstrom u.a., Int. J. Cancer, 1976, 17: 565–577), Vero Zellen, MRC-9-Zellen, IMR-90 Zellen, IMR-91 Zellen und Lederle 130 Zellen (Biologicals 18: 143–146, 1991). U937 Zellen sind besonders nützlich für Viren, die CD4 exprimierende Immunzellen infizieren, zum Beispiel HIV. Für einen allgemeinen Überblick über Zellkulturen, die bei der Herstellung von Impfstoffen verwendet werden, siehe Grachev, V. P. in Viral Vaccines, Mizrahi, A., Hrsg., Seite 37–67, 1990, Wiley-Liss. Die besondere, ausgewählte Zellkultur hängt von dem Virus ab, der erzeugt werden soll; im Allgemeinen wird die Zellkultur von der Art abgeleitet, die der natürliche Wirt für den Virus ist, obwohl dies für die Praxis der vorliegenden Erfindung nicht wichtig ist (zum Beispiel kann ein menschlicher Virus auf einer Kaninchen-Nierenzelllinie (MDCK Zellen) oder einer grünen Affen-Nierenzelllinie (Vero Zellen; Swanson u.a., J. Biol. Stand., 1988, 16: 311) gezüchtet werden). Für Influenza-Virus- und Hepatitis-A-Virus-Impfstoffe sind bevorzugte Wirtszellen

Derivate von MRC-5. Für die HIV-Impfstoffherstellung sind bevorzugte Wirtszellen Derivate von U937-, H9-, CEM- oder CD4-exprimierenden HUT78 Zellen. Zelllinien, die für die Herstellung von Impfstoffen verwendet werden, sind bekannt und ohne weiteres von kommerziellen Lieferern, zum Beispiel der American Type Culture Collection, verfügbar.

[0028] Die Infektion der durch Interferon vermittelten antiviralen Zellen mit mangelnder Reaktion und Donor-Virus gemäß der vorliegenden Erfindung wird mit herkömmlichen Verfahren durchgeführt (siehe zum Beispiel Peetermans, J., Vaccine, 1992, 10 Erg. 1: S99–101; Shevitz u.a. in *Viral Vaccines*, Mizrahi, A. Hrsg., Seite 1–35, 1990, Wiley-Liss). Typischerweise wird das Virus der Zellkultur bei 0,001 bis 0,5 TCID₅₀ pro Zelle, vorzugsweise bei 0,01 bis 0,10 TCID₅₀ pro Zelle, zugeführt, aber sie variiert, wie für den besonderen Virus und den verwendeten Zellwirt geeignet. Wie dem Durchschnittsfachmann ohne weiteres offensichtlich ist, braucht für eine wirksame Virusproduktion nicht jede Zelle der Zellkultur am Anfang infiziert zu werden. Die infizierten Zellen werden unter Bedingungen gezüchtet, die für die bestimmten Zellen geeignet sind, und die Virusproduktion wird zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion überwacht. Die Virusproduktion kann mit einem aus einer Anzahl von Standardverfahren, einschließlich Plaque-bildenden Einheitsassays, TCID₅₀ Assays oder Hämagglutinierungsinhibitionssassays (Robertson u.a., J. Gen. Virol., 1991, 72: 2671–2677), überwacht werden. Die infizierten Zellen werden unter Bedingungen gezüchtet, die ausreichen, um ein effizientes Viruswachstum zu erreichen. Die Zellen können gezüchtet werden, bis eine maximale Virusproduktion erzielt wird, wie durch ein Einpendeln der Virusausbeute angegeben. Der Virus wird mittels Standardverfahren geerntet und im Wesentlichen von anderen Zellkomponenten gereinigt (siehe zum Beispiel, Peetermans, 1992). Der geerntete Virus kann als lebender viraler Impfstoff, der entweder vollständig virulent oder abgeschwächt ist, verwendet werden oder kann vor seiner Verwendung durch Verfahren inaktiviert werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, zum Beispiel durch Behandeln mit Formaldehyd (Peetermans, J., Vaccine, 1992, 10 Erg., 1: S99–101; US-Patent Nr. RE 33 164).

[0029] Der Impfstoff kann in trockener Form verfügbar sein, um mit einem Verdünnungsmittel gemischt zu werden, oder er kann in flüssiger Form vorliegen, vorzugsweise in flüssiger Lösung, entweder konzentriert oder gebrauchsfertig. Der Impfstoff wird allein oder in Kombination mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Hilfsstoffen, Konservierungsstoffen, Verdünnungsmitteln oder anderen Zusätzen verabreicht, die für eine Erhöhung der Immunogenität oder als Verabreichungs- oder Lagerungshilfe nützlich sind, wie auf dem Fachgebiet bekannt ist. Geeignete Hilfsstoffe umfassen Aluminumhydroxid, Alaun, Alu-

minumphosphat, Freunds oder die im US-Patent Nr. 3 790 665 und 3 919 411 beschriebenen. Andere geeignete Zusätze umfassen Saccharose, Dextrose, Laktose und andere nicht toxische Substanzen. Die Impfstoffe werden auf verschiedenen Wegen, einschließlich intramuskulär, intravenös, subkutan, intratracheal, intranasal oder durch Aerosolspray an Tiere verabreicht, und die Impfstoffe werden für die vorteilhafte Verwendung bei einer Vielzahl von Tieren, einschließlich Mensch, Pferd, Vogel, Katze, Kaninchen und Rind, in Erwägung gezogen.

[0030] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann mit einer Anzahl von Donor-Tierviren durchgeführt werden. Unter Donor-Viren versteht man den besonderen Virusstamm, der zur Herstellung des Impfstoffs *in vivo* repliziert wird. Das besondere verwendete Donor-Tiervirus hängt von dem gewünschten viralen Impfstoff ab. Donor-Viren, die gegenwärtig für die Impfstoffherstellung verwendet werden, sind auf dem Fachgebiet bekannt, und das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann ohne weiteres an jedes neu identifizierte Donor-Virus angepasst werden. Vorzugsweise Donor-Viren umfassen menschliche Influenzaviren, insbesondere Influenza A (H3N2) und Influenza A (h1N1) (siehe USPN 4 552 758; ATCC Nr. VR-2072, VR-2073, VR-897); Influenza A, das in USPN 3 953 592 beschrieben ist; Influenza B (USPN 3 962 423; ATCC Nr. VR-786, VR-791); und Parainfluenza 1 (Sendai Virus) (Cantell u.a., Meth. Enzymol., 78A: 299–301, 1980; ATCC Nr. VR-907). Das Donor-Virus kann mit dem Viruserreger identisch sein oder kann eine natürlich auftretende abgeschwächte Form, eine abgeschwächte Form, die durch Serienpassagierung durch die Zellkultur gebildet wird, oder eine rekombinante oder reassortante Form sein. Jeder virale Stamm kann als Donor-Virus verwendet werden, vorausgesetzt, dass er die erforderliche Antigenität beibehält, um einen Schutz gegen den Viruserreger zu ermöglichen. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist besonders mit abgeschwächten oder schlecht replizierenden Donor-Viren nützlich.

[0031] Einige Impfstoffe, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellt werden können, umfassen menschliche Impfstoffe für Poliovirus, Masern, Mumps, Röteln, Hepatitis A, Influenza, Parainfluenza, japanische Encephalitis, Cytomegalovirus, HIV, Dengue-Fieber-Virus, Tollwut und Varicella-Zoster-Virus sowie viele nicht menschliche Tier-Impfstoffe, wie beispielsweise Impfstoffe für den Katzenleukämievirus, Rinder-Rhinotracheitisvirus (Rote-Nasen-Virus), Kuhpocken-Virus, Kaninchen-Hepatitis-Virus, Kaninchen-Staupe-Virus, Pferde-Rhinovirus, Pferde-Influenazvirus, Pferde-Pneumonie-Virus, Pferde-Infektiöse-Anämie-Virus, Pferde-Enzephalitis-Virus, Schaf-Enzephalitis-Virus, Schaf-Blauzungen-Virus, Tollwutvirus, Schwein-Influenza-Virus und Affen-Immunschwäche-Virus, sind

aber nicht darauf beschränkt. Wie aus dem Vorstehenden ersichtlich ist, ist das Verfahren der vorliegenden Erfindung nicht auf die Impfstoffherstellung für menschliche Viren beschränkt, sondern ist gleichermaßen für die Herstellung von nicht menschlichen Tiervirusimpfstoffen geeignet.

[0032] Spezielle Beispiele der oben beschriebenen Schritte werden in den nachfolgenden Beispielen erläutert. Es ist aber für den Durchschnittsfachmann nachvollziehbar, dass viele Modifikationen möglich sind und dass die Beispiele nur zur Veranschaulichung vorgesehen sind und die Erfindung nicht einschränken, soweit nicht anders angegeben.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung von Plasmiden

[0033] Die cDNA-Inserts entsprechend dem menschlichen Wildtyp-PKR-Gen bzw. dem dominanten negativen $[Arg^{296}]$ -PKR-Mutantengen von den Plasmiden pBS-8,6R bzw. yex6M (Meurs E, Chong K, Galabru J. u.a., Cell, 1990, 62: 379–90; Chong u.a. EMBO, J., 11: 1553–1562, 1992) wurden durch HindIII-Verdau freigesetzt und in pRC-CMV (Invitrogen) subkloniert, wobei ein konstitutives eukaryontisches Expressionsplasmid einen G418-Resistenzmarker enthielt. Die Ausrichtung der Inserts in ausgewählten Klonen wurde durch Restriktionsverdauanalyse bestimmt und durch Sequenzierung bestätigt (Sequenase 2,0, USB). Dieses Verfahren führte zur Isolierung der verwendeten Expressionsplasmide, pPKR-AS (enthaltend die PKR cDNA in einer Antisense-Ausrichtung unter der Kontrolle des CMV-Promotors im Vektor) und p[ARG²⁹⁶]PKR (enthaltend die Arg²⁹⁶PKR cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors im Vektor).

Beispiel 2: Isolierung der stabilen Transfektanten mit einem Mangel an PKR

[0034] Stabile Transfektanten wurden durch Elektroporation von 5×10^6 exponentiell wachsenden U937 Zellen mit jeweils 10 mg Plasmid in serumfreiem RPMI-1640, enthaltend DEAE Dextran (50 mg/ml), mit einer Gene Pulser Vorrichtung (BioRad), erhalten, die auf 500 μ F, 250 V eingestellt war. Bulk-Populationen von stabilen Transfektanten wurden durch Auswahl mit 400 μ g/ml Geneticin (GIBCO-BRL) über 3 Wochen erhalten. Klonale Linien wurden anschließend durch begrenzende Verdünnungsklonierung erhalten. Zelllinien wurden in RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum (vollständige Medien) und Geneticin gezüchtet.

[0035] Fünf repräsentative Zelllinien wurden für eine anfängliche Charakterisierung ausgewählt: „U937-neo“ (auch U9K-C genannt) war die Kontrollzelllinie, die mit dem parentalen Vektor pRC-CMV

transfiziert war; „U937-AS1“ (auch U9K-A1 genannt) und „U937-AS3“ (auch U9K-A3 genannt) waren unabhängige Klone, die mit pPKR-AS transfiziert waren; „U937-M13“ (auch U9K-M13 genannt) und „U937-M22“ (auch U9K-M22 genannt) waren unabhängige Klone, die mit $p[Arg^{296}]PKR$ transfiziert waren.

Beispiel 3: Charakterisierung von Transfektanten mit einem Mangel an PKR

[0036] Die PKR-Kinaseaktivität wurde in einem Autophosphorylierungsassay gemessen, der Poly(I):Poly(C)-Cellulose zum Binden und zur Aktivierung von PKR-Enzymen verwendet. Der PKR-Autophosphorylierungsassay wurde im Wesentlichen wie von Maran u.a. beschrieben mit den folgenden Modifikationen durchgeführt. Zellextrakte (100 μ g Protein pro Assay) wurden mit Poly(I):Poly(C)-Cellulose 1 Stunde lang auf Eis inkubiert, dreimal gewaschen und 30 Minuten bei 30°C in 50 μ l eines Reaktionspuffers (20 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM KCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1,5 mM Magnesiumacetat, 1,5 mM $MnCl_2$) mit 1 μ Ci $[\gamma^{32}P]ATP$ inkubiert. Proteine wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

[0037] Zellextrakte von mit IFN behandelten HeLa und Maus L929 Zellen wurden als positive Kontrollen verwendet, da die PKR-Aktivität in diesen Zellen zuvor dargestellt wurde (Meurs u.a.) ([Fig. 1A](#), Spur 1 und 8). U937-neo Zellen enthielten niedrige basale Niveaus an PKR-Aktivität, die die nachfolgende Behandlung mit IFN- α erhöhte ([Fig. 1A](#), Spur 2 und 3). Die PKR-Aktivität in den parentalen, nicht transfizierten U937 Zellen war ähnlich den U937-neo Zellen. Allerdings wurde die PKR-Aktivität in keiner der vier Zelllinien, die mit pPKR-AS oder $p[Arg^{296}]PKR$ -Plasmiden transfiziert waren, festgestellt. Weiterhin stellte die Behandlung dieser Zellen mit IFN- α nicht die PKR-Aktivität wieder her ([Fig. 1A](#), Spuren 4–7), noch erfolgte dies durch eine Behandlung mit IFN- γ .

Beispiel 4: Western Analyse von Transfektanten mit einem Mangel an PKR

[0038] Um weiter die Inhibierung der PKR-Expression in den mit pPKR-AS transfizierten Zelllinien zu bestätigen, wurde eine Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt, der für menschliches PKR spezifisch war. Zellextrakte (100 μ g) wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran elektrotransferiert. Die Membranen wurden mit anti-PKR-monoklonalem Antikörper (Meurs u.a., Cell, 1990) bei 1:100 in BLOTTO inkubiert (5 nicht fette Trockenmilch, 0,05% Twen-20 in Tris-gepufferter Kochsalzlösung). Eine abschließende Erfassung von PKR wurde durch Erfassen mittels einer Sonde mit einem sekundären Meerrettich Peroxidase-konju-

gierten Ziegen anti-Maus-Antikörper (Santa Cruz Biotech) und mit einem Chemilumineszenzverfahren (Amersham ECL) erleichtert.

[0039] Ein basales Niveau an PKR Protein war in U937-neo Zellen feststellbar (**Fig. 1B**, Spur 1) und erhöhte die nachfolgende Behandlung mit IFN- α oder IFN- γ (**Fig. 1B**, Spur 2 und 3). Im Gegensatz dazu wurde die PKR-Expression signifikant sowohl in U937-AS1 als auch U937-AS3 Zellen verringert (**Fig. 1B**, Spur 4 und 6) und erhöhte nicht die nachfolgende Behandlung mit IFN- α (**Fig. 1B**, Spur 5 und 7). Während das PKR-Protein in U937-M13 und U937-M22 Zellen feststellbar war, war das mutante [Arg²⁹⁶]PKR Protein mittels einer Western Blot Analyse von dem Wildtyp PKR nicht unterscheidbar.

Beispiel 5: Erhöhte EMCV-Replikation bei Zellen mit einem Mangel an PKR

[0040] Da das IFN-System eine wichtige Rolle bei den antiviralen Reaktionen spielt, haben wir untersucht, ob der Verlust der PKR-Funktion die Replikationsrate des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) beeinflusst. Bestände an EMCV (ATCC Nr. VR-1314) wurden durch Passagieren in L929 Zellen hergestellt. Zur Bestimmung der EMCV-Replikation wurden von U937 stammende Transfektanten in kompletten Medien mit oder ohne IFN (rekombinantes menschliches IFN- α 2, Schering; rekombinantes menschliches IFN- γ , Amgen) 18 Stunden lang gezüchtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit EMCV in serumfreien Medien 2 Stunden lang inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und mit Medien, die 1% FCS enthielten, ergänzt. Die Proben wurden zu den erforderlichen Zeitpunkten gesammelt und in drei Frier-Tau-Runden lyisiert. Vierfache serielle Verdünnungen der Proben wurden auf die L929 Monoschichten gegeben und 48 Stunden lang inkubiert und anschließend mit 0,05% Kristallviolett gefärbt, um die cytopathischen Wirkungen und die mittlere Gewebekultur infektiöse Dosis (TCID₅₀) zu bestimmen.

[0041] Bei der U937-neo Kontroll-Zelllinie nach einem Anregen mit EMCV bei 0,1 TCID₅₀/Zelle hatten virale Titer bei etwa 10⁴ TCID₅₀/ml nach 48 Stunden eine Spitze erreicht und stiegen nach 72 Stunden nicht weiter an (**Fig. 2A**). Allerdings war eine EMCV-Replikation in U937-AS1 und U937-M22 Zellen im Wesentlichen höher und erreichte Titer von 10⁴ bis 10⁵ TCID₅₀/ml nach nur 24 Stunden und 10⁸ TCID₅₀/ml bis 48 Stunden, was einen Anstieg von 10³ bis 10⁴ der viralen Ausbeute gegenüber der in den Kontrollzellen erhaltenen darstellt. In getrennten Experimenten mit einem niedrigeren Virus-Impfstoff von 0,001 TCID₅₀/Zelle wurden dramatischere Unterschiede bezüglich der EMCV-Empfindlichkeit zwischen der Kontrolle und den Zellen mit einem Mangel an PKR beobachtet (**Fig. 2B**). Unter diesen Bedin-

gungen war die EMCV-Replikation in U937-neo Zellen minimal und überschritt selbst nach 72 Stunden 10² TCID₅₀/ml nicht, während hohe virale Titer von 10⁸ TCID₅₀/ml nach 48 Stunden sowohl in U937-AS1 als auch U937-M22 Zellen erzielt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass durch eine Unterdrückung der PKR-Aktivität in vivo die Zellen gegenüber einer viralen Replikation sehr tolerant werden und es zeigt sich eine tausendfache Steigerung gegenüber Kontrollzellen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines viralen Impfstoffs für ein Tier-Virus, umfassend
 - (a) Infizieren einer Zelle mit einem Donor-Virus, wobei die Zelle eine angezielte Deletion in einem Doppelstrang RNA abhängigen Protein-Kinase (PKR) Gen, einem 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (2-5A Synthetase) Gen oder einem MxA Gen aufweist, wobei die Deletion in der Zelle einen Mangel an Aktivität des Genproduktes des PKR-Gens, des 2-5A Synthetase Gens oder des MxA Gens erzeugt;
 - (b) Züchten der infizierten Zelle unter Bedingungen, die geeignet sind, ein effizientes Genwachstum zu ergeben, und
 - (c) Ernten des gebildeten Virus.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zelle eine angezielte Deletion sowohl einem PKR Gen als auch einem 2-5A Synthetase Gen aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Zelle eine menschliche Zelle ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Zelle von einer Zelllinie stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus MRC-5, WI-38, Chang Leber, U937, Vero, MRC-9, IMR-90, IMR-91, Lederle 130, MDCK, H9, CEM und CD4 exprimierendes HUT78.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Zelle von MRC-5 oder WI-38 oder Vero Zellen stammt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Zelle von U937 Zellen stammt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Donor-Virus ein abgeschwächtes Virus ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Donor-Virus ein Rekombinations-Virus ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Donor-Virus ein menschliches Virus ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Donor-Virus ein menschliches Influenza-Virus ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Donor-Virus ein nicht-menschliches Virus ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zelle eine angezielte Deletion in einem MxA Gen aufweist und das Donor-Virus Influenza Virus oder vesikuläres Stomatitis-Virus ist.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zelle einen mutierten Interferon Rezeptor enthält und nicht auf Interferon anspricht.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1A

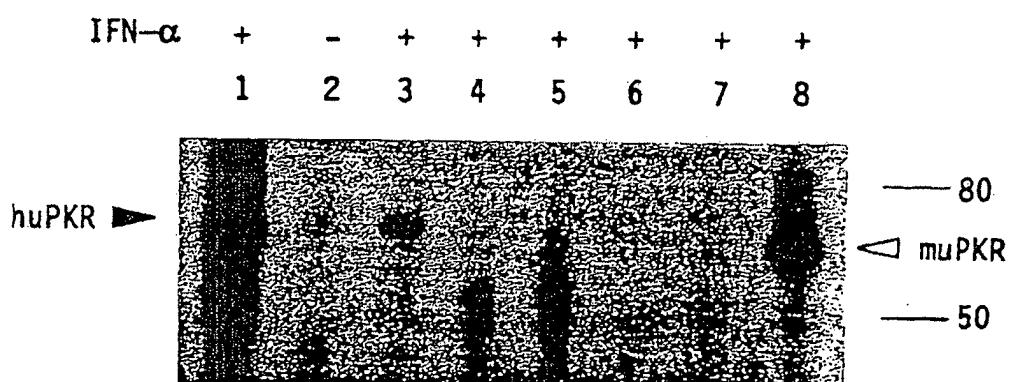


FIG. 1B

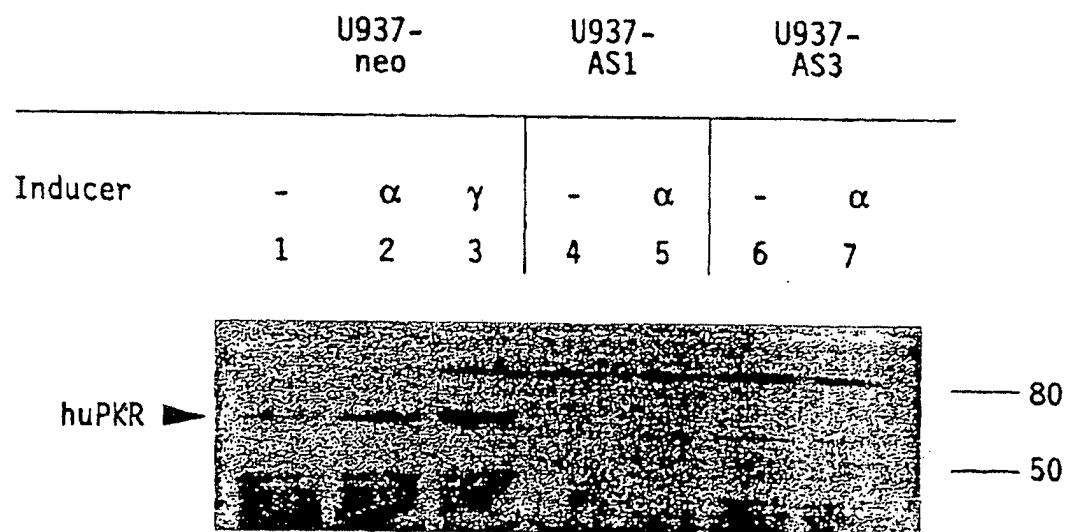


FIG. 2A

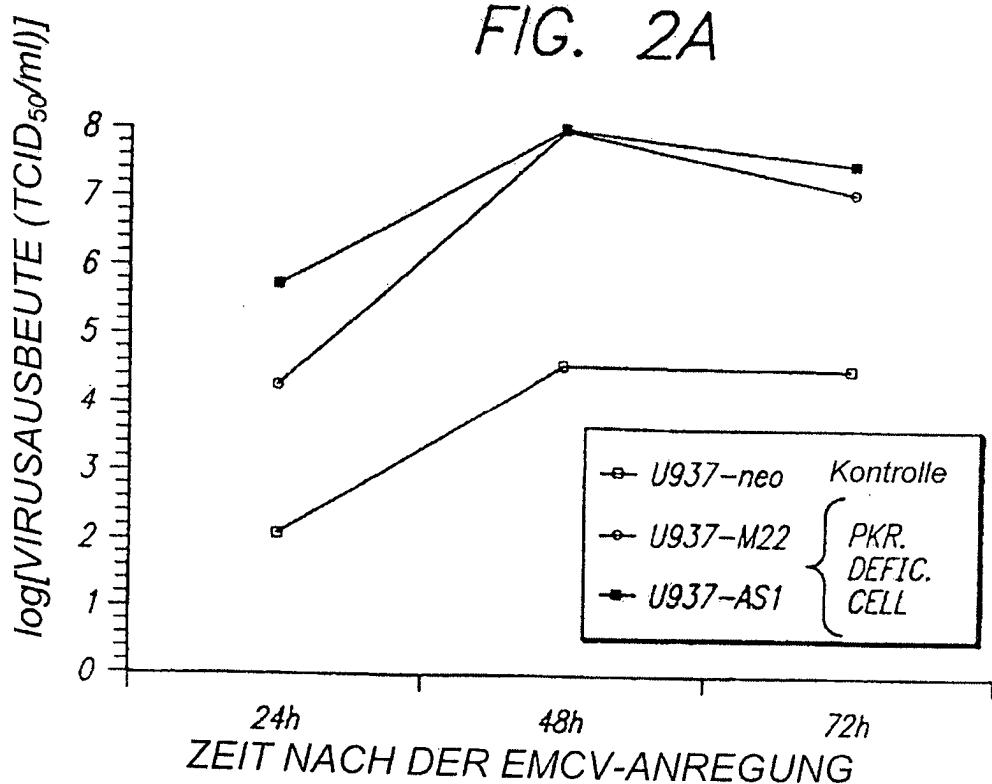


FIG. 2B

