



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 34 885 T2 2007.11.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 086 207 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 34 885.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/13142**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 927 443.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/064570**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.06.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **16.12.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **17.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 7/00 (2006.01)**  
**A61K 39/12 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

<b>89103 P</b>	<b>12.06.1998</b>	<b>US</b>
<b>108832 P</b>	<b>18.11.1998</b>	<b>US</b>
<b>117683 P</b>	<b>29.01.1999</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Mount Sinai School of Medicine of the City  
University of New York, New York, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**Huber & Schüssler, 81825 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PALESE, Peter, Leonia, NJ 07605, US;  
GARCIA-SASTRE, Adolfo, New York, NY 10128,  
US; O'NEIL, Robert, New York, NY 10029-6574, US**

(54) Bezeichnung: **NEUE METHODEN UND INTERFERON DEFIZIENTE SUBSTRATE ZUR VERMEHRUNG VON VIRUS**

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

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

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Herstellung von abgeschwächten Influenza-Virus-Impfstoffen, wobei die Viren Modifikationen an dem NS1-Gen besitzen, die die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären IFN-Reaktion verringert oder ausschaltet mit der Maßgabe, dass die Viren keine Influenza-C-Viren sind. Die Mutantenviren replizieren sich in vivo, weisen jedoch eine verringerte Pathogenzität auf und sind deshalb zur Verwendung bei Lebendviren-Impfstoffen und pharmazeutischen Formulierungen gut brauchbar.

## 2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

### 2.1 DAS INFLUENZA-VIRUS

**[0002]** Virusfamilien, die eine umhüllte Einzelstrang-RNS des Genoms mit Negativ-Sense enthalten, werden in Gruppen unterteilt, die nichtsegmentierte Genome enthalten (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae und Borna-Krankheit-Virus), oder diejenigen, die segmentierte Genome enthalten (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae und Arenaviridae). Die Orthomyxoviridae-Familie, die nachstehend detailliert beschrieben ist und hier bei den Beispielen verwendet wird, umfasst die Influenza-Viren, Viren des Typs A, B und C sowie Thogoto- und Dhori-Viren und das infektiöse Salmonellenanämie-Virus.

**[0003]** Die Influenzavirionen bestehen aus einem inneren Ribonucleoproteinkern (einem schraubenförmigen Nucleocapsid), der das Einzelstrang-RNS-Genom enthält, und einer äußeren Lipoproteinhülle, die innen von einem Matrixprotein (M1) verkleidet ist. Das segmentierte Genom des Influenza-A-Virus besteht aus acht Molekülen (sieben für die Influenza C) von linearen Einzelstrang-RNS mit negativer Polarität, die für zehn Polypeptide codieren, einschließlich: der RNS-abhängigen RNS-Polymeraseproteine (PB2, PB1 und PA) und des Nucleoproteins (NP), die das Nucleocapsid bilden; der Matrixmembranproteine (M1, M2); der zwei Oberflächen-Glycoproteine, die aus der lipidhaltenden Hülle vorstehen: Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA); des nichtstrukturellen Proteins (NS1) und des nucleären Exportproteins (NEP). Die Transcription und Replikation des Genoms finden in dem Nucleus statt und das endgültige Formieren findet über das Knospen auf der Plasmamembran statt. Die Viren können während Mischinfektionen Gene neu zusammenstellen.

**[0004]** Das Influenza-Virus adsorbiert sich über HA an Sialyloligosaccharide in Zellmembranglycoproteinen und -glycolipiden. Nach der Endozytose des Virions findet eine Konformationsänderung im HA-Molekül innerhalb des zellulären Endosoms statt, die das Membranverschmelzen erleichtert, wodurch das Enthüllen ausgelöst wird. Das Nucleocapsid wandert zum Nucleus, wo die virale mRNS transkribiert wird. Die virale mRNS wird durch einen einzigartigen Mechanismus transkribiert, bei dem die virale Endonuclease den mit Cap versehenen 5'-Terminus von zellulären heterologen mRNSs spaltet, die dann als Primer für die Transcription von viralen RNS-Matrizen durch die virale Transcriptase dienen. Transcripts enden an Stellen 15 bis 22 Basen von den Enden ihrer Matrizen, wo die Oligo(U)-Sequenzen als Signale für die Addition von Poly(A)-Zügen wirken. Von den so hergestellten acht viralen RNS-Molekülen sind sechs monocistronische Botschaften, die direkt in die Proteine translatiert werden, die HA, NA, NP und die viralen Polymeraseproteine, PB2, PB1 und PA, darstellen. Die zwei anderen Transcripts werden einem Spleißen unterzogen, wobei jedes zwei mRNS ergibt, die in unterschiedliche Leseraster translatiert werden, um M1, M2, NS1 und NEP zu erzeugen. Mit anderen Worten codieren die acht viralen RNS-Abschnitte für zehn Proteine: neun strukturelle und ein nichtstrukturelles. Eine Zusammenfassung der Gene des Influenza-Virus und ihrer Proteinprodukte ist in der nachstehenden Tabelle I gezeigt.

TABELLE I

INFLUENZA-VIRUSGENOM-RNS-ABSCHNITTE UND CODIERUNGSAUFGABEN<sup>a</sup>

Abschnitt	Länge <sub>b</sub> (Nucleotide)	Codiertes Polypeptid <sub>c</sub>	Länge <sub>d</sub> (Aminosäuren)	Moleküle pro Virion	Kommentar
1	2341	PB2	759	30-60	RNS-Transcriptase- komponente; Wirtszel- len-RNS-Cap-Bindung
2	2341	PB1	757	30-60	RNS-Transcriptase- komponente; Transcrip- tionsstart
3	2233	PA	716	30-60	RNS-Transcriptase- komponente
4	1778	HA	566	500	Hämagglutinin; Trimer; Hüllenglycoprotein; vermittelt die Anheftung an Zellen
5	1565	NP	498	1000	Nucleoprotein; mit der RNS verbunden; struk- turelle Komponente der RNS-Transcriptase
6	1413	NA	454	100	Neuraminidase; Tetra- mer; Hüllenglycoprotein
7	1027	M <sub>1</sub>	252	3000	Matrixprotein; kleidet das Innere der Hülle aus

		M <sub>2</sub>	96	?	Strukturelles Protein in Plasmamembran; gespleißte mRNS
8	890	NS <sub>1</sub>	230		Nichtstrukturelles Prote- in; Funktion unbekannt
		NEP	121	?	Nucleäres Exportprotein; gespleißte mRNS

a In Übereinstimmung mit R. A. Lamb und P. W. Choppin (1983), Annual Review of Biochemistry, Band 52, 467-506, bearbeitet.

b Für den A/PR/8/34-Stamm

c Mittels biochemischer und genetischer Ansätze bestimmt

d Mittels Nucleotidsequenzanalyse und Proteinsequenzierung bestimmt

**[0005]** Das Influenza-A-Virusgenom enthält acht Abschnitte der Einzelstrang-RNS negativer Polarität, die für ein nichtstrukturelles und neun strukturelle Proteine codieren. Das nichtstrukturelle Protein NS1 ist in mit dem Influenza-Virus infizierten Zellen reichlich vorhanden, wurde jedoch nicht in Virionen festgestellt. NS1 ist ein Phosphoprotein, das während der Infektion früh im Nucleus und zu einem späteren Zeitpunkt des viralen Zyklus auch im Zytoplasma gefunden wird (King et al., 1975, Virology 64: 378). Untersuchungen mit temperatu-

empfindlichen (ts) Influenza-Mutanten, die Läsionen in dem NS-Gen aufweisen, legen nahe, dass das NS1-Protein ein Transcriptions- und Posttranscriptions-Regulator von Mechanismen ist, mittels derer das Virus die Wirtszellen-Genexpression inhibieren und die virale Proteinsynthese stimulieren kann. Wie viele andere Proteine, die Posttranscriptions-Prozesse regulieren, steht das NS1-Protein mit spezifischen RNS-Sequenzen und -Strukturen in Wechselwirkung. Es wurde berichtet, dass sich das NS1-Protein an verschiedene RNS-Spezies bindet, einschließlich: vRNS, poly-A, U6 snRNS, des 5'-nichttranslatierten Bereichs ab den viralen mRNS und ds RNS (Qiu et al., 1995, RNA 1: 304; Qiu et al., 1994, J. Virol. 68: 2425; Hatada Fukuda, 1992, J. Gen. Virol. 73: 3325-9). Die Expression des NS1-Proteins aus cDNS in transfizierten Zellen wurde mit mehreren Wirkungen in Verbindung gebracht: dem Inhibieren des nucleozytoplasmatischen Transports von mRNS, dem Inhibieren von Prä-mRNS-Spleißen, dem Inhibieren der Wirts-mRNS-Polyadenylierung und der Stimulation der Translation von viraler mRNS (Fortes, et al., 1994, EMBO J. 13: 704; Enami, et al, 1994, J. Virol. 68: 1432; de la Luna, et al., 1995, J. Virol. 69: 2427; Lu, et al., 1994, Genes Dev. 8: 1817; Park, et al., 1995, J. Biol Chem. 270, 28433; Nemeroff et al., 1998, Mol. Cell. 1: 1991; Chen, et al., 1994, EMBO J. 18: 2273-83).

## 2.2 ABGESCHWÄCHTE VIREN

**[0006]** Inaktivierte Virusimpfstoffe werden durch "Abtöten" des viralen Pathogens, z.B. durch Hitze- oder Formalinbehandlung hergestellt, so dass sie nicht fähig sind, sich zu replizieren. Inaktivierte Impfstoffe sind von begrenzter Nützlichkeit, da sie keine langandauernde Immunität verleihen und deshalb nur einen begrenzten Schutz gewähren. Ein alternativer Ansatz für die Herstellung von Virus-Impfstoffen umfasst die Verwendung von abgeschwächten Lebendvirusimpfstoffen. Abgeschwächte Viren können sich replizieren, sind jedoch nicht pathogen und sorgen deshalb für eine länger andauernde Immunität und gewähren einen besseren Schutz. Jedoch umfassen die herkömmlichen Verfahren zur Herstellung von abgeschwächten Viren die zufällige Isolierung von Wirtsbereich-Mutanten, von denen viele temperaturempfindlich sind; das Virus wird z.B. durch unnatürliche Wirte passagiert, und Nachkommenviren, die immunogen, jedoch nicht pathogen sind, werden ausgewählt.

**[0007]** Ein herkömmliches Substrat zum Isolieren und Kultivieren von Influenza-Viren für Impfstoffzwecke sind embryonierte Hühnereier. Influenza-Viren werden typischerweise 2 bis 4 Tage bei 37°C in 10 bis 11 Tage alten Eiern gezüchtet. Obwohl die meisten humanen primären Isolate der Influenza-A- und -B-Viren in der Amnionhöhle von Embryos besser wachsen, werden die Viren nach zwei bis drei Passagen angepasst, in den Zellen der Allantoishöhle zu wachsen, die von außerhalb des Eis zugänglich ist (Murphy, B. R., und R. G. Webster, 1996, Orthomyxoviruses, Seiten 1397-1445. In Fields Virology, Lippincott-Raven P. A.).

**[0008]** Rekombinante DNS-Technik und gentechnische Techniken würden in der Theorie einen überlegenen Ansatz für die Herstellung eines abgeschwächten Virus ergeben, da spezifische Mutationen gezielt gentechnisch in das virale Genom verbracht werden können. Jedoch sind die genetischen Änderungen, die für die Abschwächung der Viren erforderlich sind, nicht bekannt oder vorhersagbar. Im Allgemeinen wurden die Versuche, die rekombinante DNS-Technik zu verwenden, um virale Impfstoffe gentechnisch herzustellen, meistens auf die Herstellung von Untereinheitsimpfstoffen gerichtet, die nur die Proteinuntereinheiten des Pathogens enthalten, das an der Immunreaktion beteiligt ist, exprimiert in rekombinanten viralen Vektoren wie dem Windpockenvirus oder dem Baculovirus. In jüngerer Zeit wurden DNS-Techniken bei einem Versuch verwendet, Herpesvirus-Deletionsmutanten oder Polioviren herzustellen, die in der Natur gefundene, abgeschwächte Viren oder bekannte Wirtsbereich-Mutanten nachahmen. Bis 1990 waren die Negativstrang-RNS-Viren überhaupt keiner sequenzspezifischen Manipulation zugänglich und konnten so nicht gentechnisch hergestellt werden.

**[0009]** Bisher hergestellte, abgeschwächte Lebendinfluenzaviren sind möglicherweise nicht fähig, die Interferonreaktion in dem Wirt, in dem sie sich replizieren, zu unterdrücken. Obwohl diese Viren nützlich sind, da sie immunogen und nicht pathogen sind, ist es deshalb schwierig, sie für die Zwecke der Herstellung von Impfstoffen in herkömmlichen Substraten zu vermehren.

**[0010]** Des Weiteren können abgeschwächte Viren Virulenzcharakteristiken besitzen, die so schwach sind, dass sie es nicht gestatten, dass der Wirt eine Immunreaktion aufbaut, die ausreicht, um mit späteren Expositionen fertig zu werden.

**[0011]** WO 97/08292 beschreibt ein Verfahren für die verbesserte Herstellung eines abgeschwächten Virus in Zellkultur, indem Tierzellkulturen zur Verfügung gestellt werden, in denen die Expression von Interferongen mit Bezug auf das normale Expressionsniveau verringert ist. WO 97/08292 beschreibt die Verwendung von Zellkulturen, bei denen das Niveau der mit Interferon vermittelten, antiviralen Proteinaktivität, insbesondere

re für die Doppelstrang-RNS-abhängige Kinase (PKR) und die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase signifikant verringert ist.

**[0012]** Egorov et al (1998, J. Virol. 72 (8): 6437-41) beschreiben das wirksame Züchten von Influenza-A-Viren mit langen Deletionen in dem NS1-Protein in Vero-Zellen im Vergleich zu MDCK-Zellen. Sie vermuten, dass dieses differentielle Züchtungsverhalten auf die Tatsache zurückzuführen sein könnte, dass Vero-Zellen in der Expression von funktionellem Interferon defizient sind.

### 3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von abgeschwächten Influenza-Virusimpfstoffen, wobei die Viren eine Mutation im NS1-Gen aufweisen, die die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären Interferonreaktion verringert oder ausschaltet, mit der Maßgabe, dass die Viren keine Influenza-C-Viren sind. Die Mutantenviren mit einer beeinträchtigten IFN-Antagonisten-Aktivität sind abgeschwächt – sie sind infektiös, sie können sich in vivo replizieren, um für ein subklinisches Niveau der Infektion zu sorgen, und sie sind nicht pathogen. Deshalb sind sie ideale Kandidaten für Lebendvirus-Impfstoffe. Des Weiteren können die abgeschwächten Viren eine starke IFN-Reaktion induzieren, die in vivo andere biologische Konsequenzen hat, wodurch ein Schutz gegen spätere infektiöse Krankheiten gewährt wird und/oder Antitumorreaktionen induziert werden. Deshalb können die abgeschwächten Viren für die Prävention oder Behandlung anderer Infektionskrankheiten, von Krebs bei Risikopersonen und/oder mit IFN behandelbaren Krankheiten pharmazeutisch verwendet werden.

**[0014]** Die bei der Erfindung verwendeten Viren können ausgewählt werden aus natürlich vorkommenden Stämmen, Varianten oder Mutanten, mutagenisierten Viren (z.B. durch Aussetzen an Mutagene, wiederholte Passagen und/oder eine Passage in nichtpermissiven Wirten erzeugt), Neuzusammenstellern (im Fall von segmentierten viralen Genomen) und/oder gentechnisch hergestellten Viren (z.B. unter Verwendung der "reversen Gentechniken"), die den gewünschten Phänotyp aufweisen – d.h. eine beeinträchtigte Fähigkeit, die zelluläre IFN-Reaktion zu bekämpfen. Das Mutanten- oder gentechnisch veränderte Virus kann auf der Grundlage von differentiellem Wachstum in IFN-defizienten Systemen im Vergleich zu IFN-kompetenten Systemen ausgewählt werden. Beispielsweise können Viren, die in einem IFN-defizienten System, jedoch nicht in einem IFN-kompetenten System wachsen (oder weniger gut in einem IFN-kompetenten System wachsen), ausgewählt werden.

**[0015]** Das so ausgewählte, abgeschwächte Virus kann selbst als Wirkbestandteil in Impfstoff- oder pharmazeutischen Formulierungen verwendet werden. Alternativ kann das abgeschwächte Virus als Vektor oder "Grundgerüst" von rekombinant hergestellten Impfstoffen verwendet werden. Für diesen Zweck kann die "reversen Gentechnik" verwendet werden, um Mutationen gentechnisch herzustellen oder fremde Epitope in das abgeschwächte Virus einzuführen, die als "Parental"-Stamm dienen könnten. Auf diese Weise können Impfstoffe für die Immunisierung gegen Stammvarianten oder bei der Alternative gegen vollkommen unterschiedliche Erreger oder Krankheitsantigene konstruiert werden. Beispielsweise kann das abgeschwächte Virus gentechnisch hergestellt werden, um neutralisierende Epitope anderer vorher ausgewählter Stämme zu exprimieren. Alternativ können Epitope von anderen Viren als den Negativstrang-RNS-Viren in das abgeschwächte Mutantenvirus eingebaut werden (z.B. gp160, gp120 oder gp41 von HIV). Alternativ können Epitope von nichtviralen infektiösen Pathogenen (z.B. Parasiten, Bakterien, Pilze) gentechnisch in das Virus eingeführt werden. Bei einer weiteren Alternative können Krebsimpfstoffe z.B. durch das gentechnische Einführen von Tumoranigenen in das abgeschwächte virale Gerüst hergestellt werden.

**[0016]** Bei einer bestimmten Ausführungsform, die Influenza-Viren umfasst mit der Maßgabe, dass die Viren nicht Influenza-C-Viren sind, können Neuzusammenstelltechniken verwendet werden, um den abgeschwächten Phänotyp von einem Parental-Virusstamm (einem natürlichen Mutanten, einem mutagenisierten Virus oder einem gentechnisch hergestellten Virus) zu einem unterschiedlichen Virusstamm (einem Wildtyp-Virus, einem natürlichen Mutanten, einem mutagenisierten Virus oder einem gentechnisch veränderten Virus) zu transferieren.

**[0017]** Die abgeschwächten Viren, die starke IFN-Reaktionen in Wirten induzieren, können auch in pharmazeutischen Formulierungen für die Prophylaxe oder Behandlung anderer viraler Infektionen oder mit IFN behandelbarer Krankheiten wie Krebs verwendet werden. In dieser Hinsicht kann der Tropismus des abgeschwächten Virus geändert werden, um das Virus zu einem gewünschten Zielorgan, Zielgewebe oder zu gewünschten Zielzellen in vivo oder ex vivo zielgerichtet zu richten. Unter Verwendung dieses Ansatzes kann die IFN-Reaktion lokal an der Zielstelle induziert werden, wodurch die Nebenwirkungen von systemischen Be-

handlungen mit IFN vermieden oder auf ein Minimum herabgesetzt werden. Für diesen Zweck kann das abgeschwächte Virus gentechnisch verändert werden, um einen Liganden zu exprimieren, der für einen Rezeptor des Zielorgans, des Zielgewebes oder der Zielzellen spezifisch ist.

**[0018]** Die Erfindung basiert teilweise auf der Entdeckung der Anmelder, dass NS1 des Wildtyp-Influenza-Virus als IFN-Antagonist wirkt, da NS1 die von IFN vermittelte Reaktion der mit dem Virus infizierten Wirtszellen inhibiert. Es wurde gefunden, dass virale Mutanten, die mit Bezug auf die NS1-Aktivität defizient sind, potente Induktoren der zellulären IFN-Reaktion sind, und sie wiesen in vivo einen abgeschwächten Phänotyp auf; d.h. die Mutantenviren replizieren sich in vivo, haben jedoch verringerte pathogene Wirkungen. Es ist zwar nicht beabsichtigt, sich durch irgendeine Theorie oder Erklärung, wie die Erfindung funktioniert, zu binden, doch die abgeschwächten Merkmale der Viren der Erfindung sind wahrscheinlich auf ihre Fähigkeit zurückzuführen, eine starke zelluläre IFN-Reaktion zu induzieren, und ihre beeinträchtigte Fähigkeit, die IFN-Reaktion des Wirts zu bekämpfen. Die nützlichen Merkmale der abgeschwächten Viren der Erfindung sind jedoch möglicherweise nicht nur auf die Wirkungen auf die zelluläre Interferon-Reaktion zurückzuführen. Tatsächlich können die Änderungen der anderen mit NS1 verbundenen Aktivitäten zu dem gewünschten abgeschwächten Phänotyp beitragen.

**[0019]** Es wurde gezeigt, dass sich die Mutanten-Influenza-Viren mit einer beeinträchtigten IFN-Antagonistenaktivität in vivo replizieren, wobei Titer erzeugt werden, die ausreichend sind, immunologische und zytokine Reaktionen zu induzieren. Beispielsweise verringerte die Impfung mit dem abgeschwächten Influenza-Virus den viralen Titer bei Tieren, die anschließend dem Wildtyp-Influenza-Virus ausgesetzt wurden. Die abgeschwächten Influenza-Viren wiesen auch eine antivirale und Antitumor-Aktivität auf. Die Präinfektion mit dem abgeschwächten Influenza-Virus inhibierte die Replikation anderer Stämme des Wildtyp-Influenza-Virus und anderer Viren (wie dem Sendai-Virus), die in embryonierten Eiern superinfiziert waren. Die Inokulation des abgeschwächten Influenza-Virus bei Tieren, denen man Tumorzellen injiziert hatte, verringerte die Anzahl der gebildeten Herde. Da es bekannt ist, dass das Influenza-Virus eine CTL-(zytotoxische T-Lymphozyten-)Reaktion induziert, ist das abgeschwächte Virus ein sehr attraktiver Kandidat für Krebsimpfstoffe.

**[0020]** Mutationen, die die IFN-Antagonistenaktivität des Virus verringern, jedoch nicht ausschalten, werden für Impfstoffformulierungen bevorzugt – solche Viren können für das Züchten sowohl in herkömmlichen als auch nichtherkömmlichen Substraten und für eine Zwischenvirulenz ausgewählt werden. Die Anmelder haben insbesondere gezeigt, dass sich ein NS1 C-ständig verkürzter Mutant in IFN-defizienten Substraten, wie 6 und 7 Tage alten embryonierten Hühnereiern, sowie in der Allantoismembran von 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern, dem herkömmlichen Substrat für das Influenza-Virus, das das Züchten der Influenza-Virus-Mutanten nicht gestattet, in denen das gesamte NS1-Gen deletiert ist (hier auch als "Knockout"-Mutanten bezeichnet), auf hohe Titer repliziert. Die Replikation des NS1-C-ständig verkürzten Mutanten ist in 12 Tage alten embryonierten Eiern verringert. Dieser Ansatz gestattet zum ersten Mal die Erzeugung und Identifizierung von lebendigen, abgeschwächten Negativstrang-RNS-Viren, die die IFN-Antagonistenaktivität geändert, jedoch nicht ausgeschaltet haben und die in Substraten, die für die Impfstoffherstellung geeignet sind, wachsen können. Dieser Ansatz gestattet zum ersten Mal ein wirksames Selektionsidentifikationssystem für Influenza- oder andere Viren, welche Mutationen enthalten, die eine geänderte, jedoch nicht ausgeschaltete Interferon-Antagonisten-Aktivität verleihen.

**[0021]** Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von IFN-defizienten Systemen, um die abgeschwächten Viren zu vermehren, die nicht in herkömmlichen Systemen, die gegenwärtig für die Impfstoffherstellung verwendet werden, gezüchtet werden können. Der Begriff "IFN-defiziente Systeme", wie hier verwendet, bezeichnet unreife embryonierte Eier, die sechs bis neun Tage alt sind, oder eine interferon-defiziente Zelllinie mit der Maßgabe, dass die Zelllinie keine Vero-Zellen und keine STAT(-)-Zelllinie ist, die kein IFN erzeugen oder ein geringes Niveau an IFN erzeugen, die nicht oder weniger wirksam auf IFN reagieren und/oder bezüglich der Aktivität der durch IFN induzierten antiviralen Gene defizient sind. Diese embryonierten Eier oder Zelllinien können mit Verbindungen vorbehandelt werden, die das IFN-System inhibieren (einschließlich Medikamenten, Antikörpern, Antisense, Ribozymen usw.).

**[0022]** Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Vermehren von Viren in den IFN-defizienten Systemen der Erfindung. Bei einer Ausführungsform umfasst ein Verfahren zum Vermehren der Viren (a) das Züchten des Virus in unreifen embryonierten Eiern, die sechs bis neun Tage alt sind, und (b) das Sammeln von Nachkommen-Virus mit der Maßgabe, dass das Virus kein Influenza-C-Virus ist. Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst ein Verfahren zum Vermehren von Viren (a) das Züchten des Virus in einer interferon-defizienten Zelllinie, und (b) das Sammeln des Nachkommenvirus, mit der Maßgabe, dass das Virus kein Influenza-C-Virus ist und die interferon-defiziente Zelllinie keine Vero-Zellen und keine STAT(-)-Zelllinien ist.

## 4. BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0023] Fig. 1.** Das delNS1-Virus inhibiert die Replikation des Wildtyp-Influenza-A-Virus in Eiern. Zehn Tage alte, embryonierte Hühnereier wurden mit den angegebenen pfu des delNS1-Virus inokuliert. Acht Stunden später wurden die Eier mit  $10^3$  pfu des WSN-Virus infiziert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C wurde das Allantois-Fluid geerntet und die WSN-Virustiter wurden mittels des Plaque-Tests in MDBK-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind der Durchschnitt von zwei Eiern.

**[0024] Fig. 2.** Induzierung einer antiviralen Reaktion in embryonierten Eiern durch das delNS1-Virus. Zehn Tage alte, embryonierte Hühnereier wurden mit PBS (unbehandelt) oder mit  $2 \times 10^4$  pfu des delNS1-Virus (mit delNS1 behandelt) inokuliert. Acht Stunden später wurden die Eier nun mit  $10^3$  pfu des Influenza-A/WSN/33-(H1N1-)Virus, des Influenza-A/PR8/34-(H+N1-)Virus, des Influenza-A/X-31-(H3N2-)Virus, des Influenza-B/Lee/40-Virus oder des Sendai-Virus infiziert. Nach zwei Tagen Inkubation wurde das Allantois-Fluid geerntet und die Virustiter wurden mittels eines Hämagglutinations-Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind der Durchschnitt von zwei Eiern.

**[0025] Fig. 3.** CV1-Zellen wurden mit einem IRF-3-exprimierenden Plasmid transfiziert, das mit dem grün fluoreszierende Protein (GFP) verschmolzen ist. Dies ermöglichte die Bestimmung der Lokalisierung des IRF-3 innerhalb der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. In einigen Fällen wurde ein NS1-Expressionsplasmid mit dem IRF-3-Expressionsplasmid in den angezeigten Verhältnissen kotransfiziert. Zellen 24 Stunden nach der Transfektion wurden mit hohem Moi mit PR8 (WT) oder mit dem delNS1-Virus wie angegeben infiziert. Zellen 10 Stunden nach der Infektion wurden in einem Fluoreszenzmikroskop mit Bezug auf die IRF-3-GFP-Lokalisierung analysiert. Der Prozentsatz der Zellen, die eine ausschließliche zytoplasmatische Lokalisierung (CYT) und sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisierungen von IRF-3 (Nuc+Cyt) aufwiesen, ist angegeben.

## 5. DETALLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0026]** Die Erfindung betrifft die Herstellung von abgeschwächten Influenza-Virus-Impfstoffen, wobei die Viren eine Mutation im NS1-Gen aufweisen, die die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären IFN-Reaktion verringert oder ausschaltet, mit der Maßgabe, dass die Viren keine Influenza-C-Viren sind.

**[0027]** Die Viren können aus natürlich vorkommenden Stämmen, Varianten oder Mutanten, mutagenisierten Viren (z.B. durch die Aussetzung an UV-Strahlung, Mutagene und/oder Passagieren), Neuzusammenstellern und/oder gentechnisch veränderten Viren ausgewählt sein. Beispielsweise können die Mutantenviren durch natürliche Variation, Aussetzen an UV-Strahlung, Aussetzen an chemische Mutagene, durch Passagieren in nichtpermissiven Wirten, durch Neuzusammenstellen (z.B. durch Koinfektion eines abgeschwächten Virus mit einem anderen Stamm, der die gewünschten Antigene aufweist) und/oder durch Gentechnik (z.B. unter Verwendung von "reverser Genetik") erzeugt werden. Die zur Verwendung bei der Erfindung ausgewählten Viren besitzen eine fehlerhafte IFN-Antagonistenaktivität und sind abgeschwächt, d.h. sie sind infektiös und können sich in vivo replizieren, erzeugen jedoch nur niedrige Titer, was zu einem subklinischen Infektionsniveau führt, das nicht pathogen ist. Solche abgeschwächten Viren sind ideale Kandidaten für Lebendimpfstoffe.

**[0028]** Die zur Verwendung bei der Erfindung ausgewählten, abgeschwächten Viren sollten eine starke IFN-Reaktion in dem Wirt induzieren können – ein Merkmal, das zu der Erzeugung einer starken Immunreaktion bei Verwendung als Impfstoff beiträgt und das andere biologische Konsequenzen hat, die die Viren als pharmazeutische Mittel für die Prävention und/oder Behandlung anderer viraler Infektionen oder der Tumorbildung bei Risikopersonen oder anderer Krankheiten, die mit IFN behandelt werden, brauchbar machen.

**[0029]** Die Erfindung basiert teilweise auf einer Reihe von Entdeckungen und Beobachtungen, die von den Anmeldern gemacht wurden, als sie mit Influenza-Virus-Mutanten gearbeitet haben.

**[0030]** Zunächst ist die IFN-Reaktion wichtig, um eine virale Infektion in vivo einzudämmen. Die Anmelder haben gefunden, dass das Wachstum des Wildtyp-Influenza-Virus A/WSN/33 bei IFN-defizienten Mäusen (STAT1-/-Mäusen) zu einer Panorganinfektion führte, d.h. die virale Infektion war nicht auf die Lungen wie bei Wildtyp-Mäusen beschränkt, die eine IFN-Reaktion erzeugen (Garcia-Sastre, et al., 1998, J. Virol. 72: 8550). Zweitens stellten die Anmelder fest, dass das NS1 des Influenza-Virus als IFN-Antagonist wirkt. Die Anmelder fanden heraus, dass ein Influenza-Virus-Mutant, der von dem gesamten NS1-Gen nicht deletiert ist (d.h. ein NS1-"Knockout") nicht zu hohen Titern in IFN-kompetenten Wirtszellen wachsen konnte und nur in IFN-defizienten Wirtszellen vermehrt werden konnte. Das NS1-Knockout-Virus wies einen abgeschwächten Phänotyp

auf (d.h. es war tödlich bei IFN-defizienten STAT1-/-Mäusen, jedoch nicht bei Wildtyp-Mäusen) und es wurde gefunden, dass es ein starker Induktor von IFN-Reaktionen in Wirtszellen war (Garcia-Sastre, et al., 1998, *Virology* 252: 324-330). Eine Präinfektion mit dem NS1-Knockout-Mutantenvirus verringerte die Titer von Wildtyp-Influenza- und anderen Viren (z.B. Sendai), die in embryonierten Eiern superinfiziert waren. Bei einem anderen Experiment verringerte die Infektion mit dem NS1-Knockout-Mutanten-Influenza-Virus die Herdbildung bei Tieren, die mit Tumorzellen inokuliert wurden. So wies das NS1-Knockout-Influenza-Virus interessante biologische Eigenschaften auf. Die NS1-Knockout-Mutantenviren konnten jedoch nicht in herkömmlichen Systemen für die Impfstoffherstellung vermehrt werden. Um dieses Problem zu lösen, verwendeten und entwickelten die Anmelder IFN-defiziente Systeme, die die Herstellung von annehmbaren Ausbeuten des abgeschwächten Virus gestatten.

**[0031]** Des weiteren konstruierten die Anmelder Deletionsmutanten von NS1, die nicht das gesamte Gen deletieren. Überraschenderweise wurde gefunden, dass diese NS1-Mutanten einen Zwischen-"Phänotyp" aufweisen – das Virus kann in herkömmlichen Wirten gezüchtet werden, die für das Vermehren des Influenza-Virus verwendet werden (obwohl das Wachstum in IFN-defizienten Systemen besser ist, die höhere Titer ergeben). Am wichtigsten ist, dass die Deletionsmutanten in vivo abgeschwächt werden und eine starke IFN-Reaktion induzieren. Die Impfung mit den verkürzten Influenza-Virus-NS1-Mutanten führte zu einem niedrigen Titer des Virus bei Tieren, die anschließend dem Wildtyp-Virus ausgesetzt wurden, und gewährten Schutz gegen Krankheit.

**[0032]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Substrate, die für das Isolieren, das Identifizieren und das Züchten von Viren für Impfstoffzwecke bestimmt sind. Insbesondere werden interferon-defiziente Substrate für das wirksame Züchten von Influenza-Virusmutanten beschrieben. Erfindungsgemäß ist ein interferon-defizientes Substrat eines, dessen Fähigkeit, Interferon zu erzeugen oder auf es zu reagieren, fehlerhaft ist.

**[0033]** Die abgeschwächten Viren können als Impfstoffe gegen zahlreiche Viren und/oder Antigene verwendet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Antigene von Stammvarianten, verschiedene Viren oder andere infektiöse Pathogene (z.B. Bakterien, Parasiten, Pilze) oder tumorspezifische Antigene. Die abgeschwächten Viren, die die virale Replikation und die Tumorbildung inhibieren, können für die Prophylaxe oder Behandlung von Infektionen (viralen oder nichtviralen Pathogenen) oder die Tumorbildung oder die Behandlung von Krankheiten, bei denen IFN von therapeutischem Nutzen ist, verwendet werden. Viele Verfahren können verwendet werden, um die abgeschwächten Lebendvirenformulierungen einem menschlichen oder tierischen Patienten zu verabreichen, um eine Immun- oder eine geeignete Zytokinantwort zu induzieren. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, intranasale, intratrachiale, orale, intradermale, intramuskuläre, intraperitoneale, intravenöse und subkutane Wege. Die abgeschwächten Viren der vorliegenden Erfindung könnten für eine intranasale Verabreichung formuliert werden

## 5.1 ERZEUGUNG VON MUTANTEN MIT GEÄNDERTER IFN-ANTAGONISTENAKTIVITÄT

**[0034]** Natürlich vorkommende Influenza-Mutanten oder -Varianten oder spontane Mutanten können ausgewählt werden, die eine beeinträchtigte Fähigkeit haben, die zelluläre IFN-Reaktion zu bekämpfen. Influenza-Mutantenviren können durch Aussetzen des Virus an Mutagene, wie ultraviolette Strahlung oder chemische Mutagene oder durch mehrere Passagen und/oder eine Passage in nichtpermissiven Wirten erzeugt werden. Ein Screening in einem differentiellen Züchtungssystem kann verwendet werden, um mit Bezug auf diejenigen Mutanten eine Auswahl zu treffen, die eine beeinträchtigte IFN-Antagonistenfunktion aufweisen. Der abgeschwächte Phänotyp kann durch Neuzusammenstellen auf einen anderen Stamm mit einem gewünschten Antigen transferiert werden (d.h. durch Koinfektion des abgeschwächten Virus und des gewünschten Stamms und Auswahl mit Bezug auf Neuzusammensteller, die beide Phänotypen aufweisen).

**[0035]** Mutationen können unter Verwendung von Ansätzen der "reversen Genetik" gentechnisch in das Influenza-Virus eingeführt werden. Auf diese Weise können natürliche oder andere Mutationen, die den abgeschwächten Phänotyp verleihen, gentechnisch in Impfstoffstämme eingeführt werden. Beispielsweise können Deletionen, Insertionen oder Substitutionen des codierenden Bereichs des Gens, das für die IFN-Antagonistenaktivität verantwortlich ist (des NS1 des Influenza-Virus) gentechnisch hergestellt werden. Auch Deletionen, Substitutionen oder Insertionen in dem nichtcodierenden Bereich des Gens, das für die IFN-Antagonistenaktivität verantwortlich ist, werden ins Auge gefasst. Zu diesem Zweck können Mutationen in den Signalen, die für die Transcription, Replikation, Polyadenylierung und/oder das Verpacken des Gens, das für die IFN-Antagonistenaktivität verantwortlich ist, genetisch hergestellt werden. Beispielsweise können bei dem Influenza-Virus solche Modifikationen umfassen, jedoch nicht beschränkt sein auf: die Substitution der nichtcodierenden Bereiche eines Influenza-A-Virusgens durch die nichtcodierenden Bereiche eines Influenza-B-Virusgens (Muster,

et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5177), den Austausch von Basenpaaren in den nichtcodierenden Bereichen eines Influenza-Virusgens (Fodor, et al., 1998, J. Virol. 72:6283), die Mutationen in dem Promotorbereich eines Influenza-Virusgens (Piccone, et al., 1993, Virus Res. 28:99; Li, et al., 1992, J. Virol. 66:4331), Substitutionen und Deletionen in dem Abschnitt der Uridinreste an dem 5'-Ende eines Influenza-Virusgens, die die Polyadenylierung beeinflussen (Luo, et al., 1991, J. Virol. 65:2861; Li, et al., J. Virol. 1994, 68:1245). Solche Mutationen, beispielsweise am Promotor, können die Expression des Gens herunterregulieren, das für die IFN-Antagonistenaktivität verantwortlich ist. Mutationen in viralen Genen, die die Expression des Gens regulieren können, das für die IFN-Antagonistenaktivität verantwortlich ist, liegen auch innerhalb des Umfangs von Viren, die erfindungsgemäß verwendet werden können.

**[0036]** Die Technik reverser Genetik umfasst die Herstellung von synthetischen rekombinanten viralen RNS, die nichtcodierende Bereiche der Virus-RNS enthalten, die für die Erkennung mittels viraler Polymerasen und für die Verpackung von Signalen wesentlich sind, die zur Erzeugung eines reifen Virions benötigt werden. Die rekombinanten RNS werden aus einer rekombinanten DNS-Matrize synthetisiert und in vitro mit einem gereinigten viralen Polymerasekomplex neu gebildet, um rekombinante Ribonucleoproteine (RNPs) zu bilden, die verwendet werden können, Zellen zu transfizieren. Eine wirksamere Transfektion wird erzielt, wenn die viralen Polymeraseproteine während der Transcription der synthetischen RNSs entweder in vitro oder in vivo vorhanden sind. Die synthetischen rekombinanten RNPs können in infektiöse Virusteilchen hinüber gerettet werden. Die vorstehend angegebenen Techniken sind beschrieben im US-Patent Nr. 5,166,057, erteilt am 24. November 1992; im US-Patent Nr. 5,854,037, erteilt am 29. Dezember 1998; in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 702 085 A1, veröffentlicht am 20. Februar 1996; in der US-Patentanmeldung Serial No. 09/152,845; in den internationalen Patentveröffentlichungen PCT WO 97/12032, veröffentlicht am 3. April 1997; WO 96/34625, veröffentlicht am 7. November 1996; in der europäischen Patentveröffentlichung EP-A-780 475; in der WO 99/02657, veröffentlicht am 21. Januar 1999; in der WO 98/53078, veröffentlicht am 26. November 1998; in der WO 98/02530, veröffentlicht am 22. Januar 1998; in der WO 99/15672, veröffentlicht am 1. April 1999; in der WO 98/13501, veröffentlicht am 2. April 1998; in der WO 97/06270, veröffentlicht am 20. Februar 1997; und in EPO 780 475 A1, veröffentlicht am 25. Juni 1997.

**[0037]** Abgeschwächte Viren, die mittels des Ansatzes reverser Genetik erzeugt werden, können bei den hier beschriebenen Impfstoff- und pharmazeutischen Formulierungen verwendet werden. Die Techniken reverser Genetik können auch verwendet werden, um zusätzliche Mutationen bei anderen viralen Genen, die für die Impfstoffherstellung wichtig sind, gentechnisch einzuführen, d.h. die Epitope von brauchbaren Impfstoffstammvarianten können in das abgeschwächte Virus gentechnisch eingebracht werden. Alternativ können vollständig fremde Epitope, einschließlich Antigenen, die von anderen viralen oder nichtviralen Pathogenen abgeleitet sind, gentechnisch in den abgeschwächten Stamm eingebracht werden. Beispielsweise können Antigene von nichtverwandten Viren wie HIV (gp160, gp120, gp41), Parasitenantigene (z.B. Malaria), bakterielle oder Pilzantigene oder Tumorantigene gentechnisch zu dem abgeschwächten Stamm verändert werden. Alternativ können Epitope, die den Tropismus des Virus in vivo verändern, in die abgeschwächten chimären Viren der Erfindung gentechnisch eingebracht werden.

**[0038]** Eine Kombination von Techniken der reversen Genetik und der Neuzusammenstelltechniken kann verwendet werden, um abgeschwächte Viren mit den gewünschten Epitopen in segmentierten RNS-Viren gentechnisch herzustellen. Beispielsweise können ein abgeschwächter Virus (durch natürliche Selektion, Mutagenese oder durch Techniken reverser Genetik erzeugt) und ein Stamm, der das gewünschte Impfstoffepitop trägt (durch natürliche Selektion, Mutagenese oder durch Techniken reverser Genetik erzeugt) in Wirten koinfiziert werden, die das Neuzusammenstellen der segmentierten Genome gestattet. Neuzusammensteller, die sowohl den abgeschwächten Phänotyp als auch das gewünschte Epitop aufweisen, können dann ausgewählt werden.

**[0039]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung von gentechnisch hergestellten Influenza-Viren, die Deletionen und/oder Verkürzungen des NS1-Genprodukts enthalten, mit der Maßgabe, dass die Viren nicht Influenza-C-Viren sind. NS1-Mutanten des Influenza-Virus A und B werden besonders bevorzugt. Bei einem Ansatz werden Abschnitte des amino-ständigen Bereichs des NS1-Genprodukts zurückbehalten, während Abschnitte des C-ständigen Bereichs des NS1-Genprodukts deletiert werden. Spezifische gewünschte Mutationen können über die Nucleinsäureinsertion, -deletion oder -mutation an dem geeigneten Codon gentechnisch verändert werden. Insbesondere weisen die verkürzten NS1-Proteine 1-60 Aminosäuren, 1-70 Aminosäuren, 1-80 Aminosäuren, 1-90 Aminosäuren (die N-ständige Aminosäure ist 1) und vorzugsweise 90 Aminosäuren; 1 bis 100 Aminosäuren vorzugsweise 99 Aminosäuren; 1-110 Aminosäuren, 1-120 Aminosäuren oder 1-130 Aminosäuren und vorzugsweise 124 Aminosäuren des Wildtyp-NS1-Genprodukts auf.

**[0040]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung von allen gentechnisch veränderten Influenza-Viren, die kein Influenza-C-Virus sind, bei denen das NS1-Genprodukt durch die Verkürzung oder Modifikation des NS1-Proteins modifiziert wurde, das den Mutantenviren die folgenden Phänotypen verleiht: die Fähigkeit der Viren, in nichtherkömmlichen Substraten wie 6 bis 7 Tage alten Hühnereiern auf hohe Titer zu wachsen, oder die Fähigkeit der Viren, eine Wirt-Interferonreaktion zu induzieren. Bei Influenza-A-Viren umfassen diese, sind jedoch nicht beschränkt auf: Viren mit NS1-Verkürzungen.

**[0041]** Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von natürlich vorkommenden Mutanten-Influenza-Viren A oder B mit dem abgeschwächten Phänotyp sowie Influenza-Virusstämme, die genetisch verändert wurden, um solche Mutationen zu enthalten, die für den abgeschwächten Phänotyp verantwortlich sind. Bei den Influenza-A-Viren umfassen diese, sind jedoch nicht beschränkt auf: Viren mit einem NS1 von 124 Aminosäuren (Norton et al., 1987, *Virology* 156: 204-213). Bei den Influenza-B-Viren umfassen diese, sind jedoch nicht beschränkt auf: Viren mit einem NS1-Verkürzungsmutanten mit 127 Aminosäuren, die von dem N-Terminus abgeleitet sind (B/201) (Norton et al., 1987, *Virology* 156: 204-213), und Viren mit einem NS1-Verkürzungsmutanten mit 90 Aminosäuren, die von dem N-Terminus abgeleitet sind (B/AWBY-234) (Tobita et al., 1990, *Virology* 174: 314-19). Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von natürlich vorkommenden Mutanten analog zu NS1/38, NS1/80, NS1/124 (Egorov, et al., 1998, *J. Virol.* 72 (8): 6437-41) sowie die natürlich vorkommenden Mutanten A/Turkey/ORE/71, B/201 oder B/AWBY-234.

**[0042]** Das abgeschwächte Influenza-Virus kann des weiteren gentechnisch hergestellt werden, um Antigene von anderen Impfstoffstämmen zu exprimieren (z.B. unter Verwendung von reverser Genetik oder Neuzusammenstellen). Alternativ können die abgeschwächten Influenza-Viren unter Verwendung von reverser Genetik oder Neuzusammenstellen mit gentechnisch hergestellten Viren gentechnisch hergestellt werden, um vollständig fremde Epitope, z.B. Antigene von anderen infektiösen Pathogenen, Tumorantigene oder Targeting-Antigene zu exprimieren. Da das NS RNS-Segment das kürzeste unter den acht viralen RNS ist, ist es möglich, dass die NS RNS längere Insertionen von heterologen Sequenzen als andere virale Gene zulässt. Des weiteren lenkt das NS RNS-Segment die Synthese eines hohen Gehalts an Protein in infizierten Zellen, was nahelegt, dass es ein ideales Segment für Insertionen von fremden Antigenen wäre. Erfindungsgemäß kann jedoch ein beliebiges der acht Segmente der Influenza-Viren für die Insertion der heterologen Sequenzen verwendet werden. Beispielsweise können dort, wo eine Oberflächenantigenpräsentation gewünscht wird, Segmente, die für strukturelle Proteine, z.B. HA oder NA, codieren, verwendet werden.

## 5.2 SELEKTIONSSYSTEM AUF DER GRUNDLAGE DER WIRTSRESTRIKTION

**[0043]** Die Verfahren des Auswählens von Influenza-Viren, die den gewünschten Phänotyp haben, d.h. Viren, die eine geringe oder keine IFN-Antagonistenaktivität aufweisen, gleichgültig ob sie aus natürlichen Varianten, spontanen Varianten (d.h. Varianten, die während der Virusvermehrung entstehen), mutagenisierten natürlichen Varianten, Neuzusammenstellern und/oder gentechnisch hergestellten Viren erhalten werden, können verwendet werden. Solche Viren werden am besten in differentiellen Wachstums-Assays, die das Wachstum in IFN-defizienten im Vergleich zu IFN-kompetenten Wirtssystemen vergleichen, gescreent. Viren, die ein besseres Wachstum in den IFN-defizienten Systemen im Vergleich zu IFN-kompetenten Systemen aufweisen, werden ausgewählt. Vorzugsweise werden Viren, die in IFN-defizienten Systemen zu Titern wachsen, die mindestens um ein Log höher sind, im Vergleich zu einem IFN-kompetenten System ausgewählt.

**[0044]** Alternativ können die Viren unter Verwendung von IFN-Assay-Systemen, z.B. auf Transcription basierenden Assay-Systemen, bei denen die Reporterexpression durch einen auf IFN ansprechenden Promotor gesteuert wird, gescreent werden. Die Reporterexpression in infizierten im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen kann gemessen werden, um Viren zu identifizieren, die wirksam eine IFN-Reaktion induzieren, die jedoch die IFN-Reaktion nicht bekämpfen können. Differentielle Wachstums-Assays können verwendet werden, um Viren mit dem gewünschten Phänotyp auszuwählen, da das verwendete Wirtssystem (IFN-kompetent im Vergleich zu IFN-defizient) den geeigneten Selektionsdruck zur Anwendung bringt.

**[0045]** Beispielsweise kann das Wachstum des Virus (wie mittels des Titers gemessen) in einer Vielzahl von Zell-, Zelllinien- oder Tiermodellsystemen, die IFN und die Komponenten der IFN-Reaktion im Vergleich zu Zell-, Zelllinien oder Tiermodellsystemen exprimieren, die mit Bezug auf IFN oder Komponenten der IFN-Reaktion defizient sind, verglichen werden. Für diesen Zweck kann das Wachstum des Virus in Zelllinien wie VERO-Zellen (die IFN-defizient sind) im Vergleich zu MDCK-Zellen (die IFN-kompetent sind) verglichen werden. Alternativ können IFN-defiziente Zelllinien aus Tieren gewonnen und festgelegt werden, die gezüchtet oder gentechnisch verändert wurden, um in dem IFN-System defizient zu sein (z.B. STAT1-/- Mutantenmäuse). Das Wachstum des Virus in solchen Zelllinien im Vergleich zu IFN-kompetenten Zellen, die beispielsweise von

Wildtyp-Tieren (z.B. Wildtyp-Mäusen) abgeleitet sind, kann gemessen werden. Zelllinien, die IFN-kompetent sind und von denen bekannt ist, dass sie das Wachstum des Wildtyp-Virus unterstützen, können gentechnisch verändert werden, damit sie IFN-defizient sind (z.B. durch Ausschalten von STAT1, IRF3, PKR usw.). Techniken, die im Stand der Technik für die Vermehrung von Viren in Zelllinien bekannt sind, können verwendet werden (siehe beispielsweise die nachstehenden Arbeitsbeispiele). Das Wachstum des Virus in der IFN-kompetenten Standard-Zelllinie im Vergleich zu der IFN-defizienten, gentechnisch hergestellten Zelllinie kann verglichen werden.

**[0046]** Auch Tiersysteme können verwendet werden. Beispielsweise kann für das Influenza-Virus das Wachstum in jungen, IFN-defizienten embryonierten Eiern, z.B. etwa 6 bis etwa 8 Tage alt, mit dem Wachstum in älteren, IFN-kompetenten Eiern, z.B. etwa 10 bis 12 Tage alt, verglichen werden. Für diesen Zweck können Techniken, die im Stand der Technik für die Infektion und Vermehrung in Eiern bekannt sind, verwendet werden (z.B. siehe nachstehende Arbeitsbeispiele). Alternativ kann das Wachstum in IFN-defizienten STAT1-/-Mäusen mit IFN-kompetenten Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Bei einer weiteren Alternative kann das Wachstum in IFN-defizienten embryonierten Eiern, hergestellt durch beispielsweise STAT1-/-transgenes Geflügel mit dem Wachstum in IFN-kompetenten Eiern, die von Wildtyp-Geflügel erzeugt werden, verglichen werden.

**[0047]** Für die Zwecke des Screenings können jedoch transiente IFN-defiziente Systeme statt gentechnisch manipulierter Systeme verwendet werden. Das Wirtssystem kann beispielsweise mit Verbindungen behandelt werden, die die IFN-Produktion und/oder Komponenten der IFN-Reaktion inhibieren (z.B. Medikamente, Antikörper gegen IFN, Antikörper gegen den IFN-Rezeptor, Inhibitoren von PKR, Antisense-Moleküle und Ribozyme usw.). Das Wachstum des Virus kann in IFN-kompetenten, unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu IFN-defizienten, behandelten Systemen verglichen werden. Beispielsweise können ältere Eier, die IFN-kompetent sind, mit solchen Medikamenten vor der Infektion mit dem zu screenenden Virus vorbehandelt werden. Das Wachstum wird mit demjenigen verglichen, das bei unbehandelten Kontrolleiern des gleichen Alters erreicht wird.

**[0048]** Die Screening-Verfahren stellen ein einfaches und leichtes Screening zur Verfügung, um Mutantenviren mit ausgeschalteter IFN-Antagonistenaktivität durch die Unfähigkeit des Mutantenvirus, in auf IFN ansprechenden Umgebungen zu wachsen, im Vergleich zu der Fähigkeit des Mutantenvirus, in IFN-defizienten Umgebungen zu wachsen, zu identifizieren. Die Screening-Verfahren können auch verwendet werden, um Mutantenviren mit geänderter, jedoch nicht ausgeschalteter IFN-Antagonistenaktivität durch Messen der Fähigkeit des Mutantenvirus, sowohl in auf IFN ansprechenden, z.B. 10 Tage alten, embryonierten Eiern oder MDCK-Zellen als auch in IFN-defizienten Umgebungen, z.B. 6 bis 7 Tage alten, embryonierten Eiern oder Vero-Zellen, zu wachsen, zu identifizieren. Beispielsweise nimmt man an, dass Influenza-Viren, die um mindestens einen Log niedrigere Titer in 10 Tage alten Eiern im Vergleich zu 6 bis 7 Tage alten Eiern aufweisen, in ihrer Fähigkeit, die IFN-Reaktion zu inhibieren, beeinträchtigt sind. Bei einem weiteren Beispiel geht man davon aus, dass Influenza-Viren, die einen um mindestens ein Log niedrigeren Titer in 12 Tage alten Eiern (die eine hohe IFN-Reaktion verursachen) im Vergleich zu 10 Tage alten Eiern (die eine mäßige IFN-Reaktion verursachen) aufweisen in ihrer Fähigkeit, die IFN-Reaktion zu bekämpfen, teilweise beeinträchtigt sind, und sie werden als attraktive Impfstoffkandidaten erachtet.

**[0049]** Die Auswahlverfahren umfassen auch das Identifizieren von denjenigen Mutantenviren, die IFN-Reaktionen induzieren. Gemäß den Auswahlverfahren kann das Induzieren von IFN-Reaktionen durch Untersuchen des Niveaus der IFN-Expression oder der Expression von Zielgenen oder Reportergenen gemessen werden, die durch die auf IFN folgende Infektion mit dem Mutantenvirus oder die Aktivierung von Transaktivatoren induziert wird, die an der IFN-Expression und/oder der IFN-Reaktion beteiligt sind.

**[0050]** Das Induzieren von IFN-Reaktionen kann durch Messen des phosphorylierten Zustands von Komponenten in dem IFN-Pfad nach der Infektion mit dem Test-Mutantenvirus, z.B. IRF-3, der in Reaktion auf die Doppelstrang-RNS phosphoryliert ist, bestimmt werden. In Reaktion auf den Typ I IFN, Jak1 Kinase und Tyk2 Kinase werden Untereinheiten des IFN-Rezeptors, STAT1 und STAT2, schnell tyrosinphosphoryliert. So werden, um zu bestimmen, um das Mutantenvirus IFN-Reaktionen induziert, Zellen wie 293 Zellen mit dem Test-Mutantenvirus infiziert, und nach der Infektion werden die Zellen lysiert. IFN-Pfadkomponenten wie Jak1 Kinase oder Tyk2 Kinase werden aus den infizierten Zellysaten unter Verwendung von spezifischen polyclonalen Seren oder Antikörpern immunpräzipitiert, und der tyrosinphosphorylierte Zustand der Kinase wird mittels Immun-Blotting-Assay mit einem Antiphosphotyrosin-Antikörper bestimmt (z.B. siehe Krishnan et al. 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298-305). Ein verbesserter phosphorylierter Zustand einer der Komponenten des IFN-Pfads nach der Infektion mit dem Mutantenvirus würde ein Induzieren der IFN-Reaktionen durch das Mutantenvirus angeben.

**[0051]** Die Auswahlssysteme können das Messen der Fähigkeit, spezifische DNS-Sequenzen zu binden, oder der Translokation von Transcriptionsfaktoren, die in Reaktion auf eine virale Infektion induziert werden, z.B. IRF3, STAT1, STAT2 usw., umfassen. Insbesondere werden STAT1 und STAT2 phosphoryliert und von dem Zytoplasma zu dem Nucleus in Reaktion auf IFN vom Typ I und transloziert. Die Fähigkeit, spezifische DNS-Sequenzen zu binden, oder der Translokation der Transcriptionsfaktoren kann mittels Techniken, die Fachleuten bekannt sind, gemessen werden, z.B. Elektromobilitäts-Gel-Shift-Assays, Zellfärben usw.

**[0052]** Das Induzieren von IFN-Reaktionen kann durch Messen der IFN-abhängigen Transcriptionsaktivierung nach der Infektion mit dem Test-Mutantenvirus bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform kann die Expression von Genen, von der bekannt ist, dass sie durch IFN, z.B. Mx, PKR, 2-5-Oligoadenylatsynthetase, Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I usw. induziert wird, mittels Techniken analysiert werden, die Fachleuten bekannt sind (z.B. Northern Blotting, Western Blotting, PCR usw.). Alternativ werden Testzellen wie humane embryonische Nierenzellen oder humane osteogene Sarkoma-Zellen gentechnisch verändert, um Reporter gene wie das Luciferase-Reportergen oder das Chloramphenicoltransferase-(CAT-)Reportergen unter der Kontrolle eines interferonstimulierten Reaktionselements wie dem IFN-stimulierten Promotor des ISG-54K-Gens (Bluyssen et al., 1994, Eur. J. Biochem. 220: 395-402) vorübergehend oder konstitutiv zu exprimieren. Zellen werden mit dem Test-Mutantenvirus infiziert, und das Niveau der Expression des Reportergens wird mit demjenigen bei nichtinfizierten Zellen oder mit dem Wildtyp-Virus infizierten Zellen verglichen. Eine Erhöhung des Niveaus der Expression des Reportergens nach der Infektion mit dem Testvirus würde angeben, dass das Test-Mutantenvirus eine IFN-Reaktion induziert.

**[0053]** Die Selektionssysteme können das Messen des IFN-Induzierens durch Bestimmen, ob ein Extrakt aus der Zelle oder dem Ei, die bzw. das mit dem Test-Mutantenvirus infiziert ist, eine Schutzaktivität gegen eine virale Infektion verleihen kann, umfassen. Insbesondere werden Gruppen von 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern mit dem Test-Mutantenvirus oder dem Wildtyp-Virus infiziert. Etwa 15 bis 20 Stunden nach der Infektion wird das Allantoisfluid geerntet und mit Bezug auf die IFN-Aktivität getestet, indem die höchste Verdünnung mit Schutzaktivität gegen eine VSV-Infektion in Gewebekulturzellen wie CEF-Zellen bestimmt wird.

### 5.3 VERMEHRUNG DES VIRUS IN INTERFERON-DEFIZIENTEN WACHSTUMSSUBSTRATEN

**[0054]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Substrate für die Vermehrung von Influenza-Viren. Die Erfindung betrifft IFN-defiziente Substrate und Verfahren für das Vermehren von Viren in diesen Substraten. Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren des Vermehrens von Viren in unreifen embryonierten, sechs bis neun Tage alten Eiern, die aufgrund ihres zerbrechlichen Zustands und der kleineren Allantoishöhle normalerweise nicht zum Züchten von Viren verwendet werden. Erfindungsgemäß umfassen unreife embryonierte Eier sechs bis neun Tage alte Eier.

**[0055]** Gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung werden die Viren, die in unreifen embryonierten Eiern gezüchtet werden können, aus natürlich vorkommenden Stämmen, Varianten oder Mutanten, mutagenisierten Viren, Neuzusammenstellern und/oder gentechnisch hergestellten Viren ausgewählt. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen das Züchten der Viren in sechs bis neun Tage alten Eiern, vorzugsweise unter Verwendung von geeigneten Züchtungsbedingungen (siehe z.B. die Züchtungsbedingungen, die in dem nachstehend angegebenen Abschnitt 6 angegeben sind) und das Sammeln des Nachkommenvirus. Die erfindungsgemäßen Verfahren, die das Züchten der Viren in unreifen embryonierten, sechs bis neun Tage alten Eiern umfassen, sind für das Züchten von Viren, die besonders zur Verwendung bei Impfstoffformulierungen geeignet sind, besonders geeignet.

**[0056]** Die Erfindung umfasst auch Verfahren und IFN-defiziente Substrate für das Züchten und Isolieren von natürlich vorkommenden oder gentechnisch hergestellten Mutantenviren mit einer geänderten IFN-Antagonistenaktivität. Die IFN-defizienten Substrate, die verwendet werden können, um das Züchten der abgeschwächten Mutantenviren zu unterstützen, sind Zelllinien oder unreife embryonierte, sechs bis neun Tage alte Eier, die IFN-defizient sind, mit der Maßgabe, dass die Zelllinien keine Vero-Zellen sind und keine STAT(-)-Zelllinien sind, z.B. rekombinante Zellen oder Zelllinien, die gentechnisch verändert wurden, um IFN-defizient zu sein, oder embryonierte Eier, die von IFN-defizienten Vögeln, insbesondere Geflügel (z.B. Hühnern, Enten, Truthähnen) erhalten werden, einschließlich Beständen, die zu IFN-defizienten oder transgenen Vögeln gezüchtet werden (z.B. STAT1 Knockouts). Diese Zelllinien oder Eier können gentechnisch verändert werden, um Transgene zu exprimieren, die für Inhibitoren des IFN-Systems, z.B. dominant-negative Mutanten, Antisense-RNS, Ribozyme, Inhibitoren der IFN-Produktion, Inhibitoren der IFN-Signalgebung und/oder Inhibitoren von antiviralen Genen, die durch IFN induziert werden, codieren. Alternativ können diese Zelllinien oder Eier mit einer Verbindung behandelt werden, die die IFN-Produktion und/oder den IFN-Pfad inhibiert, z.B. Medikamente, Anti-

körper, Antisense-Moleküle, Ribozymmoleküle, die auf das STAT1-Gen zielgerichtet sind und/oder durch IFN induzierte, antivirale Gene inhibieren.

**[0057]** Erfindungsgemäß umfassen unreife embryonierte Hühnereier Eier, die auf natürliche Weise sechs bis neun Tage alt sind.

### 5.3.1 NATÜRLICHE IFN-DEFIZIENTE SUBSTRATE

**[0058]** In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung das Züchten von natürlich vorkommenden und gentechnisch veränderten Influenza-Mutantenviren in nichtherkömmlichen Substraten wie unreifen embryonierten Eiern, die noch kein IFN-System entwickelt haben. Unreife embryonierte Eier werden normalerweise aufgrund ihres zerbrechlichen Zustands und des kleineren Allantoisvolumens nicht zum Züchten von Viren verwendet. Die vorliegende Erfindung umfasst das Züchten von Mutantenviren in embryonierten, sechs bis neun Tage alten Eiern, vorzugsweise das Züchten des mutierten Virus in 8 Tage alten, embryonierten Eiern und am meisten bevorzugt in 6 bis 8 Tage alten Eiern.

**[0059]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren des Züchtens und Isolierens von mutierten Influenza-Viren mit einer geänderten IFN-Antagonistenaktivität in Zellen und Zelllinien, die von Natur aus keinen IFN-Pfad oder einen defizienten IFN-Pfad oder eine Defizienz des IFN-Systems, z.B. ein niedriges Niveau der IFN-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Zellen aufweisen.

### 5.3.2 GENTECHNISCH HERGESTELLTE IFN-DEFIZIENTE SUBSTRATE

**[0060]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Züchten und Isolieren von mutierten Influenza-Viren mit geänderter IFN-Antagonistenaktivität in einem gentechnisch hergestellten, IFN-defizienten Substrat. Bei einer weiteren Ausführungsform können die Zelllinien gentechnisch verändert werden, um IFN-defizient zu sein. Die vorliegende Erfindung umfasst Zelllinien, bei denen ein Gen, das für die IFN-Synthese oder den IFN-Pfad wesentlich ist, und/oder ein antivirales Gen oder antivirale Gene, die durch IFN induziert werden, mutiert ist.

**[0061]** Die Erfindung stellt rekombinante Zelllinien zur Verfügung, bei denen ein oder mehr Gene, die für den IFN-Pfad wesentlich ist bzw. sind, z.B. Interferon-Rezeptor usw., gespalten wurde(n), d.h. ein "Knockout" ist. Eine solche Zelllinie kann durch ein beliebiges im Stand der Technik bekanntes Verfahren für das Spalten eines Gens auf dem Chromosom der Zelle oder des Tiers erzeugt werden. Solche Techniken umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, pronucleäre Mikroinjektion (Hoppe & Wagner, 1989, US-Patent Nr. 4,873,191); einen retrovirusvermittelten Gentransfer in Keimzellen (Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152); Gen-Targeting in embryonischen Stammzellen (Thompson et al., 1989, Cell 56: 313); Elektroporation von Embryos (Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1803); und einen spermavermittelten Gentransfer (Lavitano et al., 1989, Cell 57: 717) usw. Bezüglich eines Überblicks über solche Techniken siehe Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171.

**[0062]** Homologe Rekombinationsverfahren für das Spalten von Genen in dem Mausgenom werden beispielsweise in Capecchi (1989, Science 244: 1288) und Mansour et al. (1988, Nature 336: 348-352) beschrieben.

### 5.3.3 TRANSIENTE IFN-DEFIZIENTE SUBSTRATE

**[0063]** Die Zelllinien oder Eier können mit Verbindungen vorbehandelt werden, die das IFN-System inhibieren. Erfindungsgemäß können Verbindungen, die die Synthese von IFN oder die Aktivität oder die Expression der Komponenten des IFN-Systems hemmen, verwendet werden, um Wirte vorzubehandeln, z.B. Verbindungen, die die Synthese von IFN, die Aktivität von IFN, den IFN-Rezeptor, andere Ziele in dem IFN-Signaltransduktionspfad inhibieren oder die die Aktivität von antiviralen Genen inhibieren, die von IFN induziert werden. Beispiele von Verbindungen, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt, auf Nucleinsäuremoleküle, Antikörper, Peptide, Antagonisten des IFN-Rezeptors, Inhibitoren des STAT1-Pfads, Inhibitoren von PKR usw. Erfindungsgemäß umfassen Nucleinsäuremoleküle Antisense-Moleküle, Ribozyme und Dreifachhelixmoleküle, die Gene zielgerichtet anvisieren, die für wesentliche Komponenten des IFN-Systems, z.B. STAT1, codieren. Nucleinsäuremoleküle umfassen auch Nucleotide, die für dominante negative Mutanten der Komponenten des IFN-Systems codieren, z.B. vor der Infektion mit dem viralen Mutanten können die Zellen mit einer DNS transfiziert werden, die für einen verkürzten, signalgebenden inkompetenten Mutanten des IFN-Rezeptors codiert.

**[0064]** Dominant-negative Mutanten, die erfindungsgemäß verwendet werden können, um den IFN-Pfad zu inhibieren, umfassen kinase-defiziente Versionen von Jak1, Tyk2 oder Transkriptionsfaktoren, denen die DNS-Bindungsdomänen STAT1 und STAT2 fehlen (siehe z.B. Krishnan et al., 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298-305).

## 6. BEISPIEL: ERZEUGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NS1-VERKÜRZUNGSMUTANTEN DES INFLUENZA-A-VIRUS

### 6.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

**[0065]** Das Influenza-A/PR/8/34-(PR8-)Virus wurde in 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern bei 37°C vermehrt. Das Influenza-A-Virus 25 A-1, ein Neuzusammenstellvirus, das das NS-Segment von dem kälteangepassten Stamm A/Leningrad/134/47/57 und den verbleibenden Genen vom PR8-Virus enthielt (Egorov et al., 1994, Vopr. Virusol. 39: 201-205; Shaw et al., 1996, in Options of the control of influenza III, Herausgeber Brown, Hampson Webster (Elsevier Science) Seiten 433-436), wurde in Vero-Zellen bei 34°C gezüchtet. Das 25A-1-Virus ist in Säugerzellen temperaturempfindlich und wurde als Helfervirus für die Rettung des NS1/99 Transfektionsvirus verwendet. Vero-Zellen und MDCK-Zellen, die in einem minimalen essentiellen Medium (MEM) gehalten wurden, das 1 µg/ml Trypsin (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) enthielt, wurden für das Züchten des Influenza-Virus verwendet. Die Vero-Zellen wurden auch für die Selektion, die Plaque-Reinigung und Titrierung des NS1/99-Virus verwendet. MDCK-Zellen wurden in DMEM (Dubeccos minimalem essentiellen Medium) gehalten, das 10% mittels Hitze inaktiviertes, fötales Kalbserum enthielt. Vero-Zellen wurden in AIM-V Medium (Life Technologies, Grand Island, NY) gezüchtet.

**[0066]** Das Plasmid pT3NS1/99, das eine C-ständig verkürzte Form des NS1 mit 99 Aminosäuren enthielt, wurde wie folgt hergestellt. Zunächst wurde pUC19-T3/NS PR8, das das vollständige NS-Gen des PR8-Virus, der von dem T3-RNS-Polymerasepromotor und der BpuAI-Restriktionsschnittstelle flankiert war, enthielt, mittels reverser PCR (Ochman et al., 1988, Genetics 120: 621-623) unter Verwendung der geeigneten Primer amplifiziert. Die erhaltene cDNS, die so das verkürzte NS1-Gen enthielt, wurde phosphoryliert, nach Klenow behandelt, selbstligasiert und im E. coli Stamm TG1 vermehrt. Das nach der Reinigung erhaltene Konstrukt wurde pT3NS1/99 genannt und mittels Sequenzierung verifiziert. Plasmide für die Expression von NP-, PB1-, PB2- und PA-Proteinen des PR8-Virus (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2 und pHMG-PA) wurden früher beschrieben (Pleschka et al., 1996, J. Virol. 70: 4188-4192). pPOLI-NS-RB wurde durch Substituieren des offenen CAT-Leserasters von pPOLI-CAT-RT (Pleschka et al., 1996, J. Virol. 70: 4188-4192) innerhalb des RT-PCR-Produkts, das von dem codierten Bereich des NS-Gens des Influenza A/WSN/33-(WSN-)Virus abgeleitet war, hergestellt.

**[0067]** Dieses Plasmid exprimiert das NS-spezifische virale RNS-Segment des WSN-Virus unter der Kontrolle eines verkürzten, humanen Polymerase-I-Promotors.

**[0068]** Die Erzeugung des NS1/99-Virus wurde mittels Ribonucleoprotein-(RNP-)Transfektion (Luytjes et al., 1989, Cell 59: 1107-1113) durchgeführt. Die RNPs wurden mittels der T3 RNS-Polymerasetranskription aus T3NS1/99 gebildet, das mit BpuAI in Gegenwart des gereinigten Nucleoproteins und Polymerase des Influenza-25A-1-Virus linearisiert war (Enami, et al., 1991, J. Virol. 65: 2711-2713). RNP-Komplexe wurden in Vero-Zellen transfiziert, die zuvor mit dem 25A-1-Virus infiziert worden waren. Transfizierte Zellen wurden 18 Stunden bei 37°C inkubiert, und der Überstand wurde zweimal in Vero-Zellen bei 40°C passagiert und Plaque, die dreimal in Vero-Zellen, die mit mit Agar überzogenem Medium bei 37°C bedeckt waren, gereinigt wurde, passagiert. Der isolierte NS1/99-Virus wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen Primern analysiert. Das Wildtyp-Transfektionsvirus wurde wie folgt erzeugt. Vero-Zellen in 35 mm Schalen wurden mit Plasmiden pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA und pPOLI-NS-RB, wie vorstehend beschrieben (Pleschka et al., 1996, J. Virol. 70: 4188-4192), transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Zellen mit  $5 \times 10^4$  pfu des delNS1-Virus infiziert und zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert. Der Zellüberstand wurde einmal in MDCK-Zellen und zweimal in embryonierten Hühnereiern passagiert. Transfektionsviren wurde durch Begrenzung der Verdünnung in Eiern geclont. Genomische RNS aus dem gereinigten NS1/99-Transfektionsvirus wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese wie vorstehend beschrieben (Zheng et al., 1996, Virology 217: 242-251) analysiert. Die Expression eines verkürzten NS1-Proteins mittels des NS1/99-Virus wurde mittels Immunpräzipitieren von markierten infizierten Zellextrakten unter Verwendung eines polyclonalen Kaninchenantiserums gegen NS1 verifiziert.

**[0069]** Die Allantoishöhle der embryonierten Hühnereier, die 6, 10 und 14 Tage alt waren, wurde mit etwa  $10^3$  pfu PR8-, NS1/99- oder delNS1-(bei denen das gesamte NS1-Gen deletiert ist)Viren, die zwei Tage bei 37°C

inkubiert wurden, inokuliert, und die in dem Allantoisfluid vorhandenen Viren wurden mittels Hämagglutination-(HA-)Assay titriert.

**[0070]** Gruppen von 5 BALB/c-Mäusen (Taconic Farms) wurden intranasal mit  $5 \times 10^6$  pfu,  $1,5 \times 10^5$  pfu oder  $5 \times 10^3$  pfu des Wildtyp-A/PR/8/34-(PR8-) oder NS1/99-Virus inokuliert. Die Inokulationen wurden unter Anästhesie unter Verwendung von 50 µl MEM durchgeführt, das die geeignete Anzahl von plaquebildenden Einheiten des geeigneten Virus enthielt. Die Tiere wurden täglich überwacht und getötet, wenn beobachtet wurde, dass sie in extremis waren. Bei einem späteren Experiment wurden alle überlebenden Mäuse vier Wochen später einer Dosis von 100 LD<sub>50</sub> des Wildtyp-PR8-Virus ausgesetzt. Alle Verfahren wurden in Übereinstimmung mit den NIH-Richtlinien über die Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt.

## 6.2 ERGEBNISSE: ABSCHWÄCHUNG VON INFLUENZA-A-VIREN DURCH NS1-DELETIONEN

**[0071]** Die Anmelder haben vorstehend gezeigt, dass ein Influenza-A-Virus, bei dem das NS1-Gen deletiert war (delNS1-Virus) in Zellen, die bezüglich der Erzeugung des Typ I Interferons (IFN) defizient sind, wie Vero-Zellen zu Titern von etwa  $10^7$  pfu/ml wachsen kann. Dieses Virus war jedoch in seiner Fähigkeit, sich zu replizieren und eine Krankheit bei Mäusen hervorzurufen, beeinträchtigt (Garcia-Sastre et al., 1998, *Virology* 252: 324). Im Gegensatz hierzu konnte das delNS1-Virus in STAT1-/-Mäusen wachsen und diese töten. Diese Ergebnisse zeigten, dass das NS1-Protein des Influenza-A-Virus ein Virulenzfaktor ist, der an der Inhibition der antiviralen Wirtsreaktionen beteiligt ist, die durch das Typ I IFN vermittelt werden. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob Influenza-Viren mit Virulenzcharakteristiken erzeugt werden können, die zwischen dem Wildtyp- und dem delNS1-Virus liegen, indem Abschnitte des NS1-Gens deletiert werden, und ob einige dieser Viren optimale Charakteristiken haben könnten, damit sie als abgeschwächte Lebendimpfstoffe gegen Influenza-Viren verwendet werden können, d.h. Stabilität und ein geeignetes Gleichgewicht zwischen Abschwächung, Immunogenizität und Wachstum in Substraten, die für die Impfstoffherstellung geeignet sind, wie embryonierten Hühnereiern.

**[0072]** Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Influenza-A/PR/8/34-(PR8-)Virus erzeugt, bei dem das NS1-Gen modifiziert worden war, um die Expression eines verkürzten NS1-Proteins zu lenken, das nur 99 Aminosäuren an dem Amino-Terminal gemeinsam mit den 230 Aminosäuren des Wildtyp-NS1-Proteins hat. Dieses Virus (NS1-99) wurde mittels RNP-Transfektion eines künstlich gentechnisch hergestellten NS-Gens unter Verwendung eines 25A1-Helfervirus wie vorstehend beschrieben erhalten (Garcia-Sastre et al., 1998, *Virology* 252: 324). Die Analyse der NS1-Expression in mit Virus infizierten Zellen lässt die abgekürzte Natur des NS1-Proteins des NS1-99-Virus erkennen.

**[0073]** Die Fähigkeit der delNS1-, NS1-99- und Wildtyp-PR8-Viren, in embryonierten Hühnereiern unterschiedlichen Alters zu wachsen, wurde analysiert. Die logische Grundlage für dieses Experiment basiert auf der Tatsache, dass die Fähigkeit von embryonierten Eiern, das Typ I IFN unter einem geeigneten Stimulus zu synthetisieren und auf es zu reagieren, altersabhängig ist. Tatsächlich beginnen sowohl die IFN-Induzierbarkeit als auch die Reaktionsfähigkeit im Alter von etwa 10 Tagen und sie nehmen dann exponentiell mit dem Alter zu (Sekellick et al., 1990, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 997; Sekellick & Marcus, 1985, *J. Interferon Res.* 5: 657). So stellt die Verwendung von Eiern unterschiedlichen Alters ein einzigartiges System dar, um die Fähigkeit der verschiedenen Viren, IFN-Reaktionen zu inhibieren, zu testen. Eier im Alter von 6, 10 und 14 Tagen wurden mit etwa  $10^3$  pfu von PR8-, NS1-99 oder delNS1-Viren inokuliert, die 2 Tage bei 37°C inkubiert worden waren, und die in dem Allantoisfluid vorhandenen Viren wurden mittels des Hämagglutinations-(HA-)Assays titriert. Wie in Tabelle 3 gezeigt, replizierte sich das delNS1, obgleich das Wildtyp-Virus zu ähnlichen HA-Titern in 6, 10 und 14 Tage alten embryonierten Eiern wuchs, nur zu einem feststellbaren HA-Titer in 6 Tage alten Eiern. Im Gegensatz hierzu zeigte das NS1-99-Virus ein Zwischenverhalten zwischen dem delNS1- und dem Wildtyp-Virus und konnte in 10 Tage alten Eiern, jedoch nicht in 14 Tage alten Eiern, zu HA-Titern wachsen, die ähnlich denjenigen des Wildtyp-Virus waren

Tabelle 3: Virusreplikation in embryonierten Hühnereiern

Virus	Alter der Eier:	Hämagglutinationstiter <sup>1</sup>		
		6 Tage	10 Tage	14 Tage
WT PR8 <sup>2</sup>		2,048	4,096	1,071
NS1/99		N.D. <sup>3</sup>	2,048	<2
deINS1		64	<2	<2

<sup>1</sup> Titer stellen die höchste Verdünnung mit Hämagglutinationsaktivität dar.

<sup>2</sup> Wildtyp-Influenza-A/PR/8/34-Virus.

<sup>3</sup> Nicht bestimmt.

**[0074]** Die Abschwächungscharakteristiken des NS1-99-Virus wurden als nächstes in Mäusen bestimmt. Für diesen Zweck wurden Gruppen von 5 BALB/c-Mäusen intranasal mit  $5 \times 10^6$  pfu,  $1,5 \times 10^5$  oder  $1,5 \times 10^3$  pfu des Wildtyp-PR8- oder NS1-99-Virus infiziert. Die Mäuse wurden dann 3 Wochen mit Bezug auf das Überleben beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben. Das NS1-99-Virus hatte ein LD<sub>50</sub>, das mindestens 3 Log höher war, als dasjenige des Wildtyp-Virus.

Tabelle 4: Abschwächung des NS1-99-Virus bei Mäusen

Virus	Infizierende Dosis (pfu):	Überlebende		
		$5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$5 \times 10^3$
WTPR8 <sup>1</sup>		1/5	1/5	1/5
NS1-99		3/5	5/5	5/5

<sup>1</sup> Wildtyp-Influenza-Virus-A/PR/8/34

## 7. BEISPIEL: DIE ERZEUGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NS1-VERKÜRZTEN MUTANTEN IM INFLUENZA-B-VIRUS

### 7.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

**[0075]** Die experimentellen Details sind ähnlich denjenigen in Abschnitt 6.1. Zwei Mutanten-Influenza-B-Viren, B/610B5B/201 (B/201) und B/AWBY-234, die 127 Aminosäuren bzw. 90 Aminosäuren lang waren (C-ständig verkürzte NS1-Proteine) (Norton et al., 1987 Virology 156: 204; Tobita et al., 1990 Virology 174: 314) wurden aus Koinfektions-Experimenten in Gewebekulturen, an denen B/Yamagata/1/73-(B/Yam-) und A/Aichi/2/68-Viren beteiligt waren, in Gegenwart eines anti-A-(H3N2-)Virus-Antikörpers gewonnen. Das Wachstum der Mutanten-Influenza-Viren in embryonierten Eiern verschiedenen Alters wurde mit demjenigen des Parentalvirus B/YAM verglichen, das ein Wildtyp-NS1-Protein mit 281 Aminosäuren besitzt. 6, 10 und 14 Tage alte Eier wurden mit etwa  $10^3$  pfu B/Yam-, B/201- oder B/AW/BY-234-Viren inokuliert, die 2 Tage bei 35°C inkubiert worden waren, und die in dem Allantoisfluid vorhandenen Viren wurden mittels eines HA-Assays titriert.

**[0076]** Des Weiteren wurden die Abschwächungscharakteristiken der B/201- und B/AWBY-234-Viren in Mäusen bestimmt. Gruppen von drei BALB/c-Mäusen wurden intranasal mit  $3 \times 10^5$  pfu der Wildtyp-B/YAM-, B/201- oder B/AWBY/234-Mutantenviren infiziert, und die Fähigkeit dieser Viren, sich zu replizieren, wurde durch Messen der viralen Titer in den Lungen am Tag 3 nach der Infektion bestimmt, da das Wildtyp-B/YAM bei Mäusen

keine offensichtlichen Krankheitssymptome induziert.

## 7.2 ERGEBNISSE

Tabelle 5: Influenza-B-Virus-Replikation in embryonierten Hühnereiern

Virus	Alter der Eier:	Hämagglutinationstiter		
		6 Tage	10 Tage	14 Tage
B/Yam		362	256	<2
B/201		32	<2	<2
B/AWBY-234		8	<2	<2

**[0077]** Die Ergebnisse aus dem Wachstum der Mutanten- und Wildtyp-Influenza-B-Viren in embryonierten Hühnereiern, die in Tabelle 5 aufgeführt sind, zeigen, dass wie im Fall der Influenza-A-Viren, eine carboxyständige Verkürzung des NS1 des Influenza-B-Virus für eine geringere Replikationsausbeute in älteren, embryonierten Hühnereiern verantwortlich ist, die eine wirksame IFN-Reaktion induzieren. Diese Erkenntnis gibt an, dass das NS1 des Influenza-B-Virus auch an dem Inhibieren der IFN-Reaktionen des Wirts beteiligt ist und dass Deletionen an dem NS1-Gen des Influenza-B-Virus zu einem abgeschwächten Phänotyp führen.

**[0078]** Die Ergebnisse aus den Replikationsexperimenten bei Mäusen sind in Tabelle 6 angegeben. B/201- und B/AWBY-234-Virustiter waren um etwa drei Log der Größenordnung niedriger als B/YAM-Titer, was angibt, dass Verkürzungen der carboxyständigen Domäne des NS-1 des Influenza-B-Virus für einen abgeschwächten Phänotyp bei Mäusen verantwortlich sind.

Tabelle 6: Influenza-B-Virus-Replikation in Mäuselungen

Virus	Lungentiter am Tag 3 nach der Infektion (pfu/Lunge)		
	B/Yam	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
B/201	30	<10	60
B/AWBY-234	<10	40	<10

### 8. SCHUTZ GEGEN WILDTYP-INFLUENZA-VIRUS-INFEKTION BEI MÄUSEN, DIE MIT INFLUENZA-A- UND -B-VIREN IMMUNISIERT SIND, DIE DELETIONEN IN IHREN NS1-PROTEINEN ENTHALTEN

**[0079]** Um zu bestimmen, ob Mäuse, die mit den abgeschwächten Influenza-A- und -B-Viren immunisiert sind, die verkürzte NS-1-Proteine enthalten, gegen eine Aussetzung mit ihren jeweiligen Wildtyp-Viren geschützt wurden, wurde das folgende Experiment durchgeführt. BALB/C-Mäuse wurden intranasal mit dem A/NS1-99-Virus immunisiert und drei Wochen später mit 100 LD<sub>50</sub> des Wildtyp-Influenza-A/PR/8/34-Virus infiziert. Immunisierte Tiere waren gegen den Tod geschützt, während alle kontrollnaiven Mäuse nach der Aussetzung starben (siehe Tabelle 7). Bei einem zweiten Experiment wurden BALB/c-Mäuse intranasal mit den Influenza-B-Viren B/201 oder B/AWBY-234 immunisiert, die verkürzte NS1-Proteine exprimierten. Drei Wochen später wurden die Mäuse  $3 \times 10^5$  pfu des Wildtyp-Influenza-B/Yam/1/73-Virus ausgesetzt. Da dieser Stamm des Influenza-B-Virus bei Mäusen keine Krankheitssymptome induziert, wurde der Grad des Schutzes durch Messen der Virustiter in der Lunge am Tag 3 nach der Aussetzung bestimmt.

**[0080]** Während kontrollnaive Tiere Titer von etwa  $10^4$  pfu/Lunge aufwiesen, wurden keine Viren in den Lungen von immunisierten Tieren festgestellt (siehe Tabelle 8). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass das Influenza-A- sowie das Influenza-B-Virus, die modifizierte NS1-Gene enthalten, eine Immunantwort bei Mäusen indu-

zieren können, die gegen eine spätere Aussetzung an den Wildtyp-Virus vollständig schützt.

Tabelle 7. Überleben von Mäusen, die mit dem Influenza-A/NS1-99-Virus immunisiert wurden, nach Aussetzen an 100 LD<sub>50</sub> des Wildtyp-Influenza-A-/PR/8/34-Virus

Immunisierende Dosis des A/NS1-99-Virus	Anzahl der Überlebenden/Insgesamt
5x10 <sup>6</sup> pfu	3/3
1,5x10 <sup>5</sup> pfu	4/4
PBS	0/5

Tabelle B. Lungentiter bei Mäusen, die mit dem Influenza-B/201- und B/AWBY-234-Virus immunisiert wurden, nach Aussetzung an 3 × 10<sup>5</sup> pfu des Wildtyp-Influenza-B/Yamagata/73-Virus

Immunisierende Dosis	Lungentiter (pfu/Lunge)
3x10 <sup>5</sup> pfu des B/201	<10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup>
3x10 <sup>5</sup> pfu des B/AWBY-234	<10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup> , <10 <sup>1</sup>
PBS	2,5x10 <sup>4</sup> , 1x10 <sup>4</sup> , 1,7x10 <sup>4</sup> , 3x10 <sup>4</sup> , 5x10 <sup>4</sup>

#### 9. BEISPIEL: INDUKTION DES TYP I INTERFERONS IN EMBRYONIERTEN EIERN, DIE MIT DEM delNS1-VIRUS INFIZIERT WURDEN

**[0081]** Die Fähigkeit des delNS1-Virus, einem Influenza-A-Virus, dem das NS1-Gen fehlt, die Typ I IFN-Sekretion in embryonierten Hühnereiern zu induzieren, wurde als nächstes bestimmt. Für diesen Zweck wurden Gruppen von zwei 10 Tage alten, embryonierten Hühnereiern mit 5 × 10<sup>3</sup> pfu des delNS1- oder Wildtyp-PR8-Virus infiziert. Achtzehn Stunden nach der Inkubation bei 37°C wurde das Allantoisfluid geerntet und gegen Säure-pH über Nacht dialysiert, um infektiöse Viren zu inaktivieren. Nach der Säure-pH-Behandlung wurden Proben gegen PBS dialysiert und mit Bezug auf die IFN-Aktivität durch Bestimmen der höchsten Verdünnung mit Schutzaktivität gegen eine VSV-Infektion (etwa 200 pfu) in CEF-Zellen getestet. Die in Tabelle 9 gezeigten Ergebnisse geben an, dass wenn NS1 fehlt, die Influenza-A-Viren höhere Induktoren von IFN sind.

Tabelle 9. Induktion von IFN in Eiern.

Virus	IFN (U/ml)
PR8	<16, <16
delNS1	400,400
Mock	<16, <16

#### 10. BEISPIEL: ANTIVIRALE AKTIVITÄT DES delNS1-VIRUS

**[0082]** Das Eliminieren des IFN-Antagonisten-(NS1-)Gens aus dem Influenza-A-Virus kann zu einem Virus führen, der die Fähigkeit hat, ein hohes Niveau an IFN zu induzieren. Falls dies der Fall ist, "stört" das delNS1-Virus die Replikation der IFN-empfindlichen Viren. Um diese Möglichkeit zu testen, untersuchten die

Anmelder die Fähigkeit des delNS1-Virus, die Replikation des Influenza-A-/WSN/33-(WSN-)Virus, einem üblicherweise verwendeten Laborstamm des Influenza-Virus, in Eiern zu inhibieren. Wie aus [Fig. 1](#) ersichtlich ist, konnte die Behandlung mit nur 2 pfu des delNS1-Virus die endgültigen Titer des WSN-Virus in dem Allantois-Fluid um einen Log verringern. Des Weiteren führte die Behandlung mit  $2 \times 10^4$  pfu des delNS1-Virus zu einer praktisch vollständigen Aufhebung der WSN-Replikation in Eiern. Das delNS1-Virus konnte auch die Replikation von anderen Influenza-A-Virus-Stämmen (H1N1 und H3N2), dem Influenza-B-Virus und einem anderen Virus wie dem Sendai-Virus stören ([Fig. 2](#)).

**[0083]** Durch diese Ergebnisse ermutigt bestimmten die Anmelder als nächstes die Fähigkeit des delNS1-Virus, die Wildtyp-Influenza-Virus-Replikation bei Mäusen zu stören. Obgleich die Typ I IFN-Behandlung in Gewebekulturen die Replikation des Influenza-A-Virus in vitro verhindert, kann die Behandlung von Mäusen mit IFN die Replikation von Influenza-Viren nicht inhibieren (Haller, 1981, *Current Top Microbiol. Immunol.* 92: 25-52). Dies gilt für die meisten durch Inzucht erzeugten Stämme von Mäusen mit Ausnahme der A2G-Mäuse. A2G-Mäuse sowie ein signifikanter Anteil von wilden Mäusen (etwa 75 %) enthalten mindestens eine intakte Mx1-Allele, während die meisten Laborstämme Mx1 -/- sind (Haller, 1986, *Current Top Microbiol. Immunol.* 127: 331-337). Das Mx1-Protein, das ein Homolog des humanen MxA-Proteins ist (Aebi, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 11: 5062), ist ein starker Inhibitor der Influenza-Virus-Replikation (Haller, 1980, *Nature* 283: 660). Dieses Protein wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern seine Expression wird transcriptionell durch das Typ I IFN induziert. So können A2G-Mäuse verwendet werden, um die Fähigkeit von IFN-Induktoren, eine antivirale Reaktion gegen Influenza-A-Viren zu stimulieren, zu testen (Haller, 1981, *Current Top Microbiol. Immunol.* 92:25-32).

**[0084]** Die Anmelder infizierten 8 vier Wochen alte A2G-Mäuse intranasal mit  $5 \times 10^6$  pfu<sup>6</sup> eines hoch pathogenen Influenza-A/PR/8/34-Virusisolats (Haller, 1981, *Current Top Microbiol. Immunol.* 92: 25-52). Die Hälfte der Mäuse erhielt eine intranasale Behandlung mit  $5 \times 10^6$  pfu des delNS1 nach -24 Stunden mit Bezug auf die PR8-Infektion. Die anderen vier Mäuse wurden mit PBS behandelt. Die Änderungen des Körpergewichts und das Überleben wurden überwacht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die delNS1-Behandlung A2G-Mäuse gegen den durch das Influenza-Virus induzierten Tod und Verlust des Körpergewichts schützen kann. Die gleiche Behandlung war bei Mx1-/-Mäusen nicht wirksam, was angibt, dass der Mechanismus des viralen Schutzes Mx1-, d.h. IFN-, vermittelt war.

#### 11. BEISPIEL: ANTITUMOREIGENSCHAFTEN DES DELNS1-VIRUS BEI MÄUSEN

**[0085]** Da gezeigt wurde, dass das Typ I IFN und/oder Induktoren des Typ I IFNs Antitumoraktivitäten aufweisen (Belardelli und Gresser, 1996, *Immunology Today*, 17: 369-372; Qin et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 14411-14416), ist es möglich, dass die Behandlung von Tumoren mit dem delNS1-Virus die Tumorregression vermitteln kann. Alternativ könnte das delNS1-Virus onkolytische Eigenschaften haben, d.h. es kann spezifisch in Tumorzellen wachsen und diese töten, von denen bekannt ist, dass viele von ihnen Defekte des IFN-Systems aufweisen. Um die Antitumor-Aktivität des delNS1-Virus zu testen, wurde das folgende Experiment unter Verwendung der Mäuse-Karzinomzelllinie CT26.WT in einem Mäuse-Tumormodell für pulmonale Metastasen durchgeführt (Restifo et al., 1998, *Virology* 249: 89-97).  $5 \times 10^5$  CT26.WT-Zellen wurden 12 sechs Wochen alten BALB/c-Mäusen intravenös injiziert. Die Hälfte der Mäuse wurde intranasal mit  $10^6$  pfu des delNS1-Virus alle 24 Stunden am Tag 1, 2 und 3 nach der Inokulation behandelt. Zwölf Tage nach der Tumoringektion wurden die Mäuse getötet und die Lungenmetastasen gezählt. Wie in Tabelle 10 gezeigt, vermittelte die delNS1-Behandlung eine signifikante Regression der pulmonalen Metastasen der Mäuse.

Tabelle 10. Antitumor-Aktivität des delNS1-Virus in BALB/c-Mäusen, denen CT26.WT-Tumorzellen injiziert wurden

	Anzahl der pulmonalen Metastasen	
	PBS-behandelt	delNS1-behandelt
Maus 1	>250	120
Maus 2	>250	28
Maus 3	>250	9
Maus 4	>250	6
Maus 5	>250	2
Maus 6	>250	1

## 12. BEISPIEL: DAS NS1-PROTEIN INHIBIERT DIE TRANSLOCATION VON IRF-3 WÄHREND DER INFLUENZA-VIRUS-INFEKTION

**[0086]** Die hier beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass das NS1-Protein des Influenza-Virus für die Inhibierung der Typ I IFN-Reaktion gegen das Virus verantwortlich ist und dass Mutationen/Deletionen in diesem Protein zu abgeschwächten Viren aufgrund einer verbesserten IFN-Reaktion während der Infektion führten. Es ist bekannt, dass die Synthese des Typ I IFN während einer viralen Infektion durch die Doppelstrang-RNS (ds-RNS) ausgelöst werden kann. IRF-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der üblicherweise in einer inaktiven Form in dem Zytoplasma von Säugerzellen gefunden wird. Die Doppelstrang-RNS induziert die Phosphorylierung (Aktivierung) des Transkriptionsfaktors IRF-3, was zu seiner Translocation zum Nucleus führt, wo er die Transcription der spezifischen Gene, einschließlich der Gene, die für das Typ I IFN codieren, induziert (Weaver et al., 1998, Mol. Cell. Biol. 18: 1359). Um zu bestimmen, ob das NS1 des Influenza-Virus auf IRF-3 wirkt, wurde die IRF-3-Lokalisierung in CV1-Zellen, die mit dem Wildtyp-PR8- oder mit dem delNS1-Influenza-A-Virus infiziert worden waren, überwacht. [Fig. 3](#) zeigt, dass die IRF-3-Translocation in PR-8-infizierten Zellen minimal ist (in weniger als 10% der Zellen). Im Gegensatz hierzu zeigten etwa 90% der mit delNS1-infizierten Zellen eine nucleäre Lokalisierung von IRF-3. Überraschenderweise war es möglich, die IRF-3-Translokation in mit delNS1 infizierten Zellen durch Expressieren von NS1 aus einem Plasmid in trans teilweise zu inhibieren. Die Ergebnisse zeigen, dass das NS1 des Influenza-A-Virus die IRF-3-Translocation in virusinfizierten Zellen inhibieren kann. Es ist wahrscheinlich, dass das NS1 des Influenza-Virus die dsRNS-vermittelte Aktivierung von IRF-3 durch Maskieren der dsRNS, die während der viralen Infektion erzeugt wurde, verhindert, was so zu einer Inhibierung der IFN-Synthese führt.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Impfstoffherstellung, umfassend:
  - (a) das Vermehren eines abgeschwächten Influenza-Virus mit einer Mutation im NS1-Gen in einem Interferon-defizienten Substrat, das die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären Interferonreaktion reduziert oder ausschaltet; und
  - (b) das Sammeln von Virus-Nachkommen, wobei das Interferon-defiziente Substrat ein unreifes, sechs bis neun Tage altes, embryoniertes Ei ist, mit der Maßgabe, dass das Virus kein Influenza-C-Virus ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Interferon-defiziente Substrat die Allantoishöhle eines unreifen embryonierten Eis ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus gentechnisch manipuliert ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die Mutation im NS1-Gen eine Deletion am C-Terminus von

NS1 ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das NS1-Gen für verkürzte NS1-Proteine kodiert, die aus den Aminosäureresten 1-60, Aminosäureresten 1-70, Aminosäureresten 1-90, Aminosäureresten 1-99, Aminosäureresten 1-100, Aminosäureresten 1-110, Aminosäureresten 1-120, Aminosäureresten 1-124 oder Aminosäureresten 1-130 von Wildtyp-NS1 bestehen.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus ein Influenza-A-Virus ist, bei dem das NS1-Gen deletiert ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Ei ein sechs bis achte Tage altes Hühnerei ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Ei ein sechs bis sieben Tage altes Hühnerei ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Ei ein sechs Tage altes Hühnerei ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Ei ein sieben Tage altes Hühnerei ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Ei ein acht Tage altes Hühnerei ist.

12. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Interferon-defiziente Substrat die Allantoishöhle eines unreifen, sechs Tage alten, embryonierten Eis ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus Influenza A oder B ist.

14. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die Mutation im NS1-Gen für den abgeschwächten Phänotyp des Influenza-Virus verantwortlich ist.

15. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das Virusgenom mindestens ein aus einem unterschiedlichen Virus stammendes Segment umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein fremdes Antigen zu kodieren.

17. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein Tumor-Antigen zu kodieren.

18. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein von einem anderen Virus stammendes Epitop zu kodieren.

19. Verfahren zur Impfstoffherstellung, umfassend:

(a) das Vermehren eines abgeschwächten Influenza-Virus mit einer Mutation im NS1-Gen in einem Interferon-defizienten Substrat, das die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären Interferonreaktion reduziert oder ausschaltet; und

(b) das Sammeln von Virus-Nachkommen,

wobei das Interferon-defiziente Substrat eine Zelllinie mit nicht genügend Interferon ist, mit der Maßgabe, dass das Virus kein Influenza-C-Virus ist und die Interferon-defiziente Zelllinie keine Vero-Zellen und keine STAT(-)-Zelllinien sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus genetisch manipuliert ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Mutation im NS1-Gen eine Deletion am C-Terminus von NS1 ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das NS1-Gen für verkürzte NS1-Proteine kodiert, die aus den Aminosäureresten 1-60, Aminosäureresten 1-70, Aminosäureresten 1-90, Aminosäureresten 1-99, Aminosäureresten 1-100, Aminosäureresten 1-110, Aminosäureresten 1-120, Aminosäureresten 1-124 oder Aminosäureresten 1-130 von Wildtyp-NS1 bestehen.

23. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus ein Influenza-A-Virus ist, bei

dem das NS1-Gen deletiert ist.

24. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus Influenza A oder B ist.
25. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Mutation im NS1-Gen für den abgeschwächten Phänotyp des Influenza-Virus verantwortlich ist.
26. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das Virusgenom mindestens ein von einem unterschiedlichen Virus stammendes Segment umfasst.
27. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein fremdes Antigen zu kodieren.
28. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein Tumor-Antigen zu kodieren.
29. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein von einem anderen Virus stammendes Epitop zu kodieren.
30. Embryoniertes, sechs bis neun Tage altes Ei, das ein abgeschwächtes Influenza-Virus mit einer Mutation im NS1-Gen enthält, welches die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zur Bekämpfung der zellulären Interferonreaktion reduziert oder ausschaltet, wobei das Virus kein Influenza-C-Virus ist.
31. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus in der Allantoishöhle enthalten ist.
32. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30 oder 31, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus genetisch manipuliert ist.
33. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus ein Influenza-A-Virus ist, bei dem das NS1-Gen deletiert ist.
34. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei ein Hühnerei ist.
35. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31 oder 32, wobei das Virusgenom mindestens ein von einem unterschiedlichen Virus stammendes Segment umfasst.
36. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31 oder 32, wobei die Mutation im NS1-Gen eine Deletion am C-Terminus von NS1 ist.
37. Embryoniertes Ei nach Anspruch 36, wobei das NS1-Gen verkürzte NS1-Proteine kodiert, die aus den Aminosäureresten 1-60, Aminosäureresten 1-70, Aminosäureresten 1-90, Aminosäureresten 1-99, Aminosäureresten 1-100, Aminosäureresten 1-110, Aminosäureresten 1-120, Aminosäureresten 1-124 oder Aminosäureresten 1-130 von Wildtyp-NS1 bestehen.
38. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Influenza-Virus Influenza-A- oder -B-Virus ist.
39. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31 oder 32, wobei die Mutation im NS1-Gen für den abgeschwächten Phänotyp des Influenza-Virus verantwortlich ist.
40. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei sechs bis acht Tage alt ist.
41. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei sechs bis sieben Tage alt ist.
42. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei sechs Tage alt ist.
43. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei sieben Tage alt ist.
44. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das Ei acht Tage alt ist.

45. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein fremdes Antigen zu kodieren.
46. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein Tumor-Antigen zu kodieren.
47. Embryoniertes Ei nach Anspruch 30, 31, 32 oder 33, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein von einem anderen Virus stammendes Epitop zu kodieren.
48. Interferon-defiziente Zelllinie, enthaltend ein abgeschwächtes Influenza-Virus mit einer Mutation im NS1-Gen, das die Fähigkeit des NS1-Genprodukts zum Bekämpfen der zellulären Interferonreaktion reduziert oder ausschaltet, wobei das Virus kein Influenza-C-Virus ist und die Interferon-defiziente Zelllinie keine Vero-Zellen und keine STAT1(-)-Zelllinien sind.
49. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus ein Influenza-A-Virus ist, bei dem das NS1-Gen deletiert ist.
50. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus genetisch manipuliert ist.
51. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, wobei die Mutation im NS1-Gen eine Deletion am C-Terminus von NS1 ist.
52. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 51, wobei das NS1-Gen die verkürzten NS1-Proteine kodiert, die aus den Aminosäureresten 1-60, Aminosäureresten 1-70, Aminosäureresten 1-90, Aminosäureresten 1-99, Aminosäureresten 1-100, Aminosäureresten 1-110, Aminosäureresten 1-120, Aminosäureresten 1-124 oder Aminosäureresten 1-130 von Wildtyp-NS1 bestehen.
53. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, 49 oder 50, wobei das Influenza-Virus das Influenza-A- oder -B-Virus ist.
54. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48 oder 50, wobei die Mutation im NS1-Gen für den abgeschwächten Phänotyp des Influenza-Virus verantwortlich ist.
55. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, 49 oder 50, wobei das Virusgenom mindestens ein von einem unterschiedlichen Virus stammendes Segment umfasst.
56. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, 49 oder 50, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein fremdes Antigen zu kodieren.
57. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, 49 oder 50, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein Tumor-Antigen zu kodieren.
58. Interferon-defiziente Zelllinie nach Anspruch 48, 49 oder 50, wobei das abgeschwächte Influenza-Virus manipuliert wird, um ein von einem anderen Virus stammendes Epitop zu kodieren.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

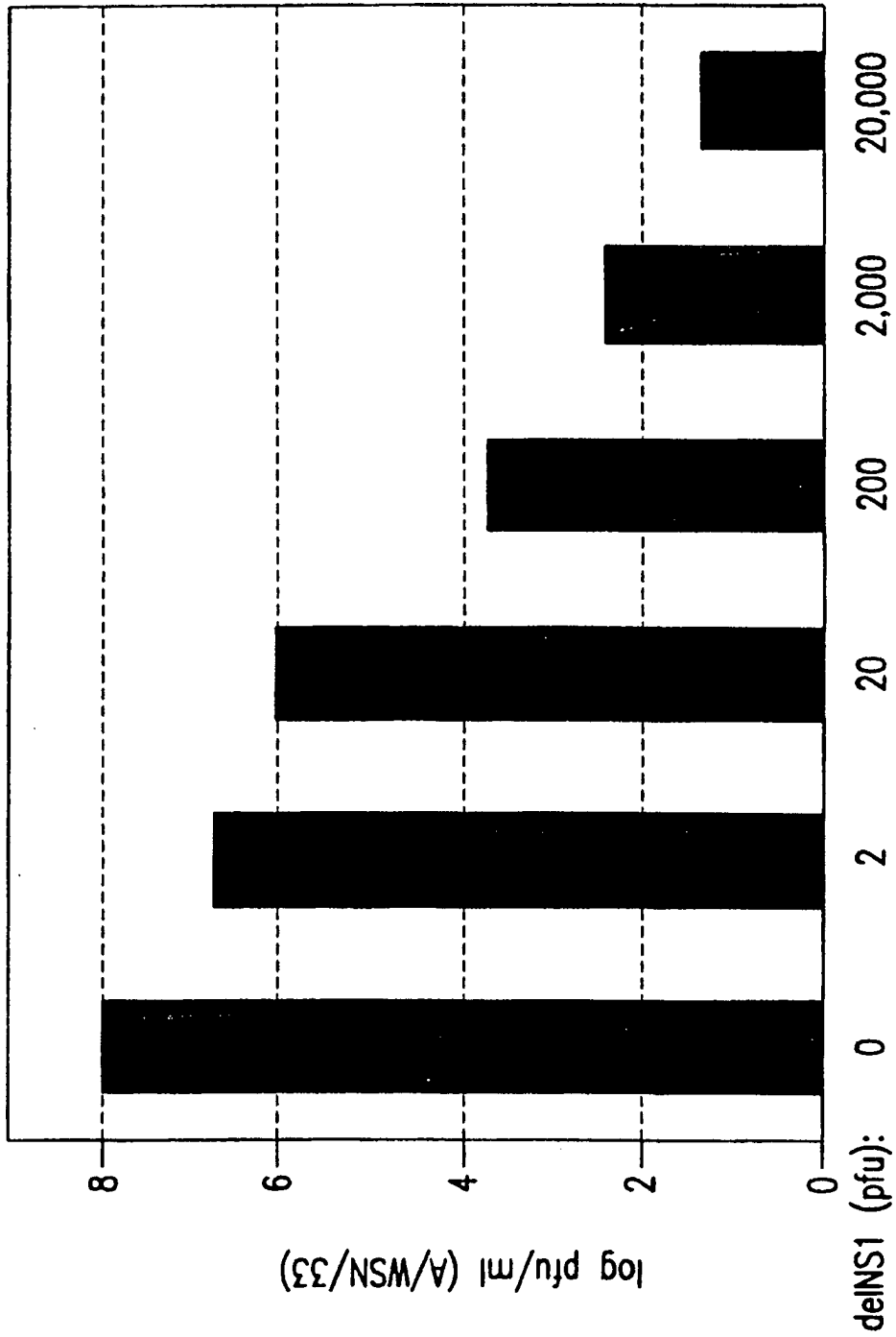


FIG.1

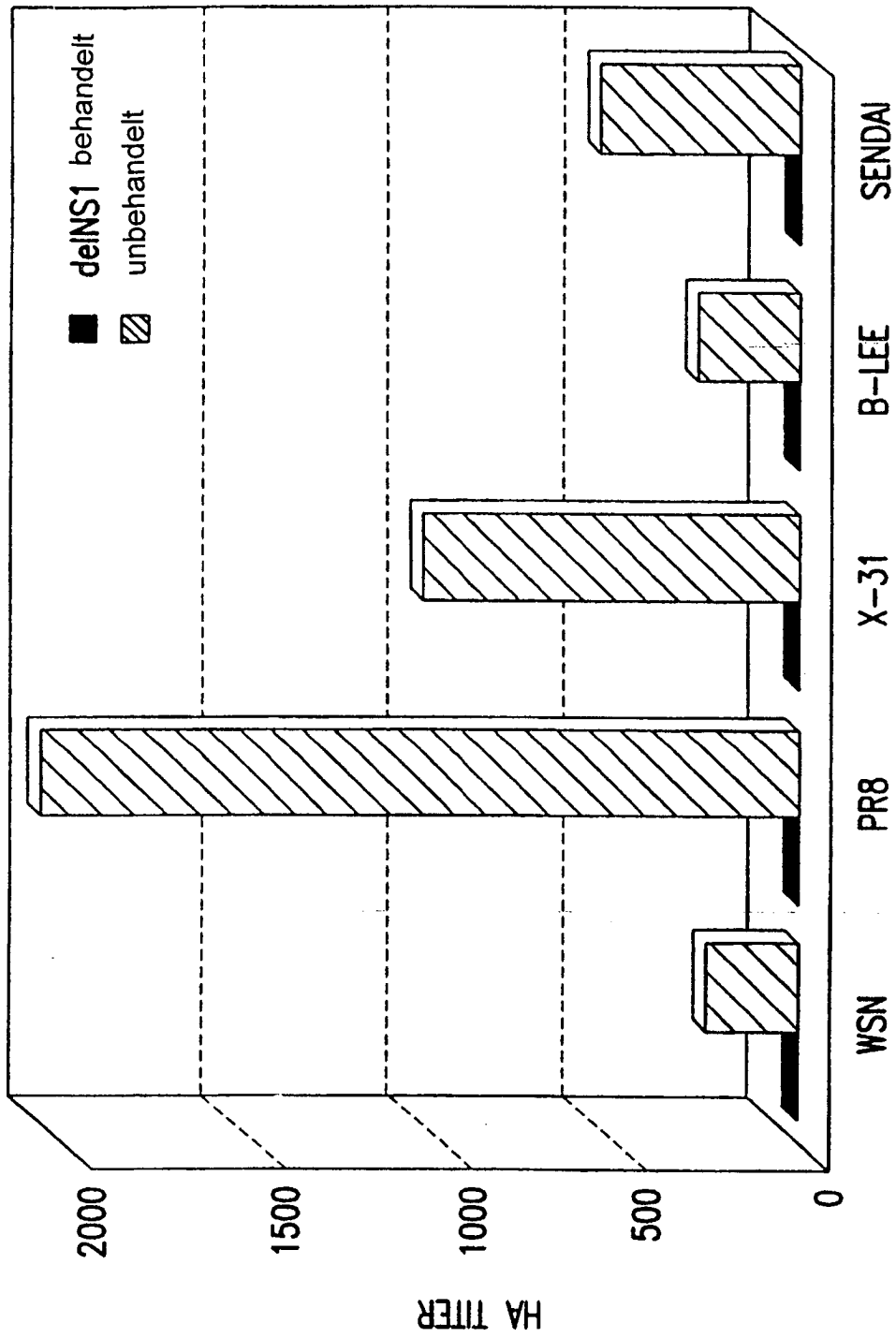


FIG.2

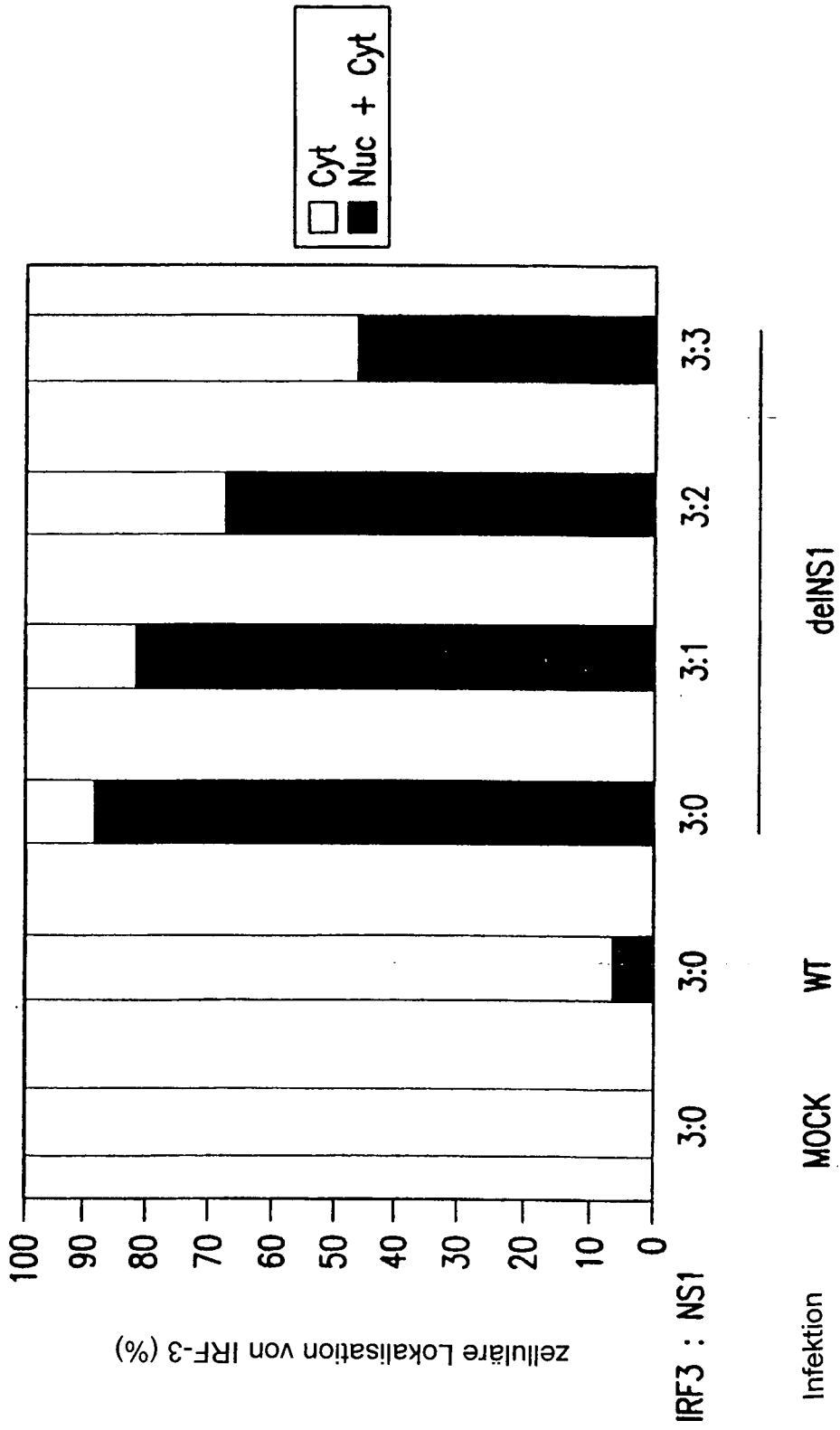


FIG.3