(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2015 207 036 A1** 2016.10.20

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2015 207 036.0**
(22) Anmeldetag: **17.04.2015**
(43) Offenlegungstag: **20.10.2016**

(51) Int Cl.: ***A61K 35/76*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(71) Anmelder:
Lang, Karl Sebastian, Prof. Dr., 45147 Essen, DE

(74) Vertreter:
Patentanwälte Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster & Partner mbB, 70174 Stuttgart, DE

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

(56) Ermittelter Stand der Technik:

WO 2006/ 008 074 A1
WO 2011/ 056 993 A1

CHENG B. J. Y. et al.: Generation of recombinant Arenavirus for vaccine development in FDA approved Vero cells. In: JOVE - Journal of Visualized Experiments. 2013, 78, e50662 S1-9, - doi: doi:10.3791/50662 unter URL: http://www.jove.com/video/50662

KELLY, E.; RUSSEL, S. J.: History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. In: Molecular Therapy. 2007, Vol. 15 No. 4, S.651–659

KOHLER M. et al.: Enhanced tumor susceptibility of immunocompetent mice infected with lympholytic choriomeningitis virus. In: Cancer Immunol. Immunother, 1990, 32, S. 117 – 124.

SOUTHAM, C. M.; MOORE, A. E.: Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to egypt 101 virus. In: Cancer, 1952, Vol.5, S 1025–1034. doi: 10.1002/1097-0142 (195209)5:5

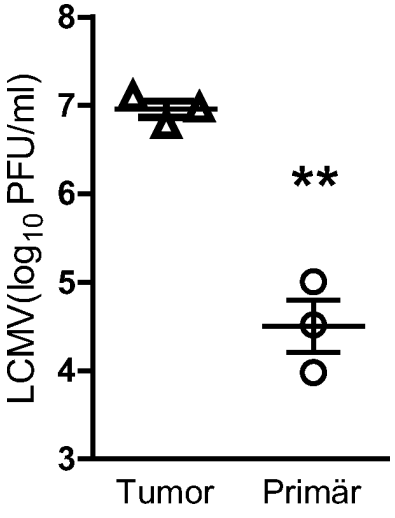
WEBB, H. E. [et al.]: The treatment of 18 cases of malignant disease with an arenavirus. In: Clinical Oncology, Vol. 1, 1975, No. 2, S. 157-169. - ISSN 0305-7399

ZAPATA; J. C.; SALVATO, M. S.: Arenavirus variations due to host-specific adaptation. In: Viruses, 2013, 5, S.241-278, - doi:10.3390/v5010241 unter URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564120/

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Arenaviren zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung von Tumoren sowie Verfahren zur Herstellung von Arenaviren mit (verbesserten) tumorregressiven Eigenschaften**



(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Arenaviren zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung von Tumoren sowie Verfahren zur Herstellung von Arenaviren mit (verbesserten) tumorregressiven Eigenschaften.

Beschreibung

ANWENDUNGSGEBIET UND STAND DER TECHNIK

[0001] Die Erfindung betrifft Arenaviren zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung, von Tumoren sowie Verfahren zur Herstellung von Arenaviren mit (verbesserten) tumorregressiven Eigenschaften.

[0002] Die Arenaviren gehören zur Familie der humanpathogenen, pleomorphen RNA-Viren. Erkrankungen mit diesen Viren gehören aufgrund ihres natürlichen Reservoirs in Tieren, überwiegend Nagern, zu den Zoonosen. Als Zoonosen bezeichnet man Erkrankungen, die vom Tier auf den Menschen und umgekehrt vom Menschen auf das Tier übertragbar sind.

[0003] Wenigstens acht Arenaviren sind dafür bekannt, dass sie im Menschen eine Krankheit verursachen. Typisch sind aseptische Meningitis und hämorrhagisches Fieber. Bekannte Viren, welche im Menschen eine Erkrankung auslösen können, stellen das Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV), Guanarito-Virus (GTOV), Junin-Virus (JUNV), Lassa-Virus (LASV), Lujo-Virus (LUJV), Machupo-Virus (MACV), Sabia-Virus (SABV) sowie das Whitewater-Arroyo-Virus (WWAV) dar.

[0004] Arenaviren werden allgemein in zwei Gruppen, nämlich in die Altwelt-Arenaviren und die Neuwelt-Arenaviren, unterteilt. Diese Gruppen unterscheiden sich geografisch und genetisch. Altwelt-Arenaviren, wie beispielsweise das Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus, wurden in Ländern der östlichen Hemisphäre, wie beispielsweise europäischen, asiatischen und afrikanischen Ländern, gefunden. Dagegen wurden Neuwelt-Arenaviren in Ländern der westlichen Hemisphäre, wie beispielsweise Argentinien, Bolivien, Venezuela, Brasilien und den Vereinigten Staaten von Amerika, gefunden.

[0005] Der Name der Virenfamilie leitet sich vom Lateinischen arenosus (sandig) bzw. arena (Sand) her, um damit die sandige ribosomale Struktur im Inneren der Virionen zu beschreiben. Die Virionen der Arenaviren haben eine runde bis unregelmäßige Gestalt und sind je nach Spezies und Präparation des Untersuchungsmaterials 50 nm bis 300 nm, meistens zwischen 110 nm und 130 nm, im Durchmesser groß. In die Virushülle sind 8 nm bis 10 nm lange, keulenförmige Glykoprotein-Spikes eingelagert. Die einzelnen Spikes bestehen aus einem Tetramer des viralen Hüllproteins.

[0006] Die Virionen enthalten weiterhin zwei ringförmig geschlossene und eine helikale Symmetrie aufweisende Kapside. Die Länge der Kapside variiert zwischen 450 nm und 1300 nm. Jeweils ein Molekül der viralen RNA(ribonucleic acid)-Polymerase (L-Protein) ist an sie angelagert.

[0007] Jedes Kapsid enthält ein Molekül einer einzelsträngigen RNA mit gemischter (d.h. ambisense, +/–) Polarität. Die beiden einzelsträngigen RNA-Moleküle stellen dabei das virale Genom dar. Sie werden als L (large) und S (small) bezeichnet und sind etwa 7,5 kb (Kilobasen) bzw. 3.5 kb (Kilobasen) groß. Obwohl die Kapside ringförmig geschlossen sind, sind die RNA-Stränge linear und damit nicht zirkulär. Eine 19 bis 30 Basen lange Sequenz am 3‘-Ende der RNA ist an beiden Strängen vorhanden und auch innerhalb der Virusfamilie konserviert.

[0008] Morphologisch sehr außergewöhnlich ist die Anwesenheit einer wechselnden Anzahl von zellulären Ribosomen innerhalb der Virionen, welche den Viruspartikeln ihr „sandiges“ Aussehen verleihen. Ebenso findet man in gereinigten Viruspräparationen eine Anzahl unterschiedlicher zellulärer RNAs (darunter auch ribosomale RNA) sowie replikative Formen der viralen RNA, so verschiedene virale mRNAs (messenger ribonucleic acids, an die Ribosomen gebunden) und vollständige komplementäre Stränge des Virusgenoms. Diese nichtgenomischen RNAs befinden sich in wechselnder Menge alle außerhalb der oben genannten Kapside.

[0009] Die Verwendung von Arenaviren als Impfvektoren ist bekannt. Ein prominentes Beispiel ist der gegen argentinisches hämorrhagisches Fieber eingesetzte Impfvirus Candid #1. Hierbei handelt es sich um eine Impfvariante des Junin-Virus.

[0010] Aus der WO 2009/083210 A1 ist die Verwendung von replikationsdefekten, d.h. gentechnologisch modifizierten, Arenavirus-Partikel (Virionen) unter anderem zur Behandlung von neoplastischen Erkrankungen, wie beispielsweise Melanom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Lungenkarzinom, bekannt. In der Publikation “Development of replication-defective lymphocytic +choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8 T cell immunity“ (Nature Medicine, Bd. 16, Nr. 3, März 2010, S. 339–345; doi: 10.1038/nm.2104) wird als potentielles Anwendungsgebiet für solche Viruspartikel die Krebsimmuntherapie erwähnt.

[0011] Ferner ist aus der WO 2006/008074 A1 die Verwendung von Verpackungszellen, welche retrovirale, mit Arenavirus-Glykoprotein pseudotypisierte Virionen produzieren, zur Gentherapie solider Tumore bekannt.

[0012] Die im Stand der Technik beschriebenen Methoden zur Behandlung von Tumoren beruhen auf der Verwendung von gentechnologisch sehr aufwändig herzustellenden Viruspartikeln. Bei gentherapeutischen Behandlungsmethoden kommt hinzu, dass eine ausreichende, therapeutisch wirksame Transduktion des Tumorgewebes mit gentechnisch hergestellten Virionen oder Verpackungszellen, welche Virionen produzieren, häufig nicht erzielbar ist.

AUFGABE UND LÖSUNG

[0013] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine gegenüber dem Stand der Technik einfachere und insbesondere effizientere Therapielösung für Tumore, insbesondere Karzinome und Sarkome, bereitzustellen.

[0014] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Arenavirus gemäß unabhängigem Anspruch 1, durch ein Medikament gemäß Anspruch 13 sowie durch ein in-vitro-Verfahren gemäß unabhängigem Anspruch 14. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen definiert. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht. Ein zusätzlicher Erfindungsgegenstand, welcher die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe löst, ist in der Beschreibung offenbart.

[0015] Gemäß einem ersten Aspekt betrifft die Erfindung ein Arenavirus zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung eines Tumors, vorzugsweise eines malignen, d.h. bösartigen, Tumors bei Mensch oder Tier.

[0016] Das Arenavirus zeichnet sich vorzugsweise dadurch aus, dass es frei von genomischer Fremd-RNA ist, d.h. keine genomische Fremd-RNA aufweist. Mit anderen Worten ist das Genom (Erbgut) des Arenavirus vorzugsweise frei von Fremd-RNA bzw. weist vorzugsweise keine Fremd-RNA auf.

[0017] Unter dem Ausdruck „genomische Fremd-RNA“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine RNA (ribonucleic acid, Ribonukleinsäure) bzw. RNA-Sequenz verstanden werden, welche im Genom eines Wildtyp-Arenavirus oder im Genom einer Mutante eines Wildtyp-Arenavirus (mutiertes Arenavirus), insbesondere im Genom einer natürlichen Mutante eines Wildtyp-Arenavirus (natürlich mutiertes Arenavirus), nicht vorkommt bzw. nicht enthalten ist. Beispiele für Fremd-RNA stellen artifizielle bzw. synthetische RNA-Moleküle, RNA von Organismen sowie RNA von anderen Viren dar.

[0018] Unter dem Ausdruck „Wildtyp-Arenavirus“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) ein Arenavirus verstanden werden, dessen Genom die in der Natur auftretende genetische Normalform darstellt.

[0019] Unter dem Ausdruck „Mutante eines Wildtyp-Arenavirus“ bzw. „mutiertes Arenavirus“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) ein Arenavirus verstanden werden, dessen Genom gegenüber dem Wildtyp-Genom eine spontane, d.h. natürlich verursachte, oder durch Mutagene induzierte Veränderung aufweist.

[0020] Dementsprechend soll unter dem Ausdruck „natürliche Mutante eines Wildtyp-Arenavirus“ bzw. „natürlich mutiertes Arenavirus“ im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) ein Arenavirus verstanden werden, dessen Genom gegenüber dem Wildtyp-Genom eine spontane, d.h. natürlich verursachte, Veränderung aufweist. Ein natürlich mutiertes Arenavirus lässt sich vorzugsweise durch Passage, insbesondere serielle Passage, herstellen, worauf im Folgenden noch näher eingegangen werden wird.

[0021] Die Erfindung beruht auf dem überraschenden Befund, dass Arenaviren ohne genomische Fremd-RNA in der Lage sind, eine Tumorregression zu bewirken. Die Tumorregression beruht auf einer durch die Arenaviren verursachten Aktivierung bzw. Stimulierung von angeborenen und adaptiven Immunzellen. Die aktivierten Immunzellen sezernieren vermehrt antitumorale Zytokine wie Interferon-α und Interferon-γ, wodurch der Tumor bekämpft bzw. abgestoßen wird. Ein weiterer überraschender Befund stellt die Erkenntnis dar, dass die Arenaviren im Falle einer Tumormanifestation eine signifikant erhöhte Sezernierung von antitumoralen Zytokinen bewirken. Arenaviren ohne genomische Fremd-RNA eignen sich somit zur Anwendung bei der Tumorbe-

handlung. Dies wurde vom Anmelder erfolgreich anhand von Tierexperimenten verifiziert. Hierzu wurden unter anderem Mäuse eingesetzt, in welchen ein Wachstum humaner Tumoren möglich ist.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform ist das Arenavirus ferner frei von nichtgenomischer Fremd-RNA. Unter dem Ausdruck „nichtgenomische Fremd-RNA“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine RNA bzw. RNA-Sequenz außerhalb des Arenavirusgenoms verstanden werden, welche in einem Wildtyp-Arenavirus oder einer Mutante eines Wildtyp-Arenavirus (mutiertes Arenavirus), insbesondere natürlichen Mutante eines Wildtyp-Arenavirus (natürlich mutiertes Arenavirus), nicht vorkommt bzw. nicht enthalten ist. Mit anderen Worten weist das Arenavirus bei dieser Ausführungsform insgesamt keine Fremd-RNA, d.h weder genomische Fremd-RNA noch nichtgenomische Fremd-RNA, auf.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Arenavirus um ein Wildtyp-Arenavirus.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Arenavirus um eine natürliche Mutante eines Wildtyp-Arenavirus, d.h. um ein natürlich mutiertes Arenavirus.

[0025] Bevorzugt ist die natürliche Mutante bzw. das natürlich mutierte Arenavirus durch Passage, insbesondere mehrfache Passage, in Wirtstieren und/oder Wirtszellen hergestellt.

[0026] Besonders bevorzugt ist die natürliche Mutante bzw. das natürlich mutierte Arenavirus durch serielle Passage in Wirtstieren und/oder Wirtszellen hergestellt.

[0027] Bei dem erfindungsgemäß vorgesehenen Arenavirus handelt es sich somit vorzugsweise um ein Arenavirus, welches ausgehend von seiner Wildtyp-Form durch Passage, vorzugsweise serielle Passage, in Wirtstieren und/oder Wirtszellen, hergestellt ist.

[0028] Bei den in den vorherigen Absätzen erwähnten Wirtstieren handelt es sich vorzugsweise um Nager, insbesondere Mäuse. Bei den in den vorherigen Absätzen erwähnten Wirtszellen handelt es sich dagegen vorzugsweise um dendritische Zellen oder Tumorzellen.

[0029] Unter dem Ausdruck „Passage“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis ein vielfaches, regelmäßiges Einbringen des Arenavirus in Wirtstiere und/oder Wirtszellen verstanden werden. Unter dem Ausdruck „serielle Passage“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis ein vielfaches, regelmäßiges Einbringen des Arenavirus in unterschiedliche Wirtstiere, vorzugsweise derselben Art, und/oder unterschiedliche Zellen, vorzugsweise desselben Typs, verstanden werden. Durch den vielfachen Wechsel der Umgebung (Wirtstier und/oder Wirtszelle) ist das Arenavirus einem erhöhten Adaptionszwang bzw. Mutationsdruck ausgesetzt, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es zu unter Tumorregressionsgesichtspunkten vorteilhaften Mutationen im Genom des Arenavirus kommt.

[0030] In einer weiteren Ausführungsform ist der Tumor ausgewählt aus der Gruppe aufweisend Karzinom, Melanom, Blastom, Lymphom und Sarkom.

[0031] Unter dem Ausdruck „Karzinom“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) eine maligne Neoplasie epithelialen Ursprungs verstanden werden.

[0032] Unter dem Ausdruck „Sarkom“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) eine maligne Neoplasie mesodermalen Ursprungs verstanden werden.

[0033] Unter dem Ausdruck „Melanom“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) eine maligne Neoplasie melanozytären Ursprungs verstanden werden.

[0034] Unter dem Ausdruck „Lymphom“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) eine maligne Neoplasie lymphozytären Ursprungs verstanden werden.

[0035] Unter dem Ausdruck „Blastom“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung (in Übereinstimmung mit dem fachmännischen Verständnis) eine maligne Neoplasie embryonalen Ursprungs verstanden werden.

[0036] Das Karzinom ist in einer bevorzugten Ausführungsform ausgewählt aus der Gruppe aufweisend Analkarzinom, Bronchialkarzinom, Lungenkarzinom, Endometriumkarzinom, Gallenblasenkarzinom, hepatozellu-

läres Karzinom, Hodenkarzinom, kolorektales Karzinom, Larynxkarzinom, Speiseröhrenkrebs, Magenkarzinom, Mammakarzinom, Nierenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreastumor, Pharynxkarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom und Cervixkarzinom.

[0037] Das Sarkom ist in einer bevorzugten Ausführungsform ausgewählt aus der Gruppe aufweisend Angiosarkom, Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Fibrosarkom, Kaposi-Sarkom, Liposarkom, Leiomyosarkom, Malignes Fibröses Histiozytom, neurogenes Sarkom, Osteosarkom und Rhabdomyosarkom.

[0038] Bei dem Arenavirus handelt es sich in einer weiteren Ausführungsform um ein Altwelt-Arenavirus, welches vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe aufweisend Ippy-Virus (IP-PYV), Lassa-Virus (LASV), Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV), Mobala-Virus (MOBV) und Mopeia-Virus (MOPV).

[0039] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Arenavirus um das Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus, vorzugsweise um einen Stamm, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe aufweisend WE, Armstrong, Klon 13 (Clone 13) und Docile.

[0040] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Arenavirus um ein Neuwelt-Arenavirus, welches vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe aufweisend Allpahuayo-Virus (ALLV), Amapari-Virus (AMAV), Bear-Canyon-Virus (BCNV), Chapare-Virus, Cupixi-Virus (CPXV), Flexal-Virus (FLEV), Guanarito-Virus (GTOV), Junin-Virus (JUNV), Latino-Virus (LATV), Machupo-Virus (MACV), Oliveros-Virus (OLVV), Parana-Virus (PARV), Pichinide-Virus (PICV), Pirital-Virus (PIRV), Sabia-Virus (SABV), Tacaribe-Virus (TCRV), Tamiami-Virus (TAMV) und Whitewater-Arroyo-Virus (WWAV).

[0041] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Arenavirus um das Junin-Virus, insbesondere um den Stamm Candid #1(Candid No.1).

[0042] Das Junin-Virus, insbesondere der Stamm Candid #1 (Candid No.1), weist in einer weitergehenden Ausführungsform eine S-Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 und eine L-Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 (gemäß beigefügtem Sequenzprotokoll) auf.

[0043] In einer weiteren Ausführungsform ist das Arenavirus aus Tumorlysaten, Organlysaten, Urin oder Blut isoliert.

[0044] In einer alternativen Ausführungsform ist das Arenavirus aus einem Zellkulturmedium, insbesondere aus einer humanen Tumorzelllinie, isoliert.

[0045] In einer weiteren Ausführungsform liegt das Arenavirus für eine Verabreichung in Form von Virionen vor, d.h. in Form von Arenaviruspartikeln, welche sich außerhalb einer Zelle befinden.

[0046] In einer weiteren Ausführungsform ist das Arenavirus für eine lokale, insbesondere intramuskuläre, intraperitoneale oder subkutane, Verabreichung vorgesehen.

[0047] Bevorzugt ist das Arenavirus zur lokalen Verabreichung in einer Dosis von 1 PFU (Plaque Forming Unit)/kg Körpergewicht bis 10^{12} PFU/kg Körpergewicht, insbesondere 10^2 PFU/kg Körpergewicht bis 10^6 PFU/kg Körpergewicht, bevorzugt 10^3 PFU/kg Körpergewicht bis 10^5 PFU/kg Körpergewicht, vorgesehen.

[0048] In einer alternativen Ausführungsform ist das Arenavirus für eine systemische, insbesondere intravenöse, Verabreichung vorgesehen.

[0049] Vorzugsweise ist das Arenavirus zur systemischen Verabreichung in einer Dosis von 1 PFU/kg Körpergewicht bis 10^{12} PFU/kg Körpergewicht, insbesondere 10^2 PFU/kg Körpergewicht bis 10^6 PFU/kg Körpergewicht, bevorzugt 10^3 PFU/kg Körpergewicht bis 10^5 PFU/kg Körpergewicht, vorgesehen.

[0050] Gemäß einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung ein Medikament zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung eines Tumors, insbesondere malignen Tumors.

[0051] Das Medikament zeichnet sich besonders dadurch aus, dass es ein Arenavirus gemäß erstem Erfindungsaspekt aufweist.

[0052] Das Medikament weist vorzugsweise ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger auf. Der Träger kann insbesondere ausgewählt sein aus der Gruppe aufweisend Wasser, Salzlösung, Pufferlösung und Zellkulturmedium.

[0053] In einer weiteren Ausführungsform weist das Medikament ferner einen Wirkstoff auf. Der Wirkstoff kann insbesondere ein Zytostatikum, ein Antikörper und/oder ein Zytokin sein.

[0054] Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Medikaments, insbesondere des Arenavirus sowie des Tumors, wird zur Vermeidung von Wiederholungen vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.

[0055] Gemäß einem dritten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Arenavirus mit tumorregressiven, d.h. tumorabstoßenden/-bekämpfenden, Eigenschaften oder verbesserten tumoregressiven Eigenschaften.

[0056] Bei dem Tumor handelt es sich bevorzugt um einen malignen Tumor, vorzugsweise um ein Karzinom, Melanom, Blastom, Lymphom oder Sarkom. Entsprechend handelt es sich bei dem Verfahren bevorzugt um ein Verfahren zur Herstellung eines Arenavirus mit (verbesserten) karzinom-, melanom-, blastom-, lymphom- oder sarkomregressiven Eigenschaften.

[0057] Das Verfahren weist die folgenden Schritte auf:

a) Infizieren von dendritischen Zellen oder Tumorzellen mit einem Arenavirus,

b) Züchten des Arenavirus in den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen und

c) Isolieren des gezüchteten Arenavirus oder einer Teilmenge des gezüchteten Arenavirus aus den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen.

[0058] Die Schrittabfolge a) bis c) kann auch als (einzelne) Passage des Arenavirus in den dendritischen Zellen oder Tumorzellen bezeichnet werden.

[0059] Bei dem Arenavirus handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform um einen Arenavirus, welches vor dem Durchführen des Schritts a) einer seriellen Passage in Wirtstieren unterworfen wurde. Bezüglich weiterer Einzelheiten und Vorteile hierzu sei auf die entsprechenden im Rahmen des vierten Erfindungsaspektes gemachten Ausführungen Bezug genommen.

[0060] Die dendritschen Zellen oder Tumorzellen liegen in einer weiteren Ausführungsform in Form einer Zellkultur (dentrische Zellkultur oder Tumorzellkultur) vor.

[0061] Bei den Tumorzellen handelt es sich vorzugsweise um maligne Tumorzellen, insbesondere um Karzinom-, Melanom-, Blastom, Lymphom- oder Sarkomzellen.

[0062] Die Karzinomzellen können ausgewählt sein aus der Gruppe aufweisend Analkarzinomzellen, Bronchialkarzinomzellen, Lungenkarzinomzellen, Endometriumkarzinomzellen, Gallenblasenkarzinomzellen, hepatozelluläre Karzinomzellen, Hodenkarzinomzellen, kolorektale Karzinomzellen, Larynxkarzinomzellen, Speiseröhrenkrebszellen, Magenkarzinomzellen, Mammakarzinomzellen, Nierenkarzinomzellen, Ovarialkarzinomzellen, Pankreastumorzellen, Pharynxkarzinomzelen, Prostatakarzinomzellen, Schilddrüsenkarzinomzellen und Cervixkarzinomzellen.

[0063] Die Sarkomzellen können ausgewählt sein aus der Gruppe aufweisend Angiosarkomzellen, Chondrosarkomzellen, Ewing-Sarkomzellen, Fibrosarkomzellen, Karposi-Sarkomzellen, Liposarkomzellen, Leiomyosarkomzellen, Maligne Fibröse Histiozytomzellen, neurogene Sarkomzellen, Osteosarkomzellen und Rhabdomyosarkomzellen.

[0064] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den Tumorzellen um immortalisierte Immunzellen, insbesondere immortalisierte Makrophagen.

[0065] Das Infizieren der dendritischen Zellen oder Tumorzellen gemäß Schritt a) erfolgt vorzugsweise durch Zugeben des Arenavirus zu den Zellen.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge a) bis c) mit neuen, insbesondere nicht infizierten, dendritischen Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder mit neuen, insbesondere nicht infizierten, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs (desselben Tumortyps), wiederholt.

[0067] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge a) bis c) mehrfach wiederholt. Vorzugsweise werden für jede Wiederholung neue, insbesondere nicht infizierte, dendritische Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder neue, insbesondere nicht infizierte, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, verwendet.

[0068] Vorzugsweise wird die Schrittabfolge a) bis c) 1-mal bis 10000-mal, insbesondere 10-mal bis 1000-mal, bevorzugt 30-mal bis 60-mal, wiederholt, wobei vorzugsweise für jede Wiederholung neue, insbesondere nicht infizierte, dendritische Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder neue, insbesondere nicht infizierte, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, verwendet werden.

[0069] Durch ein mehrfaches Wiederholen der Schrittabfolge a) bis c) ist das Arenavirus ständig gezwungen, sich an eine neue Umgebung, d.h. an neue dendritische Zellen oder Tumorzellen, zu adaptieren. Dieser permanente Adaptionszwang begünstigt das Auftreten von Mutationen, wodurch tumorregressive Eigenschaften des Arenavirus erzeugt oder verbessert werden können.

[0070] Während des Züchtens des Arenavirus gemäß Schritt b) finden eine Replikation des Arenavirus-Genoms und eine Vermehrung des Arenavirus innerhalb der dendritischen Zellen oder Tumorzellen statt.

[0071] Das Züchten des Arenavirus gemäß Schritt b) erfolgt vorzugsweise unter Standard-Zellkulturbedingungen.

[0072] Das Arenavirus wird vorzugsweise während eines Zeitraumes von 1 Minute bis 1 Jahr, insbesondere 10 Stunden bis 1 Monat, bevorzugt 24 Stunden bis 72 Stunden, in den dendritischen Zellen oder Tumorzellen gezüchtet.

[0073] Das Isolieren des gezüchteten Arenavirus gemäß Schritt c) erfolgt vorzugsweise aus einem Zellkulturüberstand.

[0074] Bevorzugt werden die dendritischen Zellen oder Tumorzellen vor dem Isolieren gemäß Schritt c) nach bestimmten Eigenschaften, vorzugsweise mittels eines Zellsortiergeräts, sortiert und anschließend kultiviert. Das Kultivieren der sortierten Zellen wird bevorzugt während eines Zeitraumes von 24 Stunden vorgenommen.

[0075] In einer weiteren Ausführungsform weist das Verfahren ferner die folgenden Schritte auf:

d) Klonieren des isolierten Arenavirus und

e) Sequenzieren des isolierten Arenavirus.

[0076] Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Verfahrens, insbesondere des Arenavirus sowie des Tumors, wird auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.

[0077] Gemäß einem vierten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Arenavirus mit tumorregressiven, d.h. tumorabstoßenden/-bekämpfenden, Eigenschaften oder verbesserten tumoregressiven Eigenschaften.

[0078] Bei dem Tumor handelt es sich bevorzugt um einen malignen Tumor, vorzugsweise um ein Karzinom, Melanom, Blastom, Lymphom oder Sarkom. Entsprechend handelt es sich bei dem Verfahren bevorzugt um ein Verfahren zur Herstellung eines Arenavirus mit (verbesserten) karzinom-, melanom-, blastom, lymphom- oder sarkomregressiven Eigenschaften.

[0079] Das Verfahren weist die folgenden Schritte auf:

a) Infizieren eines Wirtstieres, welches einen Tumor aufweist, mit einem Arenavirus,

b) Züchten des Arenavirus in dem infizierten Wirtstier und

c) Isolieren des gezüchteten Arenavirus oder einer Teilmenge des gezüchteten Arenavirus aus dem infizierten Wirtstier.

[0080] Die Schrittabfolge a) bis c) kann auch als (einzelne) Passage des Arenavirus in dem Wirtstier bezeichnet werden.

[0081] In einer bevorzugten Ausführungsform wird dem Wirtstier vor dem Durchführen des Schritts a) Gewebe des Tumors transplantiert.

[0082] In einer alternativen Ausführungsform wird ein gentechnisch modifiziertes Wirtstier verwendet, welches den Tumor spontan entwickelt.

[0083] Als Wirtstiere können insbesondere Nager, vorzugsweise Mäuse, verwendet werden. Beispielsweise können als Wirtstiere NOD SCID-Mäuse oder LoxP-Tag-Mäuse verwendet werden. Bei den Nod SCID-Mäusen ist die SCID-Mutation (Severe Combined Immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt) mit einem NOD(Non-Obese Diabetic, nicht-fettleibig-diabetisch)-Typ kombiniert. Bei Mäusen, welche homozygot für die SCID-Mutation sind, bilden sich keine funktionellen T-Zellen oder B-Zellen. Durch diesen Immundefekt sind diese Tiere hervorragend geeignet, um körperfremde Zellen, beispielsweise transplantierte Tumore, zu tolerieren.

[0084] Das Infizieren des Wirtstieres gemäß Schritt a) kann beispielsweise durch systemische, insbesondere intravenöse, oder lokale, beispielsweise subkutane, Verabreichung des Arenavirus erfolgen.

[0085] Insbesondere kann das Infizieren des Wirtstieres durch Verabreichung, vorzugsweise Injektion, des Arenavirus in den Tumor des Wirtstieres erfolgen.

[0086] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge a) bis c) mit einem neuen, insbesondere nicht infizierten, Wirtstier, vorzugsweise derselben Art, wiederholt.

[0087] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge a) bis c) mehrfach wiederholt. Vorzugsweise wird für jede Wiederholung ein neues, insbesondere nicht infiziertes, Wirtstier, vorzugsweise derselben Art, verwendet. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn das Arenavirus einer seriellen Passage in Wirtstieren, vorzugsweise derselben Art, unterworfen wird.

[0088] Vorzugsweise wird die Schrittabfolge a) bis c) 1-mal bis 1000-mal, insbesondere 10-mal bis 100-mal, bevorzugt 30-mal bis 60-mal, wiederholt, wobei vorzugsweise für jede Wiederholung ein neues, insbesondere nicht infiziertes, Wirtstier, vorzugsweise derselben Art, verwendet wird.

[0089] Durch ein mehrfaches Wiederholen der Schrittabfolge a) bis c) ist das Arenavirus ständig gezwungen, sich an eine neue Umgebung, d.h. an ein neues Wirtstier, zu adaptieren. Dieser permanente Adaptionszwang begünstigt das Auftreten von Mutationen, wodurch tumorregressive Eigenschaften des Arenavirus erzeugt oder verbessert werden können.

[0090] Während des Züchtens des Arenavirus gemäß Schritt b) finden eine Replikation des Arenavirus-Genoms und eine Vermehrung des Arenavirus innerhalb des Wirtstieres statt.

[0091] Das Arenavirus wird vorzugsweise während eines Zeitraumes von 1 Minute bis 500 Tagen, insbesondere 10 Minuten bis 100 Tagen, bevorzugt 1 Stunde bis 30 Tagen, in dem Wirtstier gezüchtet.

[0092] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Arenavirus aus Urin, Blut, dem Tumor oder aus Organlysaten des Wirtstieres isoliert.

[0093] In einer weiteren Ausführungsform weist das Verfahren ferner die folgenden Schritte auf:

d) Infizieren von dendritischen Zellen oder Tumorzellen mit dem gemäß Schritt c) isolierten Arenavirus,

e) Züchten des Arenavirus in den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen und

f) Isolieren des gezüchteten Arenavirus oder einer Teilmenge des gezüchteten Arenavirus aus den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen.

[0094] Die Schrittabfolge d) bis f) kann auch als (einzelne) Passage des Arenavirus in den dendritischen Zellen oder Tumorzellen bezeichnet werden.

[0095] Das Infizieren der dendritischen Zellen oder Tumorzellen gemäß Schritt d) erfolgt vorzugsweise durch Zugeben des Arenavirus zu den Zellen.

[0096] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge d) bis f) mit neuen, insbesondere nicht infizierten, dendritischen Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder mit neuen, insbesondere nicht infizierten, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs (desselben Tumortyps), wiederholt.

[0097] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Schrittabfolge d) bis f) mehrfach wiederholt. Vorzugsweise werden für jede Wiederholung neue, insbesondere nicht infizierte, dendritische Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder neue, insbesondere nicht infizierte, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, verwendet. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, wenn das Arenavirus zusätzlich einer seriellen Passage in dendritischen Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, unterworfen wird.

[0098] Vorzugsweise wird die Schrittabfolge d) bis f) 1-mal bis 1000-mal, insbesondere 10-mal bis 100-mal, bevorzugt 30-mal bis 60-mal, wiederholt, wobei vorzugsweise für jede Wiederholung neue, insbesondere nicht infizierte, dendritische Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder neue, insbesondere nicht infizierte, Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, verwendet werden.

[0099] Die Kombination einer seriellen Passage des Arenavirus in Wirtstieren, vorzugsweise derselben Art, mit einer seriellen Passage des Arenavirus in dendritischen Zellen, vorzugsweise desselben Typs, oder Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, eignet sich aufgrund des zusätzlich erhöhten Adaptionszwangs bzw. Mutationsdrucks in besonderer Weise zur Herstellung von Arenaviren mit (verbesserten) tumorregressiven Eigenschaften.

[0100] Das Arenavirus wird vorzugsweise während eines Zeitraumes von 1 Minute bis 500 Tagen, insbesondere 10 Minuten bis 100 Tagen, bevorzugt 1 Stunde bis 30 Tagen, in den dendritischen Zellen oder Tumorzellen gezüchtet.

[0101] Bevorzugt werden die dendritischen Zellen oder Tumorzellen vor dem Isolieren gemäß Schritt f) nach bestimmten Eigenschaften, vorzugsweise mittels eines Zellsortiergeräts, sortiert und anschließend kultiviert. Das Kultivieren der sortierten Zellen wird bevorzugt während eines Zeitraumes von 24 Stunden vorgenommen.

[0102] In einer weiteren Ausführungsform weist das Verfahren ferner die folgenden Schritte auf:
g) Klonieren des gemäß Schritt f) isolierten Arenavirus und
h) Sequenzieren des isolierten Arenavirus.

[0103] Alternativ kann es erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass der gemäß Schritt c) isolierte Arenavirus kloniert und anschließend sequenziert wird.

[0104] Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Verfahrens, insbesondere des Arenavirus, des Tumors sowie der dendritischen Zellen und Tumorzellen, wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.

[0105] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen in Form von Ausführungsbeispielen, den dazugehörigen Figuren sowie den Ansprüchen. Die nachfolgend beschriebenen Ausführungsformen dienen lediglich zur Erläuterung und zum besseren Verständnis der Erfindung und sind in keiner Weise einschränkend zu verstehen.

Beispielteil

1. Methoden und Materialien

1.1 Mäuse

[0106] Wenn nicht anderes erwähnt, waren die verwendeten Mäuse auf einem C57BL/6 Hintergrund. Map3k14$^{aly/aly}$ Mäusen fehlt NF-kB Signale und sind somit stark immunsupprimiert. Irf3 × Ir7$^{-/-}$ Mäuse können kein Interferon produzieren. NOD.SCID Mäuse haben kein adaptives Immunsystem. Somit ist ein Wachstum humaner Tumoren in diesen Mäusen möglich. LoxP-Tag Mäuse entwickeln spontan Lebertumoren.

1.2 Zelllinien und Reagenzien

[0107] MOPC Zellen sind murine Oropharynx Karzinom Zellen. Mc38 sind murine Kolonzarzinomzellen. Raw Zellen sind immortalisierte Makrophagen. A431 sind humane Lungenkarzinomzellen; Sw40 sind humane Kolonkarzinomzellen, Hela sind humane Cervixkarzinomzellen. Primäre Makrophagen wurden mittels M-CSF aus Knochenmarksvorläuferzellen gezüchtet. Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium mit 10% fötalem Rinderserum (Sigma-Aldrich), 2 mmol / l L-Glutamin und 100 U / ml Penicillin gehalten. Alle Zellen wurden in 5% CO2 kultiviert.

1.3 Viren

[0108] Die LCMV-Stamm WE wurde aus dem Labor von Prof. Zinkernagel (Experimentelle Immunologie, Zürich, Schweiz) erhalten und wurde in L929-Zellen vermehrt. Candid#1 wurde von Professor Paula Cannon (University of Southern California) erhalten.

1.4 Tumorwachstum und Behandlungen

[0109] Ungefähr 5×10^5 Tumorzellen (in 100microL) wurden subkutan in die rechte Flanke in 6 bis 12 Wochen alten Mäusen injiziert. Der längste Tumordurchmesser wurde durch gemessen. Mäuse wurden mit peritumoralen Injektionen von 2×10^4 PFU LCMV-WE oder Candid#1 behandelt (in 100–200microL).

1.5 Morphometrische Analyse von Tumorgefäßen

[0110] Morphometrische Analysen wurden mit aufeinanderfolgenden Gefrierschnitten durchgeführt, bei welchen der endotheliale Zellmarker CD31 angefärbt wurde. Die Quantifizierung der Gefäßdichte (MVD) wurde unter Verwendung des Durchschnitts von drei Tumorschnitten berechnet. MVD wurde als Zahl der Gefäße je Tumorfläche berechnet.

1.6 Der Nachweis von Hypoxie

[0111] Hypoxische Tumorbereiche wurden durch die Bildung von pimonidazole Addukte nach Injektion von Pimonidazol in Tumor-transplantierte Tiere für 30 min detektiert. Die Tumorschnitte wurden unter Verwendung des Hypoxyprobe-1 Plus-Kits nach Vorschrift des Herstellers (Pharmacia Natur International, Inc.) gefärbt.

1.7 IFN-α ELISA

[0112] Serum IFN-α-Spiegel wurden durch ELISA nach den Herstellerangaben (Research Diagnostics RDI, Flanders, NJ) bestimmt.

1.8 Statistische Analyse

[0113] Die Mittelwerte wurden unter Verwendung eines ungepaarten Student zweiseitigen t-Test verglichen. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Das Niveau der statistischen Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

2. Untersuchungen

2.1 Immortalisierte Makrophagen (Tumorzellen) und aus primärem Knochenmark generierte Makrophagen (primär) wurden mit LCMV (Stamm WE) infiziert. Die Replikation wurde nach 24 Stunden gemessen (n = 3). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich LCMV (Stamm WE) sowohl in immortalisierten als auch gesunden Zellen repliziert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 1 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 1 hat die folgende Legende:
Ordinate: LCMV ($\log_{10}$ PFU/ml)
Abszisse: Tumorzellen/gesunde Makrophagen (primär)
2.2 WT C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^5 MOPC Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2×10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine fast vollständige Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 2 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 2 hat die folgende Legende:

Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.3 WT C57BL/6-Mäuse wurden mit 5 × 10^5 MC38 Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine signifikante Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 3 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 3 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.4 Etwa neun Monate alten LoxP-TAg Mäusen mit spontan entwickelten Leberkarzinomen wurden mit 2 × 10^6 PFU LCMV intravenös infiziert oder unbehandelt gelassen. Die Tumorknoten (Durchmesser >=3 mm) wurden am Tag 6 (n = 3) und Tag 20 (n = 4–5) makroskopisch quantifiziert.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV die Anzahl an karzinomatösen Leberknoten deutlich reduzierte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 4 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 4 hat die folgende Legende:
Ordinate: Leberknoten (Anzahl)
Abszisse: Zeit
2.5 WT C57BL / 6-Mäuse (n = 4 / Gruppe) wurden subkutan mit 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag –3) oder LCMV (Stamm WE) 2 × 10^4 PFU (Tag 0) oder beiden 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag –3) und 2 × 10^4 PFU LCMV injiziert (Tag 0). Die Serumproben wurden am Tag 3 gesammelt, und es wurde ein IFN-α-ELISA durchgeführt.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das LCMV bei Versuchstieren, welchen gleichzeitig Karzinomzellen verabreicht wurden, eine drastisch erhöhte Sezernation von Interferon-γ bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 5 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 5 hat die folgende Legende:
Ordinate: IFN-α (pg/ml)
2.6 Map3k14$^{aly/aly}$ Mäusen und WT Mäuse wurden mit 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 6 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 6 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.7 Irf3 × Ir7$^{-/-}$ Mäusen und WT Mäuse wurden mit 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 7 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 7 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.8 WT Mäuse wurden mit 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Am Tag 9 nach Tumorgabe wurden die Tumoren histologisch mit CD31 Färbungen analysiert. Die Gefäßdichte (MVD) und der Gefäß-Gefäß Abstand wurden quantifiziert.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Abnahme der Tumorgefäßdichte bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 8A grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 8A hat die folgenden Legenden:

[0114]

Linke Seite:	Rechte Seite:
Ordinate: MVD [mm^3]	Ordinate: Gefäß-Gefäß Abstand (µm)
Abszisse: Tumor/Tumor LCMV	Abszisse: Tumor/Tumor LCMV

2.9 WT Mäuse wurden mit 5 × 10^5 MOPC Zellen (Tag 3) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 0). Am Tag 9 wurde den Tieren Pimonidazol gespritzt, und anschließend die Tumoren histologisch auf hypoxische Flächen analysiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Sauerstoffunterversorgung im Karzinomgewebe bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 8B grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 8B hat die folgende Legende:
Ordinate: Hypoxische Flächen/Tumor (%)
Abszisse: Tumor/Tumor LCMV
2.10 WT C57BL/6-Mäuse wurden subkutan mit 5 × 10^5 MOPC Zellen in der rechten Flanke injiziert (Tag 3). Am Tag 0 wurden eine Gruppe von Tieren mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) in die rechte Flanke (ipsilateral), linke Flanke (contralateral) oder intravenös behandelt. Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Tumorregression auch bei systemischer Gabe bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 9 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 9 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.11 NOD.SCID-Mäuse wurden mit 5 × 10^5 A431 Zellen (Tag –3) subkutan injiziert und dann entweder unbehandelt gelassen oder mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) behandelt. Die Tumorgröße (längster Durchmesser) wurde am angegebenen Tage gemessen. Die Mäuse wurden getötet, wenn die Tumorgröße 12 mm erreichte.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV die Überlebensrate bei den Versuchstieren erhöhte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 10 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 10 hat die folgende Legende:
Ordinate: Überleben (%)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.12: NOD.SCID-Mäuse wurden mit 5 × 10^5 Sw40 Zellen (Tag 0) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral oder 2 × 10^4 PFU Candid#1 peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV und Candid#1 eine Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 11 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 11 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.13 NOD.SCID-Mäuse wurden mit 5 × 10^5 Hela Zellen (Tag 0) behandelt. Eine Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE) peritumoral behandelt (Tag 3). Das Tumorwachstum wurde beobachtet.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LCMV eine Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 12 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 12 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)
2.14 NOD.SCID-Mäuse wurden mit 5 × 10^5 HepG2 Zellen (Tag 0) behandelt. Bei einer Tumorzelle von 6–8 mm wurde eine Gruppe von Mäusen mit 2 × 10^4 PFU LCMV (Stamm WE), eine andere Gruppe mit 2 × 10^4 PFU Candid #1 peritumoral behandelt (Tag 0). Das Tumorwachstum wurde beobachtet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 9 grafisch dargestellt.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Candid#1, nicht aber mit LCMV bei dieser Tumorart eine Tumorregression bewirkte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig.** 13 grafisch dargestellt.
Die **Fig.** 13 hat die folgende Legende:
Ordinate: Tumor-Durchmesser (mm)
Abszisse: Zeit (Tage)

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 2009/083210 A1 [0010]
- WO 2006/008074 A1 [0011]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Publikation “Development of replication-defective lymphocytic +choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8 T cell immunity“ (Nature Medicine, Bd. 16, Nr. 3, März 2010, S. 339–345; doi: 10.1038/nm.2104) [0010]

Patentansprüche

1. Arenavirus zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung eines Tumors, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Arenavirus frei von genomischer Fremd-RNA ist.

2. Arenavirus nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Arenavirus ein Wildtyp-Arenavirus ist.

3. Arenavirus nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Arenavirus eine natürliche Mutante ist.

4. Arenavirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Arenavirus ausgehend von seiner Wildtyp-Form durch serielle Passage in Wirtstieren und/oder Wirtszellen hergestellt ist.

5. Arenavirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass der Tumor ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Karzinom, Melanom, Blastom, Lymphom oder Sarkom.

6. Arenavirus nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Karzinom ausgewählt ist aus der Gruppe aufweisend Analkarzinom, Bronchialkarzinom, Lungenkarzinom, Endometriumkarzinom, Gallenblasenkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, Hodenkarzinom, kolorektales Karzinom, Larynxkarzinom, Speisenröhrenkrebs, Magenkarzinom, Mammakarzinom, Nierenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreastumor, Pharynxkarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Melanom und Cervixkarzinom.

7. Arenavirus nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Sarkom ausgewählt ist aus der Gruppe aufweisend Angiosarkom, Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Fibrosarkom, Kaposi-Sarkom, Liposarkom, Leiomyosarkom, Malignes Fibröses Histiozytom, Neurogenes Sarkom, Osteosarkom und Rhabdomyosarkom.

8. Arenavirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass es sich bei dem Arenavirus um einen Altwelt-Arenavirus, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe aufweisend Ippy-Virus, Lassa-Virus, Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus, Mobala-Virus und Mopeia-Virus, handelt.

9. Arenavirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass es sich bei dem Arenavirus um das Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus handelt.

10. Arenavirus nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet,** dass es sich bei dem Arenavirus um ein Neuwelt-Arenavirus, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe aufweisend Allpaahuayo-Virus, Amapari-Virus, Bear-Canyon-Virus, Chapare-Virus, Cupixi-Virus, Flexal-Virus, Guanarito-Virus, Junin-Virus, Candid #1 (Candid No.1), Latino-Virus, Machupo-Virus, Oliveros-Virus, Parana-Virus, Pichinde-Virus, Pirital-Virus, Sabia-Virus, Tacaribe-Virus, Tamiami-Virus und Whitewater-Arroyo-Virus, handelt.

11. Arenavirus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 10, **dadurch gekennzeichnet,** dass es sich bei dem Arenavirus um das Junin-Virus, insbesondere um den Stamm Candid #1, handelt.

12. Arenavirus nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Junin-Virus, insbesondere der Stamm Candid #1, eine S-Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 und eine L-Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 aufweist.

13. Medikament zur Anwendung bei der Behandlung und/oder Vorbeugung eines Tumors, **dadurch gekennzeichnet,** dass das Medikament ein Arenavirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche sowie vorzugsweise einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.

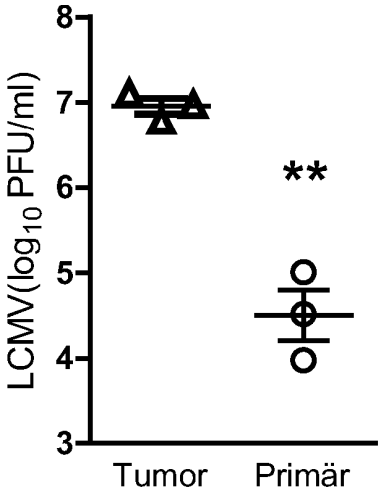
14. In vitro-Verfahren zur Herstellung eines Arenavirus mit tumorregressiven oder verbesserten tumorregressiven Eigenschaften, insbesondere eines Arenavirus nach einem der Ansprüche 1 bis 12, aufweisend die folgenden Schritte:
a) Infizieren von dendritischen Zellen oder Tumorzellen mit einem Arenavirus,
b) Züchten des Arenavirus in den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen und
c) Isolieren des gezüchteten Arenavirus oder einer Teilmenge des gezüchteten Arenavirus aus den infizierten dendritischen Zellen oder infizierten Tumorzellen.

15. In vitro-Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet,** dass es sich bei dem Arenavirus um einen Arenavirus handelt, welcher vor dem Durchführen von Schritt a) einer seriellen Passage in Wirtstieren unterworfen wurde.

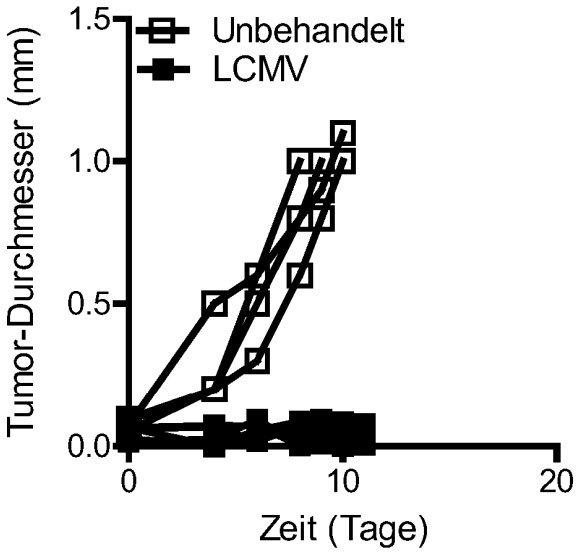
16. In vitro-Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Schrittabfolge a) bis c) 1-mal bis 1000-mal, insbesondere 10-mal bis 100-mal, bevorzugt 30-mal bis 60-mal, wiederholt wird, wobei für jede Wiederholung neue Tumorzellen, vorzugsweise desselben Typs, verwendet werden.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

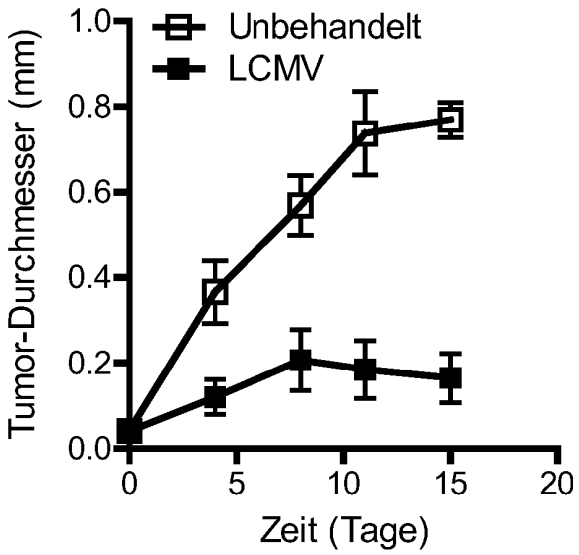
Anhängende Zeichnungen



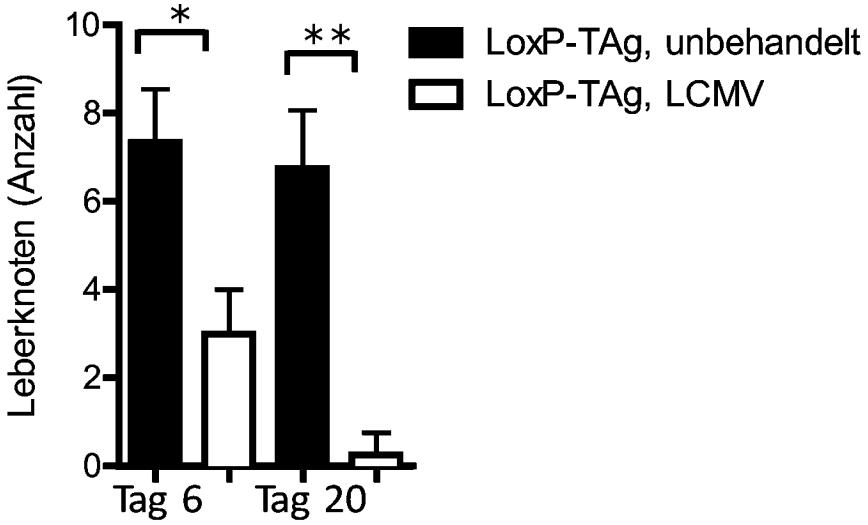
Figur 1



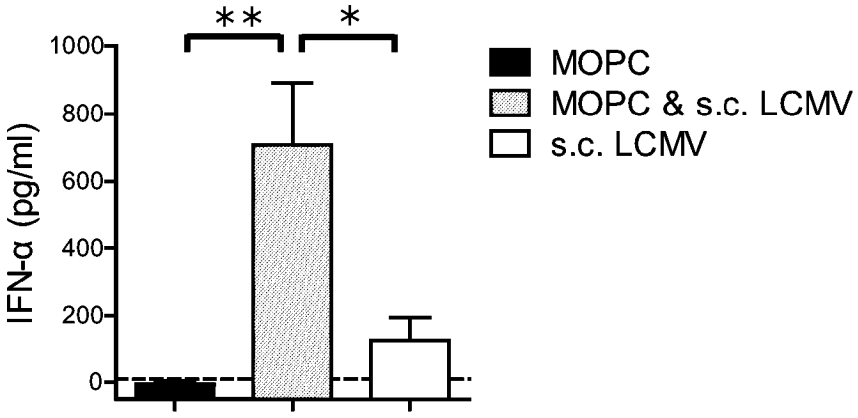
Figur 2



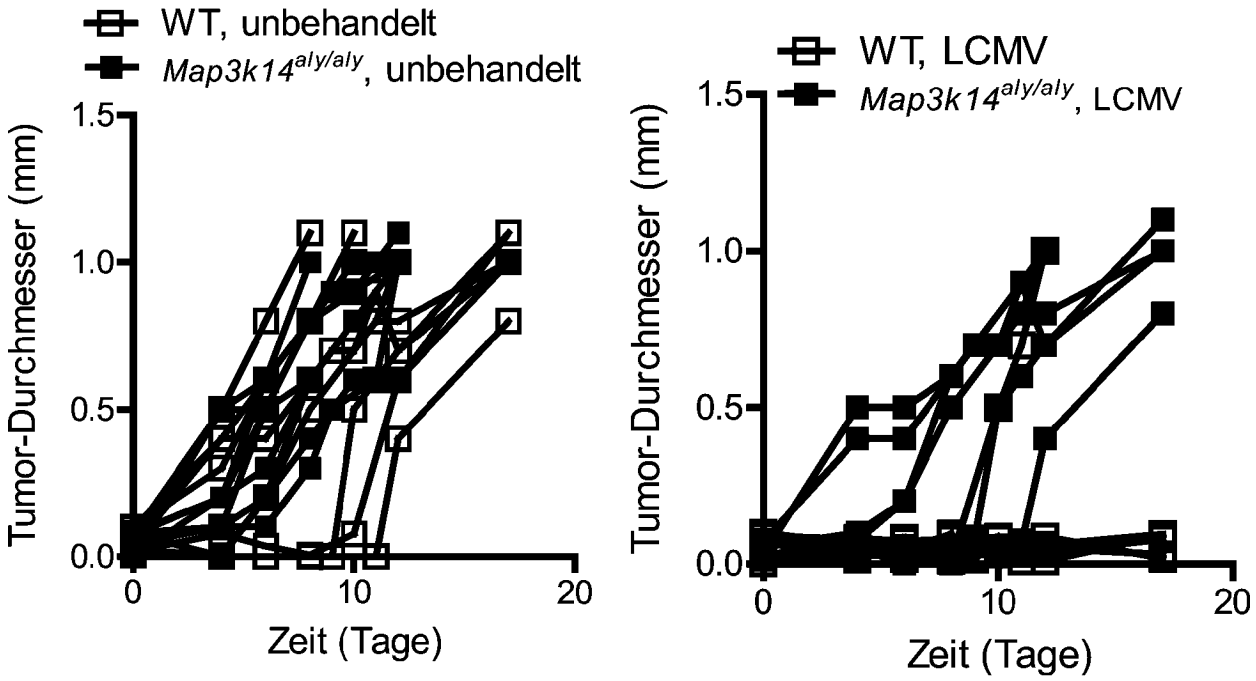
Figur 3



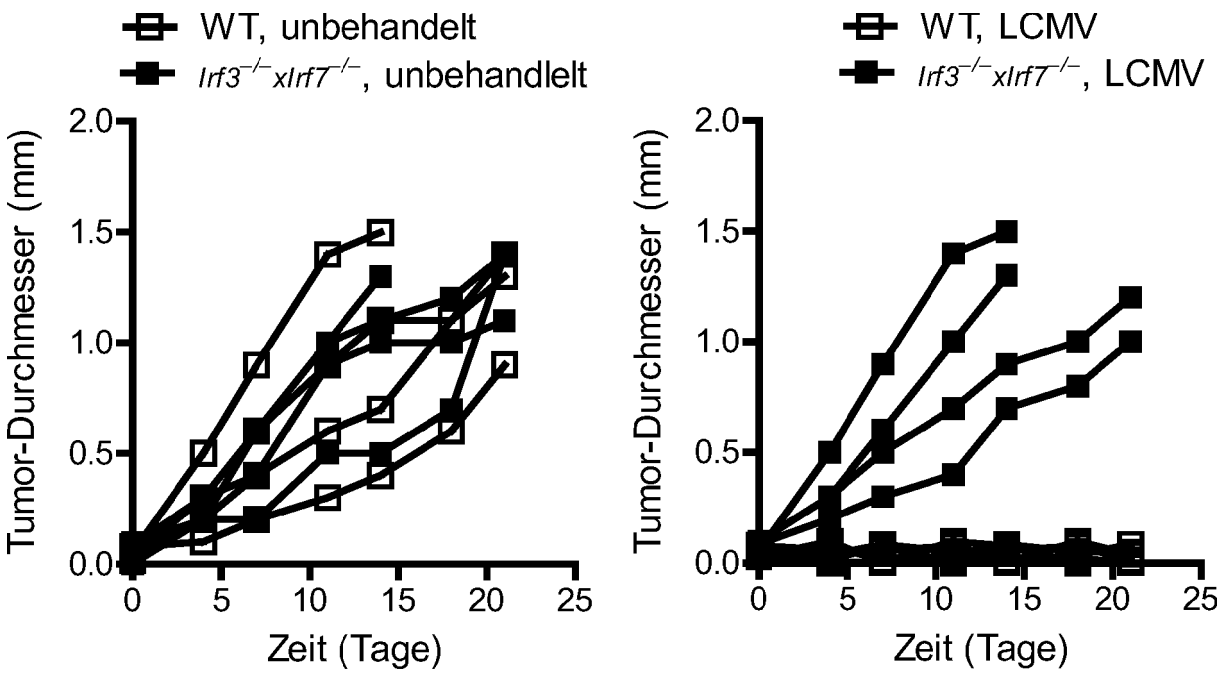
Figur 4



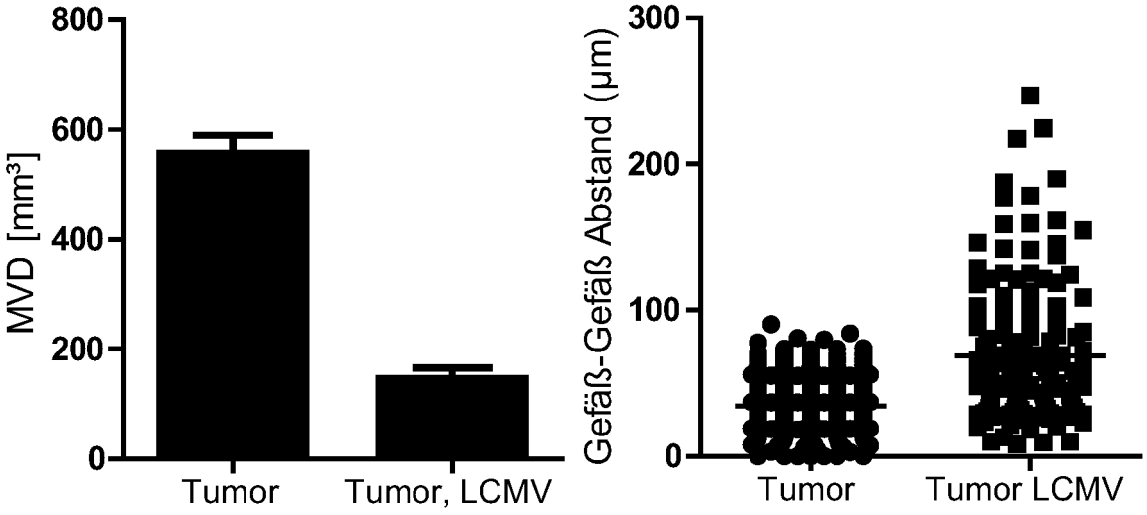
Figur 5



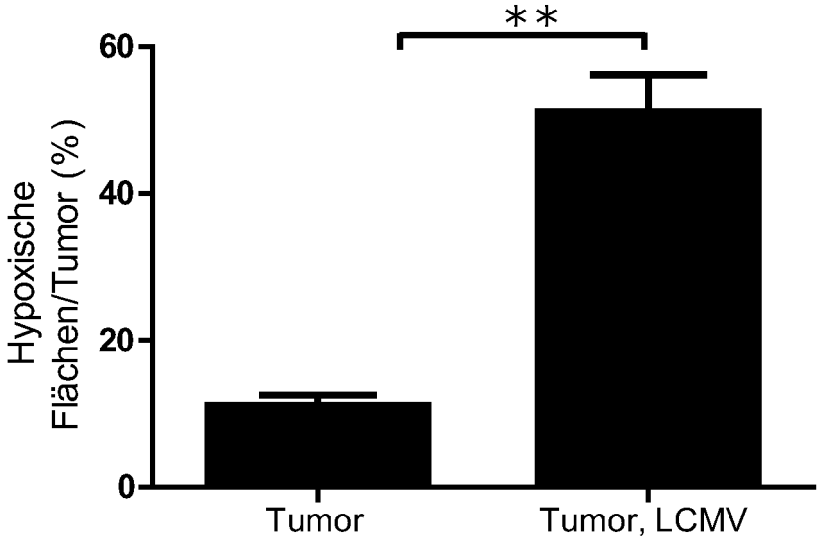
Figur 6



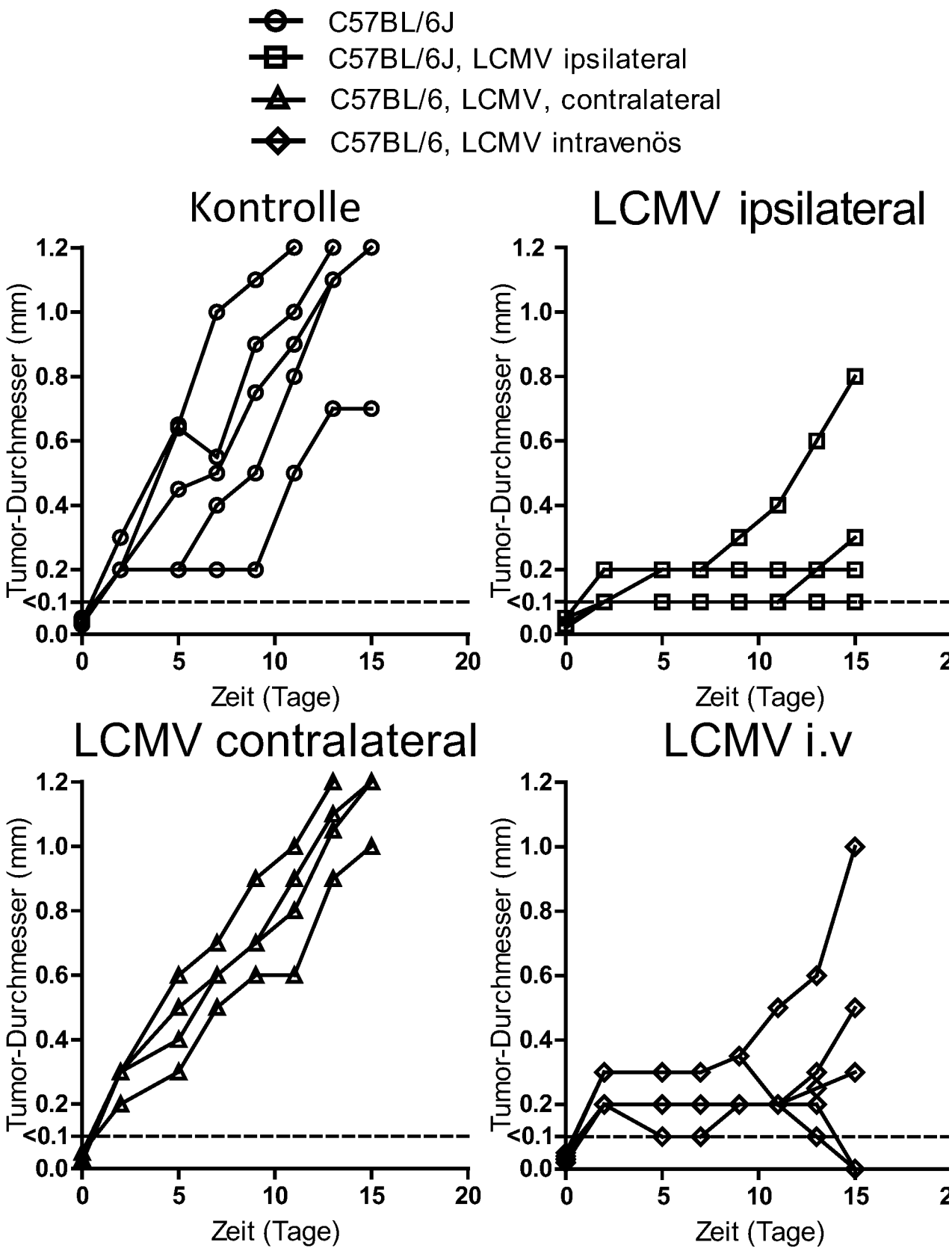
Figur 7



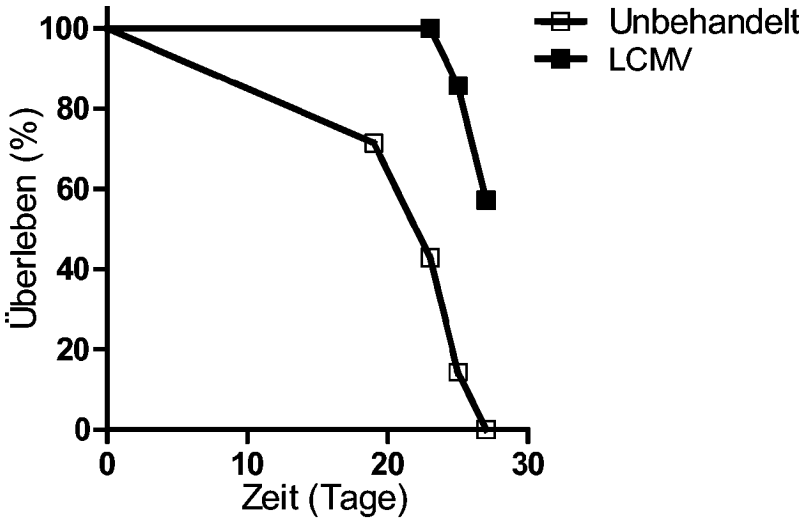
Figur 8A



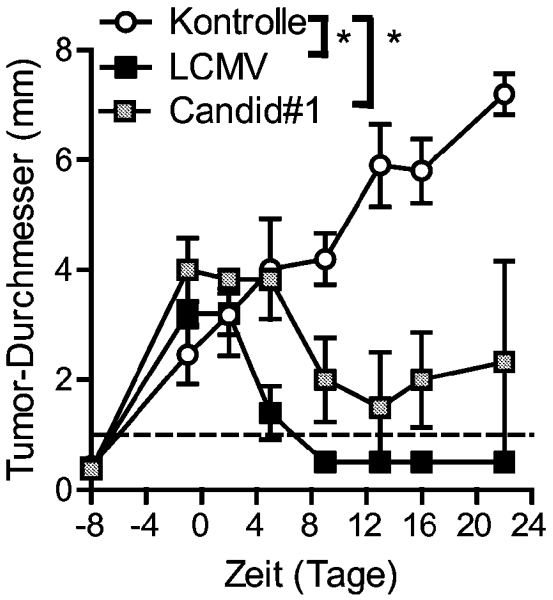
Figur 8B


C57BL/6J
C57BL/6J, LCMV ipsilateral
C57BL/6, LCMV, contralateral
C57BL/6, LCMV intravenös
Kontrolle
LCMV ipsilateral
LCMV contralateral
LCMV i.v
Tumor-Durchmesser (mm)
Zeit (Tage)
0.0
<0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0
5
10
15
20

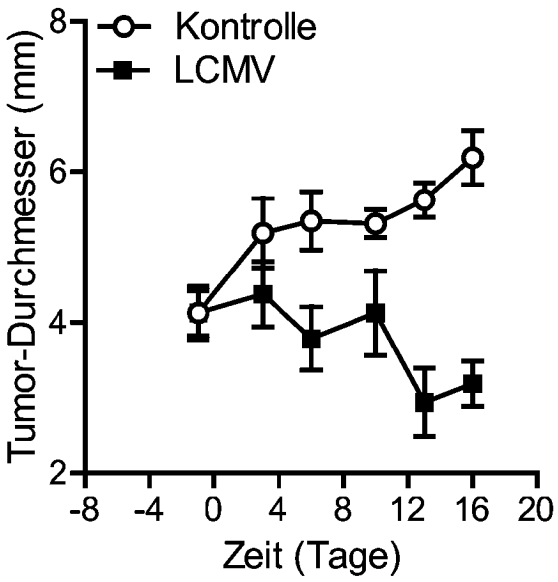
Figur 9



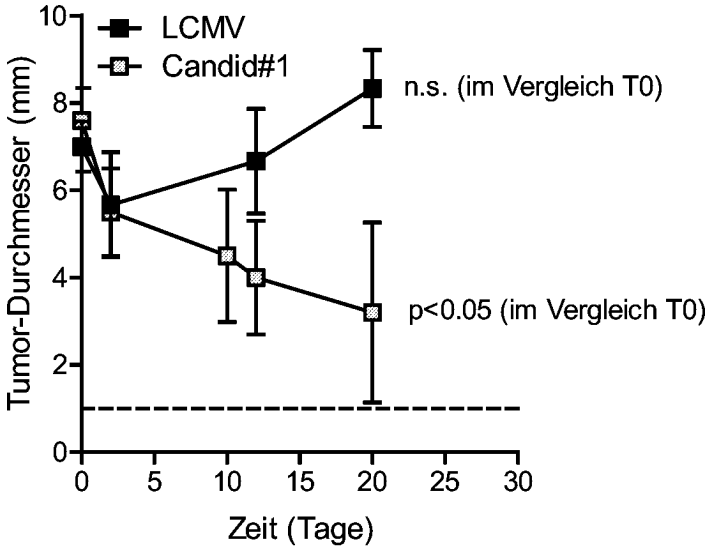
Figur 10



Figur 11



Figur 12


LCMV
Candid#1
n.s. (im Vergleich T0)
p<0.05 (im Vergleich T0)
Tumor-Durchmesser (mm)
Zeit (Tage)
0
2
4
6
8
10
0
5
10
15
20
25
30

Figur 13