



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84388 (13) C2  
(51) МПК (2006)

C12N 7/08 (2006.01)  
C12N 15/863  
A61K 35/76 (2008.01)  
A61K 39/275  
A61K 39/39  
A61K 48/00  
A61P 31/20 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗМІНЕНИЙ ШТАМ МОДИФІКОВАНОГО ВІРУСУ ВІСПИ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ANKARA (MVA)

1

2

(21) 2002097453

(22) 10.03.2001

(24) 27.10.2008

(86) PCT/EP01/02703, 10.03.2001

(31) PA 2000 00410

(32) 14.03.2000

(33) DK

(46) 27.10.2008, Бюл.№ 20, 2008 р.

(72) МАІР АНТОН

(73) БАВАРІАН НОРДІК А/С

(56) WO952297 A, 31.08.95.

WO9702355 A, 23.01.97.

CARROLL MILES W ET AL: "Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: Propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line." VIROLOGY, vol. 238, no. 2, 24 November 1997 (1997-11-24), pages 198-211, XP002174405 ISSN: 0042-6822.

DREXLER INGO ET AL: "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 79, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 347-352, XP002174406 ISSN: 0022-131.

(57) 1. Спосіб одержання модифікованого вірусу Vaccinia Ankara (MVA), здатного до росту в клітинах безперервної лінії клітин ссавця, який включає стадії:

a) інфікування клітин безперервної лінії клітин Vero штамом MVA,

b) культивування вірусів,

c) збір вірусів,

d) інфікування свіжих клітин тієї ж самої клітинної лінії новоствореними вірусами, і

e) повторення a)-d), до тих пір, поки вірус не буде адаптований до росту в клітинах вказаної клітинної лінії, де адаптація визначається як перевищення значення титру вірусу на стадії c) у порівнянні з

титром вихідного вірусу, що використовується при інфікуванні на стадії a).

2. Спосіб за п. 1, де клітинна лінія являє собою лінію клітин Vero ATCC No. CCL-81.

3. Спосіб за п. 2, де для інфікування на стадії a) використовують MVA, депонований в ECACC під депозитарним номером V94012707.

4. Спосіб за п. 3, де модифікований вірус Vaccinia Ankara являє собою MVA, депонований в ECACC під депозитарним номером 99101431.

5. Спосіб за п. 3, де модифікований вірус Vaccinia Ankara являє собою MVA, депонований в ECACC під депозитарним номером 01021411.

6. Спосіб за п. 1, який додатково включає стадію d), що передбачає введення в геном MVA щонайменше однієї гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти.

7. Спосіб за п. 6, де гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти являє собою ген, який кодує терапевтичний білок і/або антигенну детермінанту.

8. Штам модифікованого вірусу Vaccinia Ankara (MVA), призначений для росту в клітинах неперервної лінії клітин ссавця, депонований в ECACC під депозитарним номером 99101431.

9. Штам модифікованого вірусу Vaccinia Ankara (MVA), призначений для росту в клітинах неперервної лінії клітин ссавця, депонований в ECACC під депозитарним номером 01021411.

10. Клітина-хазяїн, інфікована in vitro або ex vivo модифікованим вірусом Vaccinia Ankara (MVA) за будь-яким з пунктів 8-9 або отриманим способом за будь-яким з пунктів 1-7.

11. Фармацевтична композиція, яка містить вірус MVA і/або ДНК вказаного вірусу MVA за будь-яким з пунктів 8-9 або отриманого способом за будь-яким з пунктів 1-7.

12. Композиція за п. 11, де фармацевтична композиція являє собою вакцину.

13. Композиція за п. 12 для імунізації живого тваринного організму або людини.

(13) C2

(11) 84388

(19) UA

14. Композиція за п. 12 або 13 для імунізації проти інфекції, викликаній ортопоксвірусом.

15. Композиція за будь-яким з пунктів 12-14 для імунізації кішок проти інфекції котячої віспи, мишей проти інфекції екстремелії і/або верблюдів проти інфекції віспи верблюдів.

16. Композиція за п. 11, де MVA є активатором, супресором і/або стабілізатором неспецифічної імунної системи.

17. Композиція, яка містить MVA і/або ДНК MVA за будь-яким з пунктів 8-9 або отриманий способом за будь-яким з пунктів 1-7 як ад'ювант.

18. Композиція за п. 17 для застосування в генотерапії.

19. Спосіб введення гомологічної і/або гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітину-мішень, що передбачає інфікування клітини-мішені вірусом MVA, отриманим способом за будь-яким з пунктів 6-7, або ДНК вказаного вірусу.

20. Спосіб розмноження вірусних частинок MVA, які здатні зростати в клітинах безперервної лінії клітин ссавця, що включає:

а) культивування клітин клітинної лінії, у якій вірус MVA може відтворюватися при придатних умовах,

б) інфікування вказаної клітинної лінії вірусом MVA, отриманим способом за будь-яким з пп. 1-7, або вірусом за будь-яким з пп. 8-9, і

с) збір вірусних частинок, які продукуються вказаною клітинною лінією.

21. Спосіб одержання послідовності нуклеїнової кислоти, пептиду і/або поліпептиду, що передбачає:

а) інфікування клітини-хазяїна рекомбінантним MVA, одержаним способом за пунктами 6 або 7,

б) культивування інфікованої клітини-хазяїна при придатних умовах і, необов'язково,

с) виділення і/або збагачення послідовності нуклеїнової кислоти, пептиду і/або білка, які продукуються вказаною клітиною-хазяїном.

22. Застосування MVA за пп. 8-9 або отриманого способом за будь-яким з пунктів 1-7 для приготування фармацевтичної композиції для лікування або профілактики захворювання або порушення, чутливого до вказаного MVA.

23. Застосування MVA за пп. 8-9 або отриманого способом за будь-яким з пунктів 1-7 для приготування вакцини для імунізації живого організму тварини або людини.

24. Застосування MVA за пп. 8-9 або отриманого способом за будь-яким з пунктів 1-7 для одержання активатора, супресора і/або стабілізатора неспецифічної імунної системи живого організму тварини або людини.

25. Застосування MVA за пп. 8-9 або отриманого способом за будь-яким з пунктів 1-7 для одержання ад'юванта, який застосовується для тварини або людини.

26. Спосіб імунізації тварини або людини, який передбачає введення вказаному об'єктові, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості композиції за п. 11.

27. Спосіб активації, супресії і/або стабілізації неспецифічної імунної системи тварини або людини, який передбачає введення фармацевтичної композиції за п. 11.

28. Спосіб посилення специфічної імунної реакції проти антигенної детермінанти у вакцині, який передбачає введення MVA, отриманих способом за будь-яким з пп. 1-7, або вірусу за будь-яким з пп. 8-9 як ад'юванта в живий організм тварини або людини.

29. Спосіб експресії терапевтичного білка в живому організмі тварини або людини, який включає стадії:

а) виділення клітин із тварини або людини для обробки;

б) трансформувannya виділених клітин за допомогою MVA, отриманого способом за п. 6 або 7; і

с) введення трансформованих клітин назад у організм тварини або людини.

30. Спосіб експресії терапевтичного білка в живому організмі тварини або людини, що включає стадії безпосереднього введення тварині або людині MVA, отриманих способом за п. 6 або 7, або ДНК вказаних вірусів.

31. Спосіб модифікації вірусу Vaccinia Ankara (MVA) з метою адаптації до зростання в клітинах безперервної лінії клітин Vero, який включає наступні стадії:

а) інфікування клітин безперервної лінії клітин Vero, схваленої для одержання лікарської речовини, вірусом Vaccinia Ankara (MVA),

б) збір вірусних частинок, які продукуються клітинами вказаної клітинної лінії, і, необов'язково,

с) повторення вищевказаних стадій, поки не будуть отримані бажані характеристики росту вказаного MVA у вказаних клітинах.

Даний винахід стосується нових штамів модифікованого вірусу віспи великої рогатої худоби Анкара (MVA), які мають значно знижену вірулентність для більшості ссавців, включаючи людину, але незважаючи на це ростуть у клітинах безперервної клітинної лінії, дозволеної для виробництва терапевтичного засобу, такого як вакцина. Винахід також стосується способу продукування вказаних адаптованих штамів MVA. MVA може бути використаний, наприклад, для парентеральної імунізації, як система вектора, або в активній чи інактивованій

формі як ад'ювант чи як регулятор неспецифічних компонентів імунної системи.

Організм постійно атакують інфекційні агенти, такі як бактерії, віруси, грибки чи паразити, імунна система охороняє організм від постійної інфекції, спричиненої цими агентами, шляхом деструкції та елімінації цих інфекційних агентів та будь-яких токсичних молекул, продукованих ними. Імунна система може бути розділена на специфічну та неспецифічну частини, хоч обидві ці частини тісно пов'язані одна з одною. Неспецифічна імунна від-

повідь мобілізує негайний захист проти широкого спектра чужорідних речовин та інфекційних агентів. На відміну від неї, специфічна імунна відповідь збуджується після фази затримки, якщо організм уперше стимулюється речовиною. Однак, специфічна імунна відповідь є високоефективною. Специфічна імунна відповідь відповідає за той факт, що особа, яка одужала після певної інфекції, є захищеною проти цієї конкретної інфекції, але залишається сприйнятливою до інших інфекційних захворювань. Загалом, друга інфекція з цим самим чи дуже близьким до нього інфекційним агентом викликає набагато слабкіші симптоми чи ніяких симптомів. Імунітет існує протягом тривалого часу, у деяких випадках навіть протягом усього життя. Ця імунологічна пам'ять використовується для вакцинації, коли організм стимулюється нешкідливою чи інактивованою формою інфекційного агента з метою індукування специфічного імунітету. Інколи до складу вакцин включають ад'юванти для посилення специфічної імунної відповіді.

Велика кількість знань про інфекційні хвороби та імунітет були одержані завдяки дослідженням віспи. Ця хвороба викликається вірусом натуральної віспи, який є членом роду вірусів Orthorox. Майже два сторіччя тому були розпочаті профілактичні щеплення коров'ячою віспою, які приводили до імунізації проти натуральної віспи. Пізніше імунізацію здійснювали вірусом Vaccinia (віспи великої рогатої худоби). На початку 1950-х років багато індустріалізованих країн знищили ендемічну натуральну віспу шляхом використання вакцинації вірусом Vaccinia. Однак, вакцинація натуральної віспи вірусом Vaccinia інколи призводила до серйозних ускладнень, таких як поствакцинальний енцефаліт, генералізована вакцинія чи контактна інфекція.

Винахідник Anton Mayr розробив нову вакцину, яка не викликала таких ускладнень. Вакцина віспи складається з вірусу віспи Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) (модифікований вірус віспи великої рогатої худоби Ankara) і була використана для парентеральної вакцинації проти натуральної віспи при проведенні приблизно 150000 вакцинацій, не викликав ніяких ускладнень, асоційованих з вакцинацією. Навіть у дітей з імунологічною недостатністю не спостерігалось серйозних побічних ефектів. MVA був одержаний шляхом мутації і селекції вихідного вірусу віспи великої рогатої худоби Ankara після 575 пасувань у культурах фібробластів курячих ембріонів. Безпека цієї MVA підтверджується біологічними, хімічними та фізичними характеристиками. MVA має зменшену молекулярну вагу, шість делецій у геномі і сильно атенуована для клітин ссавців, тобто ДНК і протеїни синтезуються, але вірусні частинки практично не продукуються. Модифікований вірус віспи великої рогатої худоби Ankara (MVA), розроблений винахідником Anton Mayr, був депонований в Європейській колекції клітинних культур (ECACC), Солсбері, Великобританія, за депозитарним номером №V94012707.

Вакцинація проти натуральної віспи була дуже успішною. У 1979 році Всесвітня організація охо-

рони здоров'я оголосила про знищення натуральної віспи. Згідно з цим, було припинено масову вакцинацію дітей, і проводилась лише вакцинація працівників лабораторій та персоналу збройних сил деяких країн.

Із знищенням натуральної віспи було усунуто основну причину інфекції людей віспою. Однак, деякі поксвіруси мають знижену специфічність щодо хазяїв, тобто вони спричинюють інфекцію не лише у своїх типових хазяїв (наприклад, коров'ячу віспу у корів), але й у інших тварин (наприклад, пацюків та кішок). Таким шляхом можуть бути заражені також і люди. Оскільки певні частини населення вже не мають імунітету проти натуральної віспи, інфекції тваринними вірусами роду Orthorox можуть виявитись для них небезпечними. Основними джерелами інфекції людей є домашні тварини. Тому зростає важливість вакцинації домашніх тварин проти ортопоксвірусів. Крім того, MVA може мати значення як вектор для генної терапії, тобто, для перенесення послідовностей нуклеїнових кислот до клітини-мішені, у якій вони експресуються.

Для логарифмічної репродукції MVA потрібні клітинні культури первинних чи вторинних фібробластів курячих ембріонів. Ці клітини одержують з курячих яєць, які інкубують протягом 10-12 днів. Оскільки яйця схильні до біологічної мінливості, клітини, одержані з системи клітинної культури, також є мінливими на клітинному рівні. Крім того, у "культурі фібробластів" курячих ембріонів часто виявляють інші типи клітин, таких як епітеліальні клітини. Така мінливість клітин також призводить до мінливості вірусів, продукованих у фібробластах курячих ембріонів. Внаслідок цього важко стандартизувати та атестувати систему клітинної культури з метою гарантування постійно високої якості продукowanego MVA. Крім того, не можна виключити забруднення системи клітинної культури мікроорганізмами чи вірусами, вже присутніми в інкубованих яйцях. Якщо MVA вирощується у заражених вірусом клітинах, MVA може рекомбінувати з вірусом зараження. При цьому можуть бути створені MVA з новими та непередбачуваними характеристиками. Для великомасштабного продукування вірусів в суспензійній культурі первинні чи вторинні фібробласти курячих ембріонів є не дуже придатними. Крім того, було б бажаним очищення та концентрування MVA ультраградієнтним центрифугуванням. Однак, таке очищення є складним, коли MVA культивують на первинних чи вторинних фібробластах курячих ембріонів. Зрештою, у зростаючій кількості пацієнтів розвиваються алергії на білок курячого яйця. Хоч культивування за умов *in vitro* значно знижує алергенний потенціал, безпеку алергічної реакції не можна виключити повністю.

На закінчення, з одного боку MVA може ефективно вирощуватись лише в первинних чи вторинних фібробластах курячих ембріонів, що спричинює ряд недоліків, але з іншого боку, безпечність застосування MVA у людей була продемонстрована великомасштабним застосуванням вакцини.

Метою даного винаходу є створення умов для продукування гомогенних вірусних частинок MVA.

Крім того, вказані умови повинні забезпечувати просте та великомасштабне продукування MVA.

Для досягнення вказаних вище та інших цілей, даний винахід пропонує штам MVA, адаптований для вирощування у клітинах безперервної клітинної лінії, причому вказана клітинна лінія є дозволеною для продукування терапевтичного агента.

Згідно з даним винаходом, уперше стає можливим ефективне та великомасштабне продукування MVA. Оскільки клітини безперервної клітинної лінії є гомогенними, а їхні характеристики - стабільними, MVA, зібраний з цих клітинних ліній, також є гомогенним і має у високому ступеню прогнозовані характеристики. Крім того, можна контролювати ризик забруднення мікроорганізмами і виключити забруднення препарату MVA протеїнами курячого яйця, яке спостерігається при культивуванні MVA на фібробластах курячих ембріонів. Маніпулювання постійною клітинною лінією є зручним і тому дуже придатним для промислового застосування.

За кращим варіантом втілення винаходу, MVA адаптований для вирощування у клітинах лінії клітин ссавця, дозволеної для продукування вакцини. Несподівано було знайдено, що MVA, адаптований для лінії клітин ссавця, такої як клітинної лінії Vero, все ще виявляє знижену вірулентність щодо людей, а також для широкого спектру інших ссавців. Таким чином, MVA є сильно атенуйованим, тобто, ДНК і протеїни синтезуються, але вірусні частинки практично не продукуються, що приводить до практично усунутої здатності спричинювати хворобу. Таким чином, MVA за даним винаходом є також дуже добре придатним для використання як вакцина для людей та широкого спектру ссавців. Згідно з цим, MVA є особливо застосовним в галузі ветеринарії.

Крім того, пропонується спосіб одержання штаму MVA за даним винаходом. Згідно з цим варіантом втілення даного винаходу, клітини клітинної лінії, дозволеної для продукування терапевтичної речовини, інфікуються MVA дикого типу. Краще для такого інфікування використовується висока множинність зараження (MOI), тобто велика кількість вірусів на клітину. Потім віруси збирають і свіжі клітини цієї саме клітинної лінії інфікують щойно продукуваними вірусами. Описаний процес повторюють (серійний пасаж) доти, поки MVA не адаптується до вказаної клітинної лінії. Адаптація досягнута, якщо через 72 год. після інфекції титр вірусу зростає щонайменше 1-9-кратно, краще, 10-99-кратно, ще краще 100-10<sup>6</sup>-кратно, і найкраще, 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup>-кратно, порівняно з вихідним титром вірусу. Адаптація досягається після обмеженого числа пасажів.

"Адапований для вирощування" означає, що кількість вірусу, продукovanого внаслідок інфікування (вихід) зростає порівняно з кількістю вірусу, використаного спочатку для інфікування клітин (витрата). В цьому випадку співвідношення вихід/витрата більше 1.

"Похідне" MVA, депонованого в ECACC (Солсбері, Великобританія) за депозитарним номером 99101431 та/або тимчасовим номером доступу 01021411, означає MVA, адаптований для вирощування

у клітинах Vero зі швидкістю, яка по суті співпадає зі швидкістю росту депонованого штаму, але має у своєму геномі щонайменше одну відмінність порівняно з депонованим штамом.

Термін "імунна система" загалом описує комплекс, який бере участь у захисті організму від чужорідних речовин та мікроорганізмів. Вона ділиться на клітинну частину, що включає декілька типів клітин, таких як, наприклад, лімфоцити та інші клітини, похідні від білих кров'яних клітин, та гуморальну частину, що включає пептиди та протеїни, такі як антитіла, фактори комплементу та цитокіни.

Термін "імунна відповідь" описує реакцію імунної системи, коли в організм потрапляє чужорідна речовина чи мікроорганізм. Загалом, імунна відповідь ділиться на специфічну та неспецифічну реакцію, хоч вони обидві дуже тісно взаємозв'язані. Неспецифічною імунною відповіддю вважається негайний захист проти широкого спектра чужорідних речовин та інфекційних агентів. Специфічна імунна відповідь може бути охарактеризована як високоефективний механізм захисту організму проти чужорідної речовини, який мобілізується проти вказаної речовини після фази затримки і є високоспецифічним щодо вказаної речовини. Специфічна імунна відповідь відповідає за те явище, що особа, яка видужала від певної інфекції, залишається в майбутньому захищеною від цієї конкретної інфекції.

"Активатор імунної системи" позначає будь-яку речовину, здатну провокувати чи посилювати імунну відповідь.

"Супресор імунної системи" позначає будь-яку речовину, здатну ослаблювати чи інгібувати імунну відповідь.

"Стабілізатор імунної системи" означає будь-яку речовину, здатну підтримувати імунну відповідь на постійному рівні.

Винахідники пропонують два кращих штами MVA, адаптовані до клітинної лінії африканської зеленої мавпи, так званої клітинної лінії Vero (ATCC №CCL-81). Штам MVA, пасований 100 разів в клітинах MVA, був названий "Vero-MVA" і депонований в Європейській колекції клітинних культур (Солсбері, Великобританія) за депозитарним номером №99101431. Штам MVA після 200 пасажів в клітинах Vero був названий "Vero-MVA-200" і депонований в ECACC за номером тимчасового доступу №01021411.

MVA, одержаний, як описано вище, далі ампліфікують шляхом культивування клітин дозволеної клітинної лінії за придатних умов, інфікування клітин MVA та збирання вірусних частинок, продукуваних вказаними клітинами. Таким чином, MVA може бути ефективно та легко ампліфікований у великих масштабах. Несподівано, MVA за винаходом не виявляє підвищеної вірулентності у клітинах, що відрізняються від клітин Vero, таких як клітинні лінії людини, включаючи HL, HEP-2 та HeLa.

В іншому варіанті втілення винаходу, MVA містить щонайменше одну гетерологічну послідовність нуклеїнових кислот, тобто, послідовність нуклеїнових кислот, яка нормально відсутня в геномі

MVA (рекомбінантний MVA). Краще, гетерологічна послідовність нуклеїнових кислот є геном, ще краще, геном, який кодує імунізуючий протеїн, і найкраще - таким, що кодує протеїн, імунізуючий проти малярії, сказу та/або гепатиту. Експресія вказаної гетерологічної послідовності нуклеїнових кислот краще відбувається під транскрипційним контролем промотору вірусу віспи великої рогатої худоби, ще краще, власного промотору MVA. В іншому кращому варіанті втілення винаходу, гетерологічна послідовність нуклеїнових кислот вставляється до природного сайту делеції геному MVA (розкрито у РСТ/EP96/02926).

Рекомбінантний MVA використовується для введення послідовності нуклеїнових кислот до клітини-мішені, причому вказана послідовність нуклеїнових кислот є гомологічною чи гетерологічною щодо клітини-мішені. Введення гетерологічної послідовності нуклеїнових кислот до клітини-мішені може бути використане для продукування гетерологічних нуклеїнових кислот, пептидів та/або поліпептидів та/або протеїнів, кодованих вказаною послідовністю нуклеїнових кислот *in vitro*. Цей метод включає інфікування клітини-хазяїна рекомбінантним MVA, культивування інфікованої клітини-хазяїна за придатних умов і, необов'язково, виділення та/або збагачення пептиду та/або протеїну, продукованого вказаною клітиною-хазяїном.

Крім того, введення гомологічної або гетерологічної послідовності може бути застосовано для проведення *in vitro* і, краще, *in vivo* генної терапії. Для *in vitro* та *ex vivo* генної терапії, відповідно, ізолюють клітини від особи, лікування якої буде проводитись, трансформують рекомбінантною MVA і знов вводять особі, від якої ці клітини були узяті. Для *in vivo* генної терапії рекомбінантний MVA вводять безпосередньо в організм живої тварини, включаючи організм людини. В кращому варіанті втілення винаходу, рекомбінантний MVA експресує антиген чи антигенний епітоп. Ще краще, вказаний вектор експресує антигенний детермінант з *Plasmodium falciparum*, *Mycobacteria*, вірусу герпесу, вірусу грипу, гепатиту чи вірусу імунodefіциту людини.

Оскільки MVA за винаходом є - несподівано - все ще сильно атенуованим, цей MVA є ідеальним для імунізації широкого спектра ссавців, включаючи людину. Таким чином, даний винахід також пропонує вакцину, що включає MVA для імунізації живого організму тварини, включаючи людину, проти поксвірусних інфекцій, краще, ортопоксвірусних інфекцій. Вакцина може містити на додаток до MVA одну чи кілька домішок, таких як антибіотик, консервант або стабілізатор. Така вакцина є особливо застосовною в галузі ветеринарії, наприклад, для імунізації тварин проти ортопоксвірусних інфекцій, таких як кішок проти віспи котятих, мишей проти ектромелії чи верблюдів проти віспи верблюдів. Імунізацію краще здійснюють парентерально.

Імунізуючий ефект антигенного детермінанта у вакцині часто посилюється шляхом додавання так званого ад'юванта. Ад'ювант ко-стимулює імунну систему у неспецифічний спосіб, викликаючи си-

льнішу специфічну імунну реакцію проти антигенного детермінанта вакцини. Згідно з іншим варіантом втілення винаходу, MVA використовують як ад'ювант для ко-стимулювання імунної відповіді проти антигенного детермінанта вакцини. В цьому випадку краще, щоб MVA був інактивований. Інактивація MVA може бути здійснена, наприклад, шляхом нагрівання чи хімічними засобами. Краще, MVA інактивують  $\beta$ -пропіолактоном. Згідно з цим варіантом втілення винаходу, інактивований може бути доданий до вакцин проти численних інфекційних хвороб для підвищення імунітету проти цієї хвороби.

У випадку інфекції імунна, нервова, гормональна та судинна системи індивідуума тісно співпрацюють між собою. Ці взаємодії можуть бути регульовані елементами неспецифічної імунної системи, наприклад, цитокінами, такими як інтерферони та інтерлейкіни. Поксвіруси можуть впливати на регуляцію імунної системи (Swiss Vet., 11/99, 13-17). Таким чином, в іншому варіанті втілення винаходу, MVA і, краще, інактивований MVA, використовують у ссавців, включаючи людей, для регуляції клітинного та гуморального елементів неспецифічної (природженої) імунної системи. Краще, MVA використовують як біорегулятор, причому усуваються дисфункції імунної системи і активуються, стабілізуються та/або пригнічуються власні захисні механізми організму. Ще краще, MVA використовують як біорегулятор у випадку вірусної інфекції, наприклад, вірусом герпесу, гепатиту В чи С, у випадку хронічної запальної хвороби та/або для підтримувальної терапії пухлин. MVA може бути також використаний для стабілізації імунної системи в ситуації підвищеної сприйнятливості до інфекцій, такої як у випадку стресу чи у новонароджених. Активний та/або, краще, інактивований, MVA може застосовуватись системно, наприклад, внутрішньом'язово, та/або локально, наприклад, крізь слизові оболонки та/або шкіру.

Зрештою, даний винахід пропонує штами MVA, які можуть бути загалом використані для такого саме застосування, як MVA дикого типу, але усувають проблеми, спричинені ампліфікацією MVA дикого типу у фібробластах курячих ембріонів.

Винахід, поміж іншого, включає таке, окремо чи у комбінаціях:

Модифікований вірус віспи великої рогатої худоби Ankara (MVA), адаптований для вирощування у клітинах безперервної клітинної лінії, причому вказана клітина лінія дозволена для продукування терапевтичної речовини.

MVA, як описано вище, адаптований для вирощування у клітинах клітинної лінії ссавця.

MVA, як описано вище, де клітинна лінія дозволена для продукування вакцини.

MVA, як описано вище, де вказана дозволена клітинна лінія є клітинною лінією Vero.

MVA, як описано вище, де вказана дозволена клітинна лінія є клітинною лінією Vero ATCC<sup>®</sup>CCL-81.

MVA, як описано вище, депонований в Європейській колекції клітинних культур (Солсбері, Ве-

ликобританія) за депозитарним №99101431 та/або його похідне.

MVA, як описано вище, депонований в ECACC (Солсбері, Великобританія) за тимчасовим номером доступу 01021411 та/або його похідне.

MVA, як описано вище, що включає щонайменше одну гетерологічну послідовність нуклеїнових кислот.

MVA, як описано вище, що включає гетерологічну послідовність нуклеїнових кислот, яка кодує, наприклад, терапевтичний протеїн та/або антигенний детермінант, такий як пептид, що імунізує проти інфекції малярії, гепатиту та/або сказу.

Клітина-хазяїн, інфікована описаним вище MVA

Композиція, краще, фармацевтична композиція, яка включає описаний вище MVA та/або ДНК MVA

Фармацевтична композиція, описана вище, де фармацевтична композиція є вакциною.

Вакцина, описана вище, для імунізації живого організму тварини, включаючи людину.

Вакцина, як описано вище, для імунізації проти ортопоксвірусів.

Вакцина, як описано вище, для імунізації кішок проти інфекції віспою котятих, мишей проти інфекції екстремелією та/або верблюдів проти інфекції віспою верблюдів.

Фармацевтична композиція, як описано вище, де MVA є активатором, супресором та/або стабілізатором неспецифічної імунної системи.

Фармацевтична композиція, що включає описаний вище MVA та/або ДНК MVA як ад'ювант.

Фармацевтична композиція, що включає описаний вище рекомбінантний MVA та/або ДНК рекомбінантного MVA.

Фармацевтична композиція, як описано вище, призначена для використання у генній терапії.

Спосіб введення гомологічної та/або гетерологічної послідовності нуклеїнових кислот до клітини-мішені, який включає інфікування клітини-мішені описаним вище MVA.

Спосіб одержання штаму MVA, який описано вище, що включає а) інфікування клітин дозволеної клітинної лінії MVA дикого типу, краще, MVA, депонованого в ECACC за депозитарним №V94012707, б) збирання вірусів, в) інфікування свіжих клітин цієї саме клітинної лінії щойно продукованими вірусами і, необов'язково, г) повторення б) та в) доти, поки вірус не буде адаптований для вирощування в клітинах вказаної клітинної лінії.

Спосіб продукування вірусних частинок описаного вище MVA, що включає культивування клітин дозволеної клітинної лінії за придатних умов, інфікування вказаної клітинної лінії вказаним MVA, і збирання вірусних частинок, продукованих вказаними клітинами.

Спосіб, як описано вище, у якому вказана клітинна лінія інфікується MVA, депонованим в ECACC за депозитарним №99101431 та/або MVA, депонованим в ECACC за номером тимчасового доступу 01021411 або похідним одного з цих штамів.

Спосіб продукування послідовності нуклеїнових кислот, пептиду, поліпептиду та/або протеїну,

що включає інфікування клітини-хазяїна описаним вище рекомбінантним MVA, культивування інфікованої клітини-хазяїна за придатних умов і, необов'язково, виділення та/або збагачення послідовності нуклеїнових кислот, пептиду та/або протеїну, продукованих вказаною клітиною-хазяїном.

Використання описаного вище MVA для продукування фармацевтичної композиції, призначеної для лікування і профілактики хвороби чи розладу, сприйнятливих до вказаного MVA.

Використання описаного вище MVA для продукування вакцини, призначеної для імунізації живого організму тварини, включаючи людину.

Використання описаного вище MVA для продукування активатора, супресора та/або стабілізатора неспецифічної імунної системи.

Використання, як описано вище, для виробництва ад'юванта.

Використання описаного вище MVA як вакцини.

Використання описаного вище MVA як ад'юванта.

Використання описаного вище MVA як активатора, супресора та/або стабілізатора неспецифічної імунної системи.

Спосіб імунізації живого організму тварини, включаючи людину, який включає введення особі, що потребує цього, терапевтично ефективною кількістю описаної вище фармацевтичної композиції.

Спосіб введення гомологічної та/або гетерологічної послідовності нуклеїнових кислот до клітини-мішені, який включає інфікування клітини-мішені описаним вище MVA та/або ДНК MVA.

Спосіб активації, пригнічення та/або стабілізації імунної системи живого організму тварини, включаючи людину, який включає введення описаної вище фармацевтичної композиції у живий організм тварини, включаючи людину.

Спосіб посилення специфічної імунної відповіді проти антигенного детермінанта у вакцині, який включає введення описаного вище MVA як ад'юванта у живий організм тварини, включаючи людину.

Модифікований вірус віспи великої рогатої худоби Ankara, адаптований для вирощування у клітинах безперервної лінії клітин, одержуваний у спосіб, що включає такі стадії: інфікування клітин клітинної лінії, дозволеної для продукування терапевтичної речовини, збирання вірусних частинок, продукованих вказаними клітинними лініями і, необов'язково, повторення вказаних вище стадій доти, поки не будуть одержані бажані характеристики росту вказаного MVA у вказаних клітинах.

#### Приклади

Наведені далі приклади додатково ілюструють даний винахід. Фахівцю в даній області буде добре зрозуміло, що наведені приклади ніяким чином не можуть тлумачитись у спосіб, що обмежує застосовність технології, запропонованої даним винаходом в цих прикладах.

Приклад 1: Адаптація MVA до клітин Vero і визначення характеристик вказаного штаму MVA

#### 1. Адаптація MVA до клітин Vero

Одержаний Anton Mayr MVA дикого типу, що є модифікованим вірусом віспи великої рогатої ху-

доби Ankara, був депонований в ECACC за депозитарним №V94012707. MVA дикого типу був адаптований до вирощування у клітинах Vero шляхом серійного пасування вірусу в клітинах Vero (Таблиця 1). Клітинний клон ATCC №CCL-81 стаціонарної клітинної лінії Vero (запас культури для розведення WHO ECACC №88020401) був використаний у пасажах №№148-165 (партія засівного матеріалу WHO, основний та робочий банк (Master and Working Bank)). Клітини вирощували у середовищі, що складалося з мінімального підтримувального середовища (MEM) Ерла (ICN), pH 7,4-7,6, та 5% заміника сироватки BMS (Biocrom). Згідно з методикою, відомою фахівцям в цій галузі, засівали завжди одними й тими самими клітинами з робочого банку, ділячи клітини у співвідношенні від 1:2 до 1:4. Середовище містило приблизно 250000 клітин на мл. Клітини розмножували, відповідно, у пробірках (2мл), чашках Ру (100мл) та пластикових чашках (6 та 40мл, відповідно). Загалом, клітини утворювали збіжний моношар через 16-24 год. Після цього, середовище заміняли на просте мінімальне підтримувальне середовище (MEM) Ерла без будь-яких домішок.

Для адаптації MVA дикого типу використовували систему культури у пробірці. Результати пасажів зведені в Таблицях 1 та 2. Клітини Vero були інфіковані 10 MOI (множинність інфікування) MVA дикого типу, тобто, в середньому, 10 вірусних частинок на клітину Vero. Вихідний MVA дикого типу був генетично гомогенним, очищеним на бляшках MVA після 575 пасажів у фібробластах курячих ембріонів (титр:  $10^{7,75}$  KID<sub>50</sub>/мл). Через 24 год. 90% клітин Vero збіжного моношару були знищені токсичними процесами (50% токсичністю, 40% лізисом). Середовище плюс уламки клітин після заморожування та відтаювання клітин, що містять продуктовані віруси, збирали і 0,2 мл цієї суміші висівали на моношар клітин Vero в культуральних пробірках (2-й пасаж). Цю процедуру повторювали 200 разів. Після третього пасажу токсичного ефекту більш не було виявлено, але спостерігався слабкий цитопатичний ефект (CPE), який характеризувався закругленням клітин та лізисом в період 4-6 днів після інфікування (p.inf.). Був зроблений висновок про те, що проліферація MVA у клітинах Vero почалася, хоч і дуже неефективно. Після п'ятого пасажу спостерігався типовий CPE, який закінчився за 4-5 днів p.inf. Титр вірусу збільшився з  $10^{1,0}$  KID<sub>50</sub>/мл після третього пасажу до  $10^{4,0}$  KID<sub>50</sub>/мл після п'ятого пасажу. Таким чином, вірус ампліфікувався більш ефективно у клітинах Vero. У пасажах №№5-11 повний CPE спостерігався все раніше, а титр вірусу зростав з кожним пасажем. На пасажі №11 було досягнуто плато при  $10^{7,5}$  KID<sub>50</sub>/мл. Отже, після одинадцяти пасажів було досягнуто адаптації MVA до клітин Vero. У наступних 30 додаткових пасажах результати для усіх пасажів були однаковими та відтворюваними у високому ступені: CPE починався вже через 24 год. p.inf., і всі клітини були вражені через три дні p.inf. На цей час, 20% клітин Vero були закруглені, а 80% - лізовані. Через три дні p.inf. титр вірусу завжди становив близько  $10^{7,75}$  KID<sub>50</sub>/мл. Після п'ятнадцятого пасажу віруси завжди збирали

через два-три дні p.inf., а для інфікування клітин використовували лише 1 MOI замість 10 MOI (Таблиця 2). У наступних додаткових пасажах характеристики росту MVA змінювались лише в незначному ступені. Варто уваги, що оптимальний титр вірусу зростав далі і сягнув  $10^{10}$  KID<sub>50</sub>/мл на пасажі 200.

На закінчення слід зазначити, що вірус відтворює рост з експоненціальним характером у клітинах Vero. Вказана характеристика росту несподівано відрізняється від характеристик MVA дикого типу. Таким чином, шляхом серійного пасування був одержаний новий штам MVA. Вказаний новий штам був названий "Vero-MVA", а після 200 пасажів у клітинах Vero - "Vero-MVA-200".

Vero-MVA та Vero-MVA-200 культивувалися у великих кількостях. Для зберігання, Vero-MVA концентрували центрифугуванням, ресуспендували у 2,5% полігеліну (polygeline) та ліофілізували у флаконах на 2 мл. Титр після ліофілізації все ще становив щонайменше  $10^{8,5}$  KID<sub>50</sub>/мл. Ліофілізовані Vero-MVA та Vero-MVA-200 перевіряли на забруднення та токсичність і зберігали при +4°C.

2. Визначення показників біологічних властивостей Vero-MVA

Біологічні характеристики Vero-MVA (пасаж 100) та Vero-MVA-200 (пасаж 200) порівнювали з характеристиками MVA дикого типу (Таблиця 3 та Таблиця 5). При цьому використовували методики, відомі кваліфікованому фахівцю-практику. Винахідники показали, що не змінився спектр хазяїв, за винятком клітин Vero, ані збільшилася вірулентність по відношенню до людей чи тварин. Vero-MVA, як і раніше, характеризується абортивним розмноженням у непермісивних клітинах-хазяїнах.

Принципова ідентичність вірусних частинок Vero-MVA порівняно з вірусними частинками штаму Elstree вірусу Vaccinia (віспи великої рогатої худоби) була продемонстрована перехресною реактивністю антитіл, викликаних проти штаму Elstree. Штам Elstree є штамом Vaccinia, рекомендованим Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO) для вакцинації натуральної віспи. Поліклональну гіперімунну сироватку кроля, мобілізовану проти штаму Elstree, було додано до Vero-MVA. 100 KID<sub>50</sub>/мл Vero-MVA було повністю нейтралізовано при розведенні сироватки 1:512. Двократне розведення сироватки було потрібним для нейтралізації такої саме кількості штаму Elstree Vaccinia (1:256). Отже, Vero-MVA може бути ефективно нейтралізований імунною сироваткою Vaccinia.

Vero-MVA, Vero-MVA-200 та MVA дикого типу порівнювали між собою за допомогою ряду додаткових випробувань, як вказано в Таблицях 3, 4 та 5. Винахідники показали, що вірулентність Vero-MVA та Vero-MVA-200 для свавців, включаючи людей, не підвищується порівняно з MVA дикого типу. Було також показано, що Vero-MVA та Vero-MVA-200 є незаразними та нетоксичними для свавців, включаючи людей. Несподівано, клітинна специфічність Vero-MVA була більш чи менш ідентичною до специфічності MVA дикого типу, за винятком клітин Vero: Vero-MVA ампліфікується у клітинах клітинних ліній людини (дивись Таблицю

4: клітини HL, HEP-2 та HeLa) майже так само ефективно, як і MVA дикого типу. Таким чином, хоч клітини людини та клітини африканських зелених мавп філогенетично є тісно спорідненими, Vero-MVA не набуває здатності до ампліфікації у клітинах людини. Інші випробування також не виявили істотних відмінностей.

Крім того, були порівняні фізичні, хімічні та біологічні характеристики MVA дикого типу і Vero-MVA-200 (Таблиця 5). Якщо у MVA дикого типу, вирощуваного на клітинних культурах фібробластів курячого ембріону, було три делеції у лівій інвертованій кінцевій ділянці, то Vero-MVA-200 мав чотири делеції у лівій кінцевій ділянці порівняно з геномом поксвірусу, початково ізолюваного в Ан-

карі. Таким чином, пасування MVA дикого типу у клітинах Vero спричинило додаткову делецію.

Vero-MVA був використаний для імунізації домашніх тварин проти ортопоксвірусними (Orthorox) інфекціями. Відбирали сироватку тварин і проводили тест на нейтралізацію. Винахідники показали, що тварини продукували антитіла з високими титрами. Титри антитіл були стабільними протягом періоду щонайменше у 111 днів. Було також показано, що антитіла були здатними нейтралізувати *in vitro* вірусні частинки MVA за результатами тесту на відновлення бляшок. На закінчення, Vero-MVA може бути використаний як вакцина проти ортопоксвірусних (Orthorox) інфекцій для домашніх тварин та людей.

Таблиця 1

## Адаптація MVA до клітин Vero

Пасаж №	Клітинна культура	Найвищий титр вірусу [ $\log_{10}$ /мл]	Результат	Висновок
1	токсичний ефект після 24 год.	2,0	Залишки вірусу висіяні	Сліпі пасажі Поява зон та продукування цитокінів
3	Токсичність відсутня, помірний CPE після 4-6 днів	1,0	Залишки вірусу висіяні Початок репродукції вірусу	
5	типовий CPE, закінчується за 4-5 днів	4,0	Збільшення репродукції вірусу	
11	CPE, закінчується за 3 дні	7,5	Логарифмічна репродукція вірусу	Адаптація пройшла успішно
12-42*	CPE починається після 24 год., закінчується за 3 дні	7,75	Відтворювана репродукція вірусу	Vero-MVA
43-100*	CPE починається після 24 год., закінчується за 3 дні	8,0	Відтворювана репродукція вірусу	Vero-MVA
100-200*	CPE починається після 24 год., закінчується за 3 дні	10,0	Відтворювана репродукція вірусу	Приводить до одержання Vero-MVA-200

\* Після 11 пасажу висівається лише 1 MOI замість 10 MOI.

Таблиця 2

## Зміна титру вірусу після адаптації MVA до клітин Vero

Пасаж №	Збирання через [днів p.inf.]	Титр на мл [ $\log_{10}$ /мл]
1	1	<2,0
2	3	2,0
3	5	1,0
5	5	4,0
8	4	6,5
11	3	7,5
18	2	8,0
19	2	7,75
20	3	8,0
25	2	7,75
29	2	7,75
30	3	7,75
31	3	8,0
45	2	7,75
51	3	7,75
60	2	8,0
66	2	7,75



Продовження таблиці 2

68	2	8,0
75	3	8,0
100	2	8,0
200	2	10,0

Таблиця 3

Порівняння біологічних характеристик MVA дикого типу та Vero-MVA

Маркер	MVA дикого типу	Vero-MVA (100-й пасаж)	Vero-MVA-200
CPE в моно шарових клітинних культурах (засіяний 1 MOI)	Закруглення та лізис клітин після дня 5 (90% CPE)	Закруглення та лізис клітин після дня 5 (100% CPE)	Закруглення та лізис клітин після днів 3-5 (100% CPE)
Титр оптимального збору	$10^{8,0}$ KID <sub>50</sub> /мл	$10^{7,75}$ KID <sub>50</sub> /мл	$10^{10,0}$ KID <sub>50</sub> /мл
Абортивна репродукція вірусу в непермісивних клітинних системах	Так	Так	Так
Знижена вірулентність щодо людей та тварин	Так	Так	Так: зовсім невірулентний
Контагіозність	Ні	Ні	Ні
Характер первинних бляшок на ворсинчастій оболонці алантоїсу	Немає проліфераційних вузликів, без некрозу	Немає проліфераційних вузликів, без некрозу	Немає проліфераційних вузликів, без некрозу
Гемаглютинація (еритроцити курчати)	Негативна	Негативна	Негативна
Інактивація β-пропіолактоном	Кінетика першого порядку для 0,05%	Кінетика першого порядку для 0,05%	Кінетика першого порядку для 0,04-0,05%
Захисний ефект в провокаційній пробі вірусом везикулярного стоматиту (VSV) на мишенятах	Так	Так	Так
Токсичність для людей та тварин	Ні	Ні	Ні
Стимуляція цитокінів	Інтерферон α, IL-2 та 12, циклоспорин А (CSA)	Інтерферон α, IL-2 та 12, CSA	Інтерферон α та γ, IL-1,2 та 12, CSA
Активация фагоцитозу, природних клітин-вбивць та Т-лімфоцитів	Так	Так	Так, підвищена

Таблиця 4

Швидкість репродукції Vero-MVA та MVA дикого типу, виражена в KID<sub>50</sub>/мл, в різних системах клітинних культур

Система клітинної культури	Vero-MVA (31 пасаж у Vero)	MVA дикого типу (575 пасажів у первинних фібробластах курячих ембріонів)
<sup>1)</sup> Vero (клітини нирок африканської зеленої мавпи)	8,0	4,5
Первинні фібробласти курячих ембріонів	4,5	8,5
<sup>1,2)</sup> HL (легені людини)	3,0	2,5
<sup>1,2)</sup> HEP-2 (епідермоїдна карцинома людини)	3,0	2,5
<sup>1,2)</sup> HeLA (рак ший людини)	2,75	2,75
<sup>1,2)</sup> BHK (клітини нирок хом'яка)	5,75	5,25
<sup>1,2)</sup> MDBK (клітини бичачих нирок)	3,5	3,5
<sup>1,2)</sup> PK-15 (клітини нирок свині)	3,25	3,5

<sup>1)</sup> Безперервна клітинна лінія, одержана з тканини та виду, вказаних у дужках.<sup>2)</sup> Клітинні лінії одержані з колекції Інституту медичної мікробіології (Мюнхен, Германія).

Таблиця 5

Порівняння MVA дикого типу (572 пасажі у фібробластах курячих ембріонів (CEF))  
з Vero-MVA-200 (200 пасажів у клітинах Vero)

Маркер	MVA дикого типу	Vero-MVA-200
Генетичні маркери (порівняння зі штамом поксві- русу, ізольованим в Анкарі)	3 делеції в лівій кінцевій ділянці (ін- вертований кінцевий повтор) Розмір геному зменшений з 208 до 178 т.п.н. Втрата 15% молекулярної ваги вихід- ного геному Втрата рецептора інтерферону	4 делеції в лівій кінцевій ділянці Подальше зменшення розміру гено- му до 172 т.п.н. Втрата 20% молекулярної ваги вихід- ного геному Додаткова втрата рецепторів, на- приклад, IL-1P
Клітинні маркери	Активация Т-клітин-помічників (CD4 CD8, CD25) Активация природних клітин-вбивць (NK) Абортивна репродукція у клітинах ссавців (за винятком клітин ВНК)	Підвищена активация цитотоксичних Т-лімфоцитів Підвищена активация ІМК-клітин Подальше звуження спектра хазяїв в системах клітинних культур
Цитокін	Інтерферон $\alpha$ , IL-2, IL-12	Інтерферон $\alpha$ та $\gamma$ , IL-1, 2 та 12
Титр вірусу:	CEF: $10^{9,5}$ KID <sub>50</sub> /мл Клітини Vero: $10^{4,0}$ KID <sub>50</sub> /мл	CEF: $10^{4,5}$ KID <sub>50</sub> /мл Клітини Vero: $10^{9,5}$ KID <sub>50</sub> /мл
Імунна система	Зниження активності специфічної імунної системи	Підвищення активності неспецифіч- ної імунної системи
Вірулентність для людей та тварин	низька	відсутня