

У даному винаході пропонується ослаблений вірус, що походить від модифікованого вірусу коров'ячої віспи Ankara і який характеризується втратою здатності до своєї репродукції шляхом реплікації в клітинних лініях людини. У ньому додатково описуються рекомбінантні віруси, що походять від даного вірусу, і застосування вірусу або його рекомбінантних варіантів у якості ліків або вакцини. Додатково пропонується засіб індукції імунної відповіді навіть у хворих із порушеним імунітетом, хворих із природно існуючим імунітетом до вірусу вакцини або хворих у процесі проведення протівірусної терапії.

Модифікований вірус коров'ячої віспи Ankara (MVA) відноситься до вірусу коров'ячої віспи, члену роду *Orthoroxivirus* сімейства *Poxviridae*. MVA був створений у результаті 516 серійних пасажів вірусу коров'ячої віспи (CVA) в ембріональних фібробластах курчат лінії Ankara [у якості огляду дивись Maug, A., et al. *Infection* 3, 6-14 (1975)]. Внаслідок даних численних пасажів отриманий вірус MVA загубив приблизно 31 тисячу основ своєї геномної послідовності і, отже, був описаний як вірус із вкрай обмеженими клітинами-хазяїнами, що відносяться до клітин птахів [Meyer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991)]. На різноманітних тваринних моделях було показано, що отриманий MVA був практично авірулентним (Maug, A. & Danner, K. (1978) *Dev. Biol. Stand.* 41:225-34]. Крім того, даний штам MVA був протестований при клінічних дослідженнях у якості вакцини для імунізації проти віспи людини [Maug et al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. B* 167, 375-390 (1987), Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386-2392 (1974)]. У даному дослідженні було використано більше 120000 людей, включаючи пацієнтів із високим ризиком захворювання, і було доведено, що в порівнянні з вакцинами, що засновані на вірусі коров'ячої віспи, MVA має ослаблену вірулентність або інфекційність, зберігаючи в той же час гарну імуногенність.

У наступні десятиріччя були створені генно-інженерні конструкції MVA для застосування їх у якості вірусного вектора для експресії рекомбінантних генів або в якості рекомбінантної вакцини [Sutter, G. et al. (1994), *Vaccine* 12:1032-40].

У даному відношенні найбільш надзвичайним є те, що навіть незважаючи на те, що Maug et al. у 1970-і роки показали, що MVA є вкрай ослабленим і авірулентним у людини і свавців, у даний час у деяких поданих роботах [Blandchard et al., 1998, *J Gen Virol* 79, 1159-1167; Can-oil & Moss, 1997, *Virology* 238, 198-211; Altenberger, патент США 5185146; Ambrosini et al. 1999, *J Neurosci Res* 55(5), 569] показано, що в клітинних лініях людини і свавців MVA не є цілком ослабленим, тому що в даних клітинах може відбуватися залишкова реплікація. Передбачається, що результати, які подані в даних публікаціях, отримані з різноманітними штамми MVA, тому що використані віруси істотно відрізняються за своїми властивостями, особливо за характером свого росту в різноманітних клітинних лініях.

Характер росту розглядається в якості індикатора ослаблення вірусу. Звичайно штам вірусу рахується ослабленим, якщо він загубив свою здатність або тільки знизив свою здатність до своєї репродукції шляхом реплікації в клітинах-хазяїнах. Зазначений вище факт, що MVA не є цілком не здатним до реплікації в клітинах людини і свавців, порушує питання про те, наскільки абсолютна безпека MVA як вакцини для людини або вектора для рекомбінантних вакцин.

Особливо для вакцини, а також для рекомбінантної вакцини баланс між ефективністю і безпекою вірусного вектора вакцини є вкрай важливим.

Таким чином, задачею винаходу є забезпечення новими штамми, що характеризуються підвищеною безпекою, для розробки більш безпечних продуктів, таких як вакцини або ліки. Більш того, додатковою метою є забезпечення засобами для поліпшення існуючого режиму вакцинації.

Для досягнення перерахованих вище цілей відповідно до кращого здійснення даного винаходу, пропонуються нові віруси коров'ячої віспи, що здатні до репродукції шляхом реплікації в клітинах і в клітинних лініях тварин, які не є людиною, особливо у фібробластах ембріонів курчат (CEF) і в лінії клітин нирки дитинчат хом'ячка ВПК (ECACC 85011433), але не здатні до репродукції шляхом реплікації в клітинних лініях людини.

Відомі штамми вірусів коров'ячої віспи здатні до репродукції шляхом реплікації в, принаймні, деяких клітинних лініях людини, зокрема в клітинній лінії кератиноцитів людини HaCat [Boukamp et al. 1988, *J Cell Biol* 106(3): 761-771]. Реплікація в клітинній лінії HaCat припускає реплікацію *in vivo*, зокрема реплікацію *in vivo* у людини. Звичайно, в розділі прикладів показано, що всі протестовані відомі штамми вірусу коров'ячої віспи, що виявляють здатність до залишкового відтворення шляхом реплікації в HaCat, також реплікуються *in vivo*. Таким чином, винахід переважно відноситься до вірусів коров'ячої віспи, що не здатні до репродукції шляхом реплікації в клітинній лінії HaCat людини. Найбільш переважно винахід стосується штамів вірусу коров'ячої віспи, що не здатні до репродукції шляхом реплікації в будь-якій із таких клітинних ліній людини: клітинної лінії аденокарциноми шийки матки людини HeLa [ATCC No.CCL-2], лінії клітин нирки ембріона людини 293 [ECACC No.85120602], клітинної лінії остеосаркоми кістки людини 143B [ECACC No.91112502] і клітинної лінії HaCat.

Характер росту або ампліфікації/реплікації вірусу звичайно виражається відношенням кількості вірусів, що продукуються інфікованою клітиною (вихід), до кількості, яка спочатку використовується для вихідного інфікування клітин (вхід) ("ампліфікаційне відношення"). Відношенням між виходом і входом, що дорівнює "1", визначається такий ампліфікаційний статус, при якому кількість вірусу, що продукується інфікованими клітинами, є тією ж самою, що і кількість, що вихідно використовується для інфікування клітин. Даний статус вказує на той факт, що інфіковані клітини є пермісивними для вірусної інфекції і репродукції вірусу.

Ампліфікаційне відношення, що складає менше 1, тобто зниження ампліфікації нижче рівня входу є індикатором недостатності реплікації і, таким чином, індикатором ослаблення вірусу. Отже, для винахідників особливий інтерес подає ідентифікація і, в загальному підсумку, виділення штаму, що характеризується ампліфікаційним відношенням менше 1 у декількох клітинних лініях людини, зокрема у всіх клітинних лініях людини 143B, HeLa, 293 і HaCat.

Таким чином, термін "не здатний до репродукції шляхом реплікації" позначає, що вірус відповідно до винаходу характеризується ампліфікаційним відношенням менше 1 у клітинних лініях людини, таких як клітинні лінії 293 [ECACC No.85120602], 143B [ECACC No.91112502], HeLa [ATCC No.CCL-2] і HaCat [Boukamp et al. 1988, J Cell Biol 106(3): 761-71], в умовах, що описані у прикладі 1 даного опису для деяких конкретних штамів MVA. Переважно, щоб ампліфікаційне відношення для вірусу відповідно до винаходу складало 0,8 або менше в кожній із перерахованих вище ліній HeLa, HaCat і 143B.

У прикладі 1 і в таблиці 1 показано, що віруси відповідно до даного винаходу не здатні до репродукції шляхом реплікації в жодній із клітинних ліній 143B, HeLa і HaCat. Особливий штам відповідно до даного винаходу, що був використаний у прикладах, був призначений на збереження в Європейську колекцію клітинних культур під номером V00083008. Даний штам позначається у всьому описі як "MVA-BN".

Відомі штами MVA виявляють здатність до залишковій реплікації в, принаймні, однієї з протестованих клітинних ліній людини (Фіг.1, приклад 1). Всі відомі штами вірусів коров'ячої віспи виявляють здатність до, принаймні, деякої реплікації в клітинній лінії HaCat, у той час як штами MVA відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN, не виявляють здатності до відтворення шляхом реплікації в клітинах HaCat. У більш докладному викладі MVA-BN характеризуються ампліфікаційним відношенням від 0,05 до 0,2 у лінії клітин нирки ембріона людини 293 [ECACC No.85120602]. У клітинній лінії остеосаркоми кістки людини 143B [ECACC No.91112502] відношення знаходиться в 1 діапазоні від 0,0 до 0,6. Для клітинної лінії аденокарциноми шийки матки людини HeLa [ATCC No.CCL-2] і клітинної лінії кератиноцитів людини HaCat [Boukamp et al. 1988, J Cell Biol 106(3): 761-71] ампліфікаційне відношення знаходиться в діапазоні від 0,04 до 0,8 і від 0,02 до 0,8, відповідно. MVA-BN характеризується ампліфікаційним відношенням від 0,01 до 0,06 у клітинах нирки африканської зеленої мартишки [CV1: ATCC No.CCL-70]. Таким чином, MVA-BN, що є зразком штаму відповідно до даного винаходу, не здатний до відтворення шляхом реплікації в жодній із протестованих клітинних ліній.

Ампліфікаційне відношення MVA-BN дорівнює величині, безсумнівно, вище 1 у фібробластах ембріонів курчат (CEF: первинні культури) або в лінії клітин нирки дитинчат хом'ячка BHK [ATCC No.CRL-1632]. Як відзначалося вище, відношення, що складає більше "1", вказує на репродукцію шляхом реплікації, тому що кількість вірусів, що продукується інфікованими клітинами, збільшується в порівнянні з кількістю вірусів, що використовувалась для інфікування клітин. Отже, вірус може легко розмножуватися й ампліфікуватися в первинних культурах CEF із відношенням вже 500 або в клітинах BHK із відношенням вище 50.

У конкретному здійсненні даного винаходу винахід стосується похідних вірусу, що депонований під № ECACC V0083008. "Похідні" вірусів, що депоновані під № ECACC V0083008, позначають віруси, що виявляють за змістом ті ж самі реплікаційні характеристики, що і депонований штам, але такі, що мають відмінності, в одній або більш частин свого генома. Віруси, що мають ті ж самі "реплікаційні характеристики", що і депонований вірус, являють собою віруси, що реплікуються з подібними ампліфікаційними відношеннями, що і депонований штам, у клітинах CEF і клітинних лініях BHK, HeLa, HaCat і 143B, і який виявляють подібну реплікацію *in vivo* при визначенні на моделі трансгенної миші AGR129 (дивися нижче).

У кращому здійсненні штами вірусу коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN і його похідні, характеризуються відсутністю здатності реплікуватися *in vivo*. У контексті даного винаходу "відсутність здатності реплікуватися *in vivo*" відноситься до вірусів, що не реплікуються в клітинах людини і мишиної моделі, що описана нижче. "Відсутність здатності реплікуватися *in vivo*" може бути визначене переважно на мишах, що не здатні продукувати зрілі В і Т клітини. Прикладом таких мишей є трансгенні миші моделі AGR129 (отримані від

Mark Sutler, Institute of Virology, University of Zurich, Швейцарія). Дана лінія мишей характеризується спрямованими генетичними ушкодженнями в генах рецептора IFN типу I (IFN- α /P) і типу II (IFN- γ) і в RAG. Через дані ушкодження миші не мають системи IFN і не здатні продукувати зрілі B і T клітини й в результаті цього характеризуються істотно порушеним імунітетом і високою сприйнятливістю до реплікації вірусів. Замість мишей AGR129 може бути використана будь-яка інша лінія мишей, що не спроможна продукувати зрілі B і T клітини й в результаті цього характеризується істотно порушеним імунітетом і високою сприйнятливістю до реплікації вірусів. Зокрема, віруси відповідно до даного винаходу не вбивають мишей AGR129 протягом періоду часу, принаймні, 45 днів, більш переважно протягом, щонайменше, 60 днів, найбільше переважно протягом 90 днів після інфікування мишей шляхом внутрішньо очеревиного введення 10^7 БОЕ вірусу. Переважно, щоб віруси, що виявляють "відсутність здатності реплікуватися *in vivo*", додатково характеризувалися тим, що жодного вірусу не могло виявлятися в органах або тканинах мишей AGR129 через 45 днів, переважно через 60 днів і найбільше переважно через 90 днів після інфікування мишей шляхом внутрішньо очеревиного введення 10^7 БОЕ вірусу. Докладна інформація про дослідження по інфікуванню мишей AGR129 і тестах, що застосовуються для визначення того, чи може вірус виявлятися в органах або тканинах інфікованих мишей, може бути знайдена в розділі прикладів.

У кращому здійсненні штами вірусу коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN і його похідні, характеризуються більш високою імуногенністю в порівнянні з відомим штамом MVA 575 при визначенні на моделі мишей із летальним інфікуванням. Подробиці даного експерименту описані в прикладі 2 поданому нижче. Коротенько, у такій моделі невакциновані миші вмирають після інфікування реплікативними компонентами штамів вірусів коров'ячої віспи, такими як штам L929 TK+ Western Reserve або IHD-J. У контексті описи моделі з летальним зараженням, "зараженням" позначається інфікування реплікативними компонентами вірусів коров'ячої віспи. Через чотири дні після зараження мишей звичайно забивають і визначають титр вірусів у яєчниках за допомогою стандартних тестів утворення бляшок із застосуванням клітин VERO (для більш докладного опису дивися поділ прикладів). Титр вірусів визначають у невакцинованих мишей і в мишей, вакцинованих вірусною вакциною відповідно до даного винаходу. Більш конкретно, віруси відповідно до даного винаходу характеризуються тим, що в даному тесті після вакцинації 10^2 TCID₅₀/мл вірусами відповідно до даного винаходу титри вірусів у яєчнику знижені, щонайменше, на 70%, переважно, щонайменше, на 80%, більш переважно, щонайменше, на 90% у порівнянні з невакцинованими мишами.

У кращому здійсненні віруси коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN і його похідні, придатні для імунізації шляхом первинного/повторного введення вакцини. Існують численні повідомлення, що припускають, що режими первинної/повторної імунізації з застосуванням MVA у якості вектора для доставки індуюють слабкі імунні відповіді і поступаються режиму первинної імунізації за допомогою ДНК і повторної імунізації MVA [Schneider et al., 1998, Nat. Med. 4; 397-402]. В усіх даних дослідженнях застосовувалися штами MVA, що відрізняються від вірусів коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу. Для пояснення слабкої імунної відповіді при застосуванні MVA для первинного і повторного введення була висунута гіпотеза про те, що антитіла, що вироблені проти MVA при первинному введенні, нейтралізують MVA, які вводяться при повторній імунізації, запобігаючи ефективно підвищенню імунної відповіді. На противагу цьому, режими з первинною імунізацією ДНК і повторною імунізацією MVA, як повідомляється, є прекрасними в плані генерації антитіл із високою авідністю, тому що при даному режимі здатність ДНК ефективно приміювали імунну відповідь сполучається з властивостями MVA посилювати дану відповідь при повторній імунізації у відсутність раніше існуючого імунітету по відношенню до MVA. Ясно, що, якщо раніше існуючий імунітет до MVA і/або вірусу коров'ячої віспи запобігає посиленню імунної відповіді після повторної імунізації, то застосування MVA у якості вакцини або ліків повинно мати обмежену силу, особливо в хворих, що були вакциновані проти віспи. Проте, відповідно до додаткового здійснення вірус коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN і його похідні, також як відповідні рекомбінантні віруси, що включають гетерологічні послідовності, можуть бути використані для ефективних первинної премійованої і наступної посилюючої імунних відповідей у інтактних тварин, а також у тварин з імунітетом, що передіснує, стосовно вірусів віспи. Таким чином, вірус коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу індукуює, принаймні, за змістом той же рівень імунітету при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи.

Вірус коров'ячої віспи розглядається як такий, що індукуює, принаймні, за змістом той же рівень імунітету при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої

віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи, якщо CTL (ЦТЛ) відповідь при вимірі в одному із таких двох тестів ("тест 1" і "тест 2"), переважно в обох тестах, є, принаймні за змістом тим же самим при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи. Більш переважно, щоб CTL відповідь після первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи був вище, принаймні, в одному із тестів у порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи. Найбільш переважно, щоб CTL відповідь була вище в обох з наступних тестів.

Тест 1: для первинного введення вірусу коров'ячої віспи/повторного введення вірусу коров'ячої віспи проводять первинну імунізацію 6-8 тижневих мишей BALB/c (H-2d) шляхом внутрішньовенного введення 10^7 TCID₅₀ вірусу коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, що експресують мишачий політоп, [як описано в Thomson et al., 1988, J. Immunol. 160, 1717], і повторно імунізують тією ж кількістю того ж вірусу, що вводиться тим же шляхом через три тижня. Для даної цілі необхідно створити конструкцію рекомбінантного вірусу коров'ячої віспи, що експресує зазначений політоп. Способи створення конструкцій таких рекомбінантних вірусів відомі спеціалісту в даній області техніки й описуються більш докладно нижче. У випадку режимів первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи первинну вакцинацію проводять шляхом внутрішньо м'язового введення мишам 50мкг ДНК, що експресують той же самий антиген, що і вірус коров'ячої віспи; при повторному введенні вводять вірус коров'ячої віспи точно тим же шляхом, що й у випадку первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи. Плазмідна ДНК, що експресує політоп, описана також у зазначеній вище публікації Thomson et al. У випадку обох режимів розвиток CTL відповіді проти епітопів SYIPSAEKI, RPQASGVYM імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи. Плазмідна ДНК, що експресує політоп, описана також у зазначеній вище публікації Thomson et al. У випадку обох режимів розвиток CTL відповіді проти епітопів SYIPSAEKI, RPQASGVYM і/або YPHFMPNTL визначають через два тижні після повторного введення. Визначення CTL відповіді переважно здійснюють шляхом використання аналізу ELISPOT, [як описано Schneider et al., 1998, Nat. Med. 4, 397-402], і подано в розділі прикладів нижче для одного конкретного вірусу відповідно до даного винаходу. Вірус відповідно до даного винаходу характеризується в даному експерименті тим, що імунний CTL відповідь проти зазначених вище епітопів, що індукуються первинним введенням вірусу коров'ячої віспи/повторним введенням вірусу коров'ячої віспи, є за змістом тим же самим, переважно, принаймні, тим же самим, що і індукує первинним введенням ДНК/повторним введенням вірусу коров'ячої віспи при оцінці по числу клітин, що продукують IFN- γ /10⁶ клітин селезінки (дивися також експериментальний розділ).

Тест 2: даний тест в основному відповідає тесту 1. Проте замість використання в/в введення 10^7 TCID₅₀ вірусу коров'ячої віспи, як у випадку тест 1, у даному тесті 10^8 TCID₅₀ вірусу коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу вводять підшкірно для первинної імунізації і для повторної імунізації. Вірус відповідно до даного винаходу характеризується в даному експерименті тим, що імунна CTL відповідь проти епітопів, що зазначені вище, що індукується первинним введенням вірусу коров'ячої віспи/повторним введенням вірусу коров'ячої віспи, є за змістом тим же самим, переважно, принаймні, тим же самим, що і індукує первинним введенням ДНК/повторним введенням вірусу коров'ячої віспи при оцінці по числу клітин, що продукують IFN- γ /10⁶ клітин селезінки (дивися також експериментальний поділ).

Сила CTL відповіді, що виміряна в одному із тестів, поданих вище, відповідає рівню захисту.

Таким чином, віруси відповідно до даного винаходу особливо підходять для цілей вакцинації.

У цілому вірус відповідно до даного винаходу характеризується наявністю, принаймні, однієї з таких властивостей:

(i) здатністю до репродукції шляхом реплікації у фібробластах ембріонів курчат (CEF) і в клітинній лінії BHK, але відсутністю здатності до репродукції шляхом реплікації в клітинній лінії HaCat людини,

(ii) відсутністю здатності до реплікації *in vivo*,

(iii) індукцією більш високого імунітету в порівнянні з відомим штамом MVA 575 (ECACC VOO 120707) у моделі летального зараження і/або

(iv) індукцією, принаймні, за змістом того ж самого рівня імунітету при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи.

Переважно вірус коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу має, принаймні, дві з зазначених вище властивостей, більш переважно, принаймні, три з

зазначених вище властивостей. Найбільш кращими є віруси коров'ячої віспи, що мають усі зазначені вище властивості.

У додатковому здійсненні винахід стосується набору для вакцинації, що включає вірус відповідно до даного винаходу для первинної вакцинації ("приміювання") в одному флаконі/контейнері і для повторної вакцинації ("бустинга") у другому флаконі/контейнері. Вірус може являти собою нерекомбінантний вірус коров'ячої віспи, тобто вірус коров'ячої віспи, що не містить гетерологічних нуклеотидних послідовностей. Прикладом такого вірусу коров'ячої віспи є MVA-BN і його похідні. У альтернативному варіанті вірус може являти собою рекомбінантний вірус коров'ячої віспи, що містить додаткові нуклеотидні послідовності, що є гетерологічними стосовно вірусу коров'ячої віспи. Як зазначено в інших розділах опису, гетерологічні послідовності можуть кодувати епітопи, що індують відповідь імунної системи. Таким чином, можна застосовувати рекомбінантний вірус коров'ячої віспи для вакцинації проти білків або агентів, що включають зазначений епітоп. Віруси можуть бути включені до складів, як більш докладно показано нижче.

Кількість вірусу, що може бути використане для кожної вакцинації, зазначено вище.

Спеціалісту в даній області техніки відомо як можна одержати віруси коров'ячої віспи, що мають, щонайменше, одну з таких властивостей:

- здатність до репродукції шляхом реплікації у фібробластах ембріонів курчат (CEF) і в лінії клітин нирок дитинчат хом'ячка BHK, але відсутність здатності до репродукції шляхом реплікації в клітинній лінії кератиноцитів людини HaCat,
- відсутність здатності до реплікації *in vivo*,
- індукція більш високого імунітету в порівнянні з відомим штамом MVA - 575 у моделі летального зараження і/або
- індукція, принаймні, за змістом того ж самого рівня імунітету при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи.

Спосіб одержання такого вірусу може включати такі стадії:

(i) введення відомого штаму вірусу коров'ячої віспи, переважно MVA 574 або MVA 575 (ECACC V00120707) у клітини, відмінні від клітин людини, у яких вірус здатний до репродукції шляхом реплікації, де клітини, відмінні від клітин людини, переважно обрані з клітин CEF і клітинної лінії BHK,

(ii) виділення/підвищення концентрації вірусних часток із даних клітин і (iii) аналіз того, чи буде отриманий вірус мати, принаймні, одну з бажаних біологічних властивостей, як зазначено вище, де зазначені вище стадії можуть необов'язково повторюватися доти, поки не буде отриманий вірус із бажаними реплікативними характеристиками. Винахід додатково відноситься до вірусів, які отримані даним способом відповідно до даного винаходу. Способи того, як можуть бути визначені бажані біологічні властивості, пояснені в інших частинах даного опису.

Застосовуючи даний засіб, винахідники ідентифікували і виділили в результаті декількох циклів очищення клона штам відповідно до даного винаходу, починаючи з пасажу 575 ізолята MVA (MVA 575). Даний новий штам відповідає штаму з депонентним номером ECACC V00883008, що зазначений вище.

Характер росту вірусів коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема характер росту MVA-BN, вказує на те, що штами відповідно до даного винаходу істотно випереджають будь-який інший схарактеризований до даного часу ізолят MVA у відношенні ослаблення дії в клітинних лініях людини і відсутності здатності до реплікації *in vivo*. Штами відповідно до даного винаходу є, отже, ідеальними кандидатами для розробки більш безпечних продуктів, таких як вакцини або ліків, як буде описано нижче.

У однім здійсненні вірус відповідно до даного винаходу, зокрема MVA-BN і його похідні, застосовують у якості вакцини проти вірусних захворювань людини, що супроводжуються висипкою, таких як віспа. У додатковому здійсненні вірус відповідно до даного винаходу може бути рекомбінантним, тобто може експресувати гетерологічні гени, такі як, наприклад, антигени або епітопи, гетерологічні стосовно вірусу, і може, таким чином, бути придатним у якості вакцини для індукції імунної відповіді проти гетерологічних антигенів або епітопів.

Термін "імунна відповідь" позначає реакцію імунної системи при надходженні в організм чужорідної речовини або мікроорганізму. По визначенню імунна відповідь підрозділяють на специфічну і неспецифічну реакції, хоча обидві вони тісно переплітаються. Неспецифічна імунна відповідь являє собою негайний захист від широкої розмаїтості чужорідних речовин і інфекційних агентів. Специфічна імунна відповідь являє собою захист, що виникає після лаг-періоду після першого зараження організму речовиною. Специфічна імунна відповідь є вискоєфективним і визначає той факт, що індивідуум, що перехворів конкретною інфекцією, стає захищеним проти даної конкретної інфекції. Таким чином, повторне інфікування тим же самим або дуже близьким інфекційним агентом викликає набагато більше

згладжені симптоми або зовсім не викликає симптомів, тому що вже є "імунитет, що передіснує," у відношенні даного агента. Такий імунитет і імунологічна пам'ять, відповідно, зберігається протягом тривалого часу, у деяких випадках навіть напротязі усього життя. Відповідно, індукція імунологічної пам'яті може бути використана при вакцинації.

"Імунна система" позначає комплекс органів, що беруть участь у захисті організму від чужорідних речовин і мікроорганізмів. Імунна система включає клітинну складову, що включає декілька типів клітин, таких як, наприклад, лімфоцити й інші клітини, що відбуваються від білих клітин крові, і гуморальну складову, що включає невеличкі пептиди і чинники комплемента.

"Вакцинація" означає те, що організм навантажують інфекційним агентом, наприклад, ослабленою або інактивованою формою зазначеного інфекційного агента, для індукції специфічного імунітету. Термін вакцинація також охоплює зараження організму рекомбінантними вірусами коров'ячої віспи відповідно до даного винаходу, зокрема, рекомбінантним MVA-BN і його похідними, що експресують антигени або епітопи, що є гетерологічними стосовно вірусу. Приклади таких епітопів даються в інших частинах опису й охоплюють, наприклад, епітопи білків, що походять від інших вірусів, таких як вірус Денге, вірус гепатиту С, ВІЛ або епітопи, що походять від білків, що асоційовані з розвитком пухлин і раку. Після введення рекомбінантного вірусу коров'ячої віспи в організм епітопи експресуються і презентуються імунній системі і може індукуватись специфічна імунна відповідь проти даних епітопів. Організм, таким чином, є імунізованим проти агента/білка, що містить епітоп, що кодується рекомбінантним вірусом коров'ячої віспи.

"Імунитет" означає частковий або повний захист організму від захворювань, що викликаються інфекційним агентом, що обумовлений успішною ліквідацією попереднього інфікування зазначеним інфекційним агентом або його характерною частиною. Імунитет заснований на існуванні, індукції й активації спеціалізованих клітин імунної системи.

Як підкреслювалося вище, в одному здійсненні винаходу рекомбінантні віруси відповідно до даного винаходу, зокрема, рекомбінантний MVA-BN і його похідні, містять, принаймні, одну гетерологічну послідовність нуклеїнової кислоти. Термін "гетерологічна" застосовують тут далі для будь-якого сполучення послідовностей нуклеїнової кислоти, що у звичайних умовах не знаходять у близькому зв'язку з вірусом у природі, такий вірус називають також "рекомбінантний вірус".

Відповідно до додаткового здійснення даного винаходу гетерологічні послідовності являють собою переважно антигенні епітопи, що обрані з будь-якого джерела, що не є вірусом коров'ячої віспи. Найбільш переважно, щоб зазначений рекомбінантний вірус експресував один або більше антигенних епітопів від *Plasmodium falciparum*, *Mycobacteria*, *Influenza virus*, від вірусів, що обрані із сімейства *Flaviviruses*, *Paramyxoviruses*, вірусів гепатиту, вірусів імунодефіциту людини, або від вірусів, що викликають геморагічну лихоманку, таких як *Hantaviruses* або *Filoviruses*, тобто вірусу Ебола або Марбург.

Відповідно до ще одного здійснення, але також на додаток до зазначеного вище вибору антигенних епітопів, гетерологічні послідовності можуть бути обрані з інших джерел віспи і коров'ячої віспи. Дані вірусні послідовності можуть бути застосовані для модифікації спектра хазяїв або імуногенності вірусу.

У додатковому здійсненні вірус відповідно до даного винаходу може кодувати гетерологічний ген/нуклеїнову кислоту, що експресують терапевтичну сполуку. "Терапевтична сполука", яка кодується гетерологічною нуклеїновою кислотою у вірусі, може являти собою, наприклад, терапевтичну нуклеїнову кислоту, таку як антизмістова нуклеїнова кислота, або пептид, або білок з бажаною біологічною активністю.

Відповідно до додаткового кращого здійснення експресія гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти знаходиться переважно, але не винятково, під транскрипційним контролем промотору вірусу віспи, більш переважно промотору вірусу коров'ячої віспи.

Відповідно до ще одного здійснення вставка гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти здійснюється в область вірусного генома, що не являється необхідною. У іншому переважному здійсненні винаходу гетерологічну послідовність нуклеїнової кислоти вставляють у природно існуючий сайт делеції генома MVA [розкритий у патенті РСТ/EP96/02926]. Методи вставки гетерологічних послідовностей у геном вірусу віспи відомі спеціалістам уданій області техніки.

Відповідно до іншого додаткового кращого здійснення винахід включає також геном вірусу, його рекомбінантні варіанти або його функціональні частини. Такі вірусні послідовності можуть бути використані для ідентифікації або виділення вірусу або його рекомбінантних варіантів, наприклад, із застосуванням ПЦР, методів гібридизації або за допомогою традиційних тестів ELISA. Більш того, такі вірусні послідовності можуть експресуватись експресійним вектором з одержанням білка, що кодує або пептида, що потім можуть доповнювати делеційні мутанти вірусу, у яких відсутня вірусна послідовність, що утримується в експресійному

векторі.

"Функціональна частина" вірусного генома позначає частину повної геномної послідовності, що кодує фізичний об'єкт, такий як білок, домен білка, епітоп білка. Функціональна частина вірусного генома також описує частину повної геномної послідовності, що кодує регуляторні елементи або частини таких елементів з індивідуалізованою активністю, такі як промотор, енансер, цис- або транс-діючі елементи.

Рекомбінантний вірус відповідно до даного винаходу може бути застосований для введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітину-мішень, причому зазначена послідовність є або гомологічною, або гетерологічною стосовно клітини-мішені. Введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітину-мішень може бути застосоване для одержання *in vitro* гетерологічних пептидів або поліпептидів і/або повних вірусів, кодує зазначеною послідовністю. Даний спосіб включає інфікування клітини-хазяїна рекомбінантним MVA, культивування інфікованої клітини-хазяїна в підходящих умовах і виділення і/або підвищення концентрації пептиду, білка і/або вірусу, що продукується зазначеною клітиною-хазяїном.

Більш того, спосіб введення гомологічної або гетерологічної послідовності в клітини може бути застосований для терапії *in vitro* і переважно *in vivo*. Для терапії *in vitro* виділені клітини, що попередньо (*ex vivo*) інфікували вірусом, вводять в організм живої тварини для індукції імунної відповіді. Для терапії *in vivo* вірус або його рекомбінантні варіанти прямо вводять в організм живої тварини для індукції імунної відповіді. У даному випадку клітини навколо місця інокуляції стають інфікованими вірусом або його рекомбінантними варіантами безпосередньо *in vivo*.

Оскільки вірус відповідно до даного винаходу характеризується вкрай обмеженим ростом у клітинах людини і мавп і, таким чином, вкрай ослабленим, він є ідеальним засобом для лікування широкого кола ссавців, включаючи людину. Отже, уданому винаході пропонується також фармацевтична композиція і вакцина, наприклад, для індукції імунної відповіді в організмі живої тварини, включаючи людину. Вірус винаходу є також безпечним при будь-яких інших протоколах терапії.

Фармацевтична композиція може звичайно включати один або більше фармацевтично прийнятних і/або припустимих носіїв, добавок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розріджувачів і/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути вода, фізіологічний розчин, гліцерин, етанол, агенти, що звожують або емульгують, речовини, що буферують, або тому подібне. Підходящими носіями є звичайно великі молекули, що повільно метаболізуються, такі як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, сополімери амінокислот, агрегати ліпідів або тому подібне.

Для одержання вакцин вірус або його рекомбінантні варіанти відповідно до винаходу перекладають у фізіологічно прийнятну форму. Це може бути зроблено, базуючись на досвіді роботи з одержанням вакцин вірусу віспи для вакцинації проти натуральної віспи [як описане Stickl, H. et al. (1974) Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392]. Наприклад, очищений вірус із титром 5×10^8 TCID₅₀/мл у приблизно 10мМ Трис, 140мМ NaCl, pH7,4 бережуть при -80°C. Для готування вакцини для уколів, наприклад, 10^2 - 10^8 вірусних часток ліофілізують у 100мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS) при 2% пептона і 1% альбуміну людини в ампулі, переважно в скляній ампулі. Альтернативно, вакцина для уколів може бути отримана за допомогою поетапної ліофілізації вірусу в композиції. Дана композиція може містити додаткові добавки, такі як маніт, декстран, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон, або інші добавки, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні білка (наприклад, сироватковий альбумін людини), що підходять для введення *in vivo*. Скляну ампулу потім започоюють і її можна берегти при температурі між 4°C і кімнатної протягом декількох місяців. Проте коли відсутня необхідність використання ампули її бережуть переважно при температурі нижче -20°C.

Для вакцинації або терапії ліофілізат може бути розчинений у від 0,1 до 0,5мл водяного розчину, переважно фізіологічного розчину або Трис буфера і введений або системно, або місцево, тобто за допомогою парентерального, внутрішньо м'язово або будь-якого іншого шляху введення, що відомий спеціалісту в даній області техніки. Шлях введення, доза і кількість введень може бути оптимізовано спеціалістом уданій області техніки відомим засобом.

Додатково у відповідності до іншого здійснення вірус відповідно до даного винаходу особливо корисний для індукції імунних відповідей у тварин із порушеним імунітетом, наприклад, у мавп, інфікованих SIV (CD4<400/мкл крові), або в людей із порушеним імунітетом. Термін "порушений імунітет" описує стан імунної системи індивідуума, у якого виникають тільки неповні імунні відповіді або який характеризується зниженою ефективністю захисту від інфекційних агентів. Ще більш цікавим і тим, що знаходиться у відповідності з ще одним додатковим здійсненням є той факт, що вірус відповідно до даного винаходу може посилювати імунні відповіді у тварин або людей із порушеним імунітетом навіть при наявності в

даних тварин або людей імунітету, що передіснує, до вірусу віспи. Особливо цікавим було те, що вірус відповідно до даного винаходу може посилювати імунні відповіді також у тварин або людей, що проходять курс антивірусної терапії, наприклад, терапії проти ретровірусів. "Антивірусна терапія" включає концепції лікування, що спрямовані на знищення або придушення вірусної інфекції, включаючи, наприклад, (i) застосування аналогів нуклеотидів, (ii) застосування інгібіторів ферментативної активності вірусів або їх складанню або (iii) застосування цитокінів для впливу на імунні відповіді хазяїна.

Відповідно до ще одного додаткового здійснення вакцина є особливо, але не винятково, придатною в області ветеринарії, наприклад, для імунізації проти інфекції, що викликається вірусом віспи тварин. У дрібних тварин інюкуляція для імунізації переважно виконується парентерально або інтраназально, у той час як у більш значних тварин або в людей кращою є підшкірна, внутрішньо м'язова або пероральна інюкуляція.

Винахідники знайшли, що ін'єкція вакцини, що містить ефективну дозу тільки 10^2 TCID₅₀ (дози інфікування в тканинній культурі) вірусу відповідно до даного винаходу, уже достатня для індукції повного імунітету проти вірусу коров'ячої віспи дикого типу при контрольному зараженні їм мишей. Це є особливо несподіваним, тому що такий високий ступінь ослаблення вірусу відповідно до даного винаходу повинен, як очікувалось, впливати негативно і, в результаті цього, знижувати його імуногенність. Таке припущення ґрунтується на уявленні про те, що для індукції імунної відповіді антигенні епітопи потребують у презентації імунній системі в достатній кількості. Вірус, що є вкрай ослабленим, і, таким чином, не реплікується, може презентувати тільки дуже невеличку кількість антигенних епітопів, тобто стільки, скільки він сам включає. Дана кількість антигену, що несуть вірусні частки, не розглядається як достатня для індукції сильної імунної відповіді. Проте вірус відповідно до винаходу стимулює, навіть при дуже низькій ефективній дозі тільки в 10^2 TCID₅₀, сильну й захисну імунну відповідь у моделі миша/зараження вірусом коров'ячої віспи. Вірус відповідно до даного винаходу, таким чином, характеризується несподіваною і навіть збільшеною імуногенністю в порівнянні з іншими схарактеризованими до даного часу штамами MVA. Така висока імуногенність робить вірус відповідно до даного винаходу і будь-яку вакцину, що пов'язана з ним, особливо придатними для застосування у тварин і людей із порушеним імунітетом.

Відповідно до ще одного здійснення винаходу вірус застосовують у якості ад'юванта. "Ад'ювант" у контексті даного опису означає підсилювач специфічної імунної відповіді у вакцинах. "Застосування вірусу в якості ад'юванта" означає включення вірусу у вже існуючу вакцину для додаткової стимуляції імунної системи хворого, що одержує вакцину. Ефект антигенного епітопа, що імунізує, у більшості вакцин часто посилюється при добавці так названого ад'юванта. Ад'ювант коstimулює імунну систему шляхом індукції більш сильної специфічної імунної реакції проти антигенного епітопа вакцини. Дана стимуляція може регулюватися чинниками системи неспецифічного імунітету, такими як інтерферон і інтерлейкін. Отже, у додатковому здійсненні винаходу вірус застосовують у ссавців, включаючи людину, для активації, підтримки або придушення імунної системи і переважно для активації імунної відповіді проти будь-якої антигенної детермінанти. Вірус може бути також застосований для підтримки імунної системи у випадку збільшеної сприйнятливості до інфекцій, як у випадку стресу.

Вірус, що використовується у якості ад'юванта, може бути нерекомбінантним вірусом, тобто вірусом, що не містить гетерологічну ДНК у своєму геномі. Прикладом даного типу вірусу є MVA-BN. У альтернативному варіанті, вірус, що використовується в якості ад'юванта, є рекомбінантним вірусом, що містить у своєму геномі послідовності гетерологічної ДНК, що не присутні у вірусному геномі в природі. Для застосування в якості ад'юванта рекомбінантна вірусна ДНК вірусу переважно містить і експресує гени, що кодують імуностимулюючі пептиди, або білки, такі як інтерлейкіни.

Відповідно до додаткового здійснення переважно, щоб вірус був інактивованим при використанні в якості ад'юванта або додаванні до іншого вакцини. Інактивація вірусу може бути здійснена, наприклад, за допомогою прогрівання або хімічних агентів, як відомо в даній області техніки. Переважно, щоб вірус інактивувався за допомогою β -пропіолактона. Відповідно до даного здійснення винаходу інактивованний вірус може бути доданий до вакцин проти численних інфекційних або проліферативних захворювань для збільшення імунної відповіді хворого на дане захворювання.

Винахід серед іншого включає наступне по одному або в сполученні: вірус коров'ячої віспи, що має, принаймні, одну з таких властивостей:

- здатність до репродукції шляхом реплікації у фібробластах ембріонів курчат (CEF) і в лінії клітин нирок дитинчат хом'ячка BHK, але відсутність здатності до репродукції шляхом реплікації в клітинній лінії кератиноцитів людини HaCat,
- відсутність здатності до реплікації *in vivo*,

- індукція більш високого імунітету в порівнянні з відомим штамом MVA 575 у моделі летального зараження і/або

- індукція, принаймні, за змістом того ж самого рівня імунітету при режимах первинної імунізації вірусом коров'ячої віспи/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи в порівнянні з режимами первинної імунізації ДНК/повторної імунізації вірусом коров'ячої віспи.

Вірус, як описано вище, де вірус не здатний до репродукції шляхом реплікації улюблених із таких клітинних ліній людини: лінії клітин нирки ембріона людини 293, клітинної лінії остеосаркоми кістки людини 143B і клітинної лінії аденокарциноми шийки матки людини HeLa.

Вірус, як описано вище, призначений на збереження в Європейську колекцію клітинних культур (ECACC) Salisbury (UK) під номером V00083008 і його похідні.

Вірус, як описано вище, що включає, принаймні, одну послідовність гетерологічної нуклеїнової кислоти.

Вірус, як описано вище, де зазначена послідовність гетерологічної нуклеїнової кислоти обрана з послідовності, що кодує, принаймні один антиген, антигенний епітоп і/або терапевтичну сполуку.

Геном або його функціональні частини, що походять від вірусу, як зазначено вище.

Фармацевтична композиція, що включає вірус, як зазначено вище, і/або геном, і/або його функціональну частину, як зазначено вище, і фармацевтично прийнятний носій, розріджувач і/або добавку.

Вакцина, що включає вірус, як зазначено вище, і/або геном, і/або його функціональну частину, як зазначено вище.

Вірус, як зазначено вище, геном і/або його функціональна частина, як зазначено вище, композиція, як зазначено вище, або вакцина, як зазначено вище, у якості ліків для впливу на імунну відповідь, переважно для його індукції, у живій тварини, включаючи людини.

Вірус, як зазначено вище, фармацевтична композиція, як зазначено вище, вакцина, як зазначено вище, або вірус, як зазначено вище, де вірус, композицію або вакцину вводять у терапевтично ефективних кількостях при першій інокуляції ("інокуляція, що приміює,") і при другій інокуляції ("бустерна інокуляція").

Застосування вірусу, як зазначено вище, і/або генома, як зазначено вище, для одержання ліків або вакцини.

Спосіб введення гомологічної і/або гетерологічної послідовностей нуклеїнової кислоти в клітині-мішені, що включає інфікування клітин-мішеней вірусом, що включає гетерологічні послідовності, як зазначено вище, або трансфекцію клітини-мішені геномом, як зазначено вище.

Спосіб одержання пептида, білка і/або вірусу, що включає

- інфікування клітини-хазяїна вірусом, як зазначено вище,

- культивування інфікованої клітини-хазяїна в підходящих умовах і

- виділення і/або підвищення концентрації пептида, і/або білка, і/або вірусу, які продукуються зазначеною клітиною-хазяїном.

Спосіб впливу на імунну відповідь, переважно його індукції, в організмі живої тварини, включаючи людини, що включає введення вірусу, як зазначено вище, генома і/або його функціональної частини, як зазначено вище, композиції, як зазначено вище, або вакцини, як зазначено вище, тварині або людині, що піддається лікуванню.

Спосіб, як зазначено вище, що включає введення, щонайменше, 10^2 TCID₅₀ (дози інфікування тканинної культури) вірусу.

Спосіб, як зазначено вище, у якому вірус, композицію або вакцину вводять у терапевтично ефективних кількостях при першій інокуляції ("інокуляція, що приміює,") і при другій інокуляції ("бустерна інокуляція").

Спосіб, як зазначено вище, де тварина має порушений імунітет.

Спосіб, як зазначено вище, де тварина має вже існуючий імунітет стосовно вірусу віспи.

Спосіб, як зазначено вище, де тварина піддається противірусній терапії.

Спосіб, де тварина піддається противірусній терапії, що відрізняється тим, що противірусна терапія являє собою терапію проти ретровірусів.

Застосування вірусу, як зазначено вище, його генома і/або функціональної частини, як зазначено вище, у якості ад'юванта.

Засіб збільшення специфічної імунної відповіді проти антигену і/або антигенного епітопа, що включений у вакцину, що включає введення в якості ад'юванта вірусу, як зазначено вище, або генома, як зазначено вище, в організм живої тварини, включаючи людини, що піддається лікуванню вакциною.

Вірус, як зазначено вище, або геном, як зазначено вище, у якості ад'юванта.

Клітина, переважно клітина людини, що містить вірус, як зазначено вище, або геном, або його функціональну частину, як зазначено вище.

Спосіб одержання вірусу коров'ячої віспи, як зазначено вище, що включає такі стадії:

- введення звичайно доступного штаму вірусу коров'ячої віспи, переважно MVA 575 у клітини, що відмінні від клітин людини, у яких вірус здатний до репродукції шляхом реплікації, де клітини, що відмінні від клітин людини, переважно обрані з клітин CEF і клітинної лінії BHK,

- виділення/підвищення концентрації вірусних часток із даних клітин і

- аналіз того, чи буде отриманий вірус мати, щонайменше, одне з біологічних властивостей, як зазначено вище, де зазначені вище стадії можуть необов'язково повторюватися доти, поки не буде отриманий вірус із бажаними реплікативними характеристиками.

Набір для приміюваної/бустерної імунізації, що включає вірус, як зазначено вище, вакцину, як зазначено вище, або вірус у якості ліків, як зазначено вище, для першої інокуляції ("інокуляція, що приміює") у першому флаконі/контейнері і для другої інокуляції ("бустерна інокуляція") у другому флаконі/контейнері.

Застосування вірусу, як зазначено вище, композиції, як зазначено вище, і/або вакцини, як зазначено вище, для одержання вакцини, де вірус, композицію або вакцину вводять при приміюваної інокуляції і де той же вірус або вакцину вводять при бустерній інокуляції.

Фіг.1: Кінетика росту різноманітних штамів MVA у клітинах різних ліній. У частині А) результати згруповані по тестованим штамам MVA, тоді як у частині В) результати згруповані по тестованим лініям клітин. В) Кількість вірусів, виділених із лінії клітин після чотирьох днів (D4) культивування, визначали за допомогою тесту по бляшках і виражали у виді відношення вірусів, виділених через 4 дня, до вихідного прищеплювального матеріалу на 1-й день (D1).

Фіг.2: Захист від летального зараження коров'ячою вістою, що забезпечується вакцинацією MVA-BN або MVA 575. Захист вимірювали по зниженню оваріальних титрів, що визначені за допомогою стандартного тесту по бляшках через 4 дня після контрольного зараження.

Фіг.3: Індукція CTL і захист від зараження грипом, що забезпечується застосуванням різноманітних режимів приміювання-повторної імунізації.

3А: Індукція CTL відповідей на 4 різноманітних H-2^d обмежених епітопа після вакцинації різноманітними сполученнями ДНК або вакцинами MVA-BN, що кодують політоп миші. Мишей BALB/c (по 5 на групу) вакцинували або ДНК (внутрішньо м'язово), або MVA-BN (підшкірно), і мишей піддавали бустерним імунізаціям через три тижня. CTL відповіді на 4 різноманітних епітопа, що кодується вакцинами (TYQRTRALV, грип; SYIPSAEKI, P. Berghei; YPHFMPTNL, Cytomegalovirus; PRQASGVYM, LCV) визначали за допомогою аналізу ELISPOT через 2 тижні після бустерних імунізацій.

3В: Індукція CTL відповідей на 4 різноманітних епітопа після вакцинації різними сполученнями ДНК або вакцинами MVA-BN, що кодують політоп миші. Мишей BALB/c (по 5 на групу) вакцинували або ДНК (внутрішньо м'язово), або MVA-BN (внутрішньо венно), і мишей піддавали бустерним імунізаціям через три тижня. CTL відповіді на 4 різноманітних епітопа, що кодується вакцинами (TYQRTRALV, грип; SYIPSAEKI, P. Berghei; YPHFMPTNL, Cytomegalovirus; PRQASGVYM, LCV) визначали за допомогою аналізу ELISPOT через 2 тижні після бустерних імунізацій.

3С: Частота Т-клітин, що специфічні по відношенню до пептида і MVA, після гомологічної первинної імунізації з застосуванням оптимальної дози (1×10^8 TCID₅₀) рекомбінантного MVA-BN, що вводився підшкірно. Групи з 8 мишей вакцинували двома ін'єкціями сполучень, як зазначено на Фіг. Через два тижні після останньої вакцинації вимірювали кількість специфічних у відношенні пептида спленоцитів за допомогою аналізу INF-гама ELISPOT. Столпчики подають середню кількість специфічних плям плюс/мінус стандартне відхилення від середнього.

Фіг.4: Зараження SIV мавп, що вакциновані MVA-BN nef або MVA-BN.

Фіг.5: Вживаність вакцинованих мавп після ін'єкції SIV.

Фіг.6: Титри антитіл мавп проти MVA-BN. Титри антитіл кожної тварини показані у формі різноманітних значків, а середній титр показаний у виді темного прямокутника.

Фіг.7: Рівні SIV у мавп із порушеним імунітетом (CD4 < 400/мл крові) після вакцинації MVA-BN, що кодує tat. Мавпи попередньо одержували три вакцинації або MVA-BN, або MVA-BN nef (0, 8, 16 тижні), і мавп інфікували патогенним ізолятом SIV (22 тижень). На 100, 102 і 106 тижень (зазначено стрілками) мавп вакцинували MVA-BN tat.

Фіг.8: Рівні SIV у мавп, що піддані антиретровірусній терапії і терапевтичних вакцинацій із застосуванням MVA-BN. Три групи мавп (n=6) інфікували SIV і лікували щодня PMPA (відзначені чорною лінією). На 10 і 16 тижні тварин вакцинували (відзначено стрілками) або сумішами рекомбінантного MVA, або фізіологічним розчином.

Фіг.9: Гуморальна відповідь, що індукована проти SIV, після інфікування і вакцинацій рекомбінантним MVA. Три групи (n=6) мавп інфікували патогенним ізолятом SIV (тиждень 0) і потім піддавали антиретровірусній терапії (PMPA; відзначено товстою лінією). Мавп вакцинували сумішами рекомбінантного MVA

або фізіологічним розчином на 10 і 16 тижні. Антитіла проти SIV визначали з застосуванням лізатів інфікованих Т-клітин у якості антигену за допомогою стандартного ELISA.

Fig.10: Гуморальна відповідь, що індукована проти MVA в інфікованих SIV мавп, які піддані антиретровірусній терапії. Три групи (n=6) мавп інфікували патогенним ізолятом SIV (тиждень 0) і потім піддавали антиретровірусній терапії (PMRA; відзначеною товстою лінією). Мавп вакцинували сумішами рекомбінантного MVA або фізіологічним розчином на 10 і 16 тижні. Антитіла проти MVA визначали за допомогою стандартного ELISA із поглинанням для MVA.

Fig.11: Індукція антитіл проти MVA після вакцинації мишей різноманітними вакцинами проти віспи. Рівень антитіл, вироблених проти MVA після вакцинацій MVA-BN (0 і 4 тижні), порівнювали з традиційними штамми коров'ячої віспи, Elstree і Wyeth, що вводились за допомогою скарифікації хвоста (0 тиждень), MVA 572 (0 і 4 тижні) і MVA-BN і MVA 572, що вводились у формі pre-Elstree вакцини. MVA 572 був поміщений на збереження в Європейську колекцію культур клітин тваринною як ECACC V94012707. Титри визначали за допомогою ELISA із поглинанням, розраховували шляхом лінійної регресії з застосуванням лінійної частини графіка і визначали як розведення, що давало оптичну щільність 0,3. *MVA-BN:MVA-BN значимо ($p > 0,05$) відрізняється від MVA 572:MVA 572.

ПРИКЛАДИ

Такі приклади будуть додатково ілюструвати даний винахід. Спеціалісту в даній області техніки повинно бути добре зрозуміло, що запропоновані приклади ніякою уявою не можуть бути інтерпретовані як обмежуючі придатність технології, що запропонована даним винаходом на даних прикладах.

Приклад 1

Кінетика росту нового штаму MVA в окремих лініях клітин і реплікація *in vivo*

(i) Кінетика росту в лініях клітин:

Для характеристики нового виділеного штаму відповідно до даного винаходу (далі що позначається як MVA-BN) порівнювали кінетику росту даного нового штаму з таких інших штамів MVA, що вже були охарактеризовані.

Експеримент проводили шляхом порівняння кінетики росту таких вірусів у перерахованих нижче первинних клітинах і лініях клітин:

MVA-BN (Вірусне збереження #23, 18.02.99 сирий, титрований у концентрації $2,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл);

MVA, що охарактеризований Altenburger [патент США 5185146] і далі позначається як MVA-HLR;

MVA (пасаж 575), що охарактеризований Anton Mayr [Mayr, A., et al. (1975) Infection 3; 6-14] і далі позначається як MVA-575 (ECACC V00120707); і

MVA-Vero, що охарактеризований [в Міжнародній патентній заявці PCT/EPO 1/02703 (WO 01/68820)] (Вірусне збереження, пасаж 49, #20, 22.03.99 сирий, титрований у концентрації $4,2 \times 10^7$ TCID₅₀/мл).

Застосовували такі первинні клітини і лінії клітин:

CEF Фібробласти ембріонів курчат (щойно отримані з яєць SPF);

HeLa Аденокарцинома (епітеліальна) шийки матки людини, ATCC No.CCL-2;

143В Остеосаркома кістки людини TK-, ECACC No.91112502;

HaCaT Клітинна лінія кератиноцитів людини, Boukamp et al. 1988, J Cell Biol 31 106(3): 761-771;

ВНК Нирки дитинчати хом'ячка, ECACC 85011433;

Vero Фібробласти нирок африканської зеленої мартишки, ECACC 85020299;

CV1 Фібробласти нирок африканської зеленої мартишки, ECACC 87032605.

Для інфікування різноманітні клітини висівали в 6-лункові планшети при концентрації 5×10^5 клітин/лунка і інкубували протягом ночі при 37°C, 5% CO₂ у DMEM (Gibco, Cat. No.61965-026) плюс 2% FCS. Середовище клітинної культури видаляли, і клітини інфікували при приблизно 0,05 тої протягом одного часу при 37°C, 5% CO₂ (для інфікування приймали, що кількість клітин подвоювалося за ніч). Кількість вірусів, використаних для кожного інфікування клітин різного типу, складало 5×10^4 TCID₅₀, і це буде позначатися як запровадження. Клітини потім промивали 3 рази DMEM, після чого добавляли 1мл DMEM, 2% FCS, і планшет лишали інкубуватись протягом 96час (4 днів) при 37°C, 5% CO₂. Дане інфікування зупиняли заморожуванням планшет при -80°C, готових до аналізу титруванням.

Аналіз титруванням (імунозabarвлення специфічним по відношенню до вірусу коров'ячої віспи антитілом).

Для титрування кількості вірусу клітини для тестування висівали в 96-ямкові планшети в RPMI [Gibco, Cat. No.61870-010], 7% FCS, 1% антибіотик/протигрибковий агент [Gibco, Cat. No.15240-062] у концентрації 1×10^4 клітин/лунка і інкубували протягом ночі при 37°C, 5% CO₂. 6-лункові планшети, що містять матеріал експериментів інфікування, піддавали заморожування/відтаювання 3 рази, і одержували розведення від 10^{-1} до 10^{-12} із застосуванням ростового середовища RPMI. Розведення вірусу вносили до клітин для тестування і інкубували протягом п'ятьох днів при 37°C, 5% CO₂ для забезпечення розвитку CPE

(цитопатичного ефекту). Клітини для тестування фіксували (суміш ацетон/метанол 1:1) протягом 10хв., промивали PBS і інкубували з поліклональним антитілом, специфічним у відношенні вірусу коров'ячої віспи [Quartett Berlin, Cat. No.9503-2057] при розведенні 1:1000 у буфері для інкубації протягом однієї години при кімн. темп. Після промивання двічі за допомогою PBS [Gibco, Cat. No.20012-019] добавляли кон'юговане з HPR антитіло проти кролика [Promega Mannheim, Cat. No.W4011] у розведенні 1:1000 у буфері для інкубації (PBS, що містить 3% FCS) протягом однієї години при кімн. темп. Клітини знову двічі промивали PBS і інкубували з розчином, що офарблює, (щойно приготованим 10мл PBS+200мкл насиченого розчину о-діанізидина в 100% етанолі+15мкл H₂O₂) до прояву коричневих плям (друга година). Розчин, що офарблює, видаляли, і добавляли PBS для припинення реакції фарбування. Кожну лунку, що проявила коричнева пляма, відзначали як позитивну у відношенні CPE, і розраховували титр по формулі Кербера (на основі аналізу TCID₅₀) [Kaerber, G. 1931. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162,480].

Віруси застосовували для інфікування дубльованих рядів, з одного боку, CEF і ВНК, що, як очікувалося, є пермісивними для MVA, і, з іншого боку, CV-1, HeLa, 143B і HaCat, що, як очікувалося, є непермісивними для MVA, при низькій множинності інфікування (moi), тобто 0,05 одиниць, що -інфікують, на клітину (5×10⁴ TCID₅₀). Після цього вірусний прищеплювальний матеріал видаляли, і клітини три рази промивали для видалення всіх що залишилися неабсорбованими вірусів. Інфіковані клітини лишали сумарно на чотири дні, коли одержували вірусні екстракти і потім титрували на клітинах CEF. У таблиці 1 і на Фіг.1 показані результати тесту титрування, де розміри подані у виді загальної кількості вірусів, що утворилися через 4 дні після інфікування.

Було показано, що в клітинах CEF (фібробластах куриного ембріона) добре ампліфікуються усі віруси, що можна було очікувати, оскільки CEF є пермісивною лінією клітин для всіх MVA. Крім того, було показано, що усі віруси добре ампліфікуються у ВНК (лінії клітин нирок хом'ячка). MVA діяв найкращою уявою, оскільки ВНК є пермісивною лінією клітин.

Що стосується реплікації в клітинах Vero (лінія клітин нирок мавпи), MVA-Vero, як і очікувалося, ампліфікувався добре, а саме 1000-разово в порівнянні з вводом. MVA-HRL, а також MVA-575 ампліфікувались добре, із 33-разовим і 10-разовим підвищенням стосовно запровадження, відповідно. Лише MVA-BN, як було виявлено, не ампліфікується так само добре в даних клітинах, як інші, як-от, спостерігалось лише 2-кратне перевищення запровадження.

Що стосується реплікації в клітинах CV1 (лінії клітин нирок мавпи), було виявлено, що MVA-BN дуже сильно придушується в даній лінії клітин. Було показано 200-разове зниження в порівнянні з запровадженням. Подібним чином, MVA-575 не ампліфікувався вище рівня запровадження і також була показана злегка негативна ампліфікація, як-от 16-кратне зниження в порівнянні з запровадженням. Найкраще ампліфікувався MVA-HLR із 30-разовим підвищенням у порівнянні з запровадженням, і за ним впливає MVA-Vero із 5-разовим підвищенням у порівнянні з запровадженням.

Найбільш цікавим було порівняння кінетики росту різноманітних вірусів у лініях клітин людини. У відношенні репродуктивної реплікації в клітинах 143B (лінія клітин раку кістки людини) було показано, що MVA-Vero є єдиним, що виявляє ампліфікацію в порівнянні з запровадженням (3-кратне підвищення). Всі інші віруси не ампліфікувались стосовно запровадження, але була велика різниця між MVA-HLR і MVA-BN і MVA-575. MVA-HLR був "прикордонним" (1-кратне зниження стосовно запровадження), а у відношенні MVA-BN було показано найбільше пригнічення (30-разове зниження стосовно запровадження), за яким впливає MVA-575 (59-разове зниження стосовно запровадження). У результаті MVA-BN є найвищим у відношенні придушення в клітинах 143B людини.

Більш того, у відношенні реплікації в клітинах HeLa (клітини раку шийки матки людини) було показано, що в даній лінії клітин MVA-HLR добре ампліфікується, навіть краще, ніж у пермісивних клітинах ВНК (HeLa=25-разове підвищення в порівнянні з запровадженням; ВНК=88-разове підвищення в порівнянні з запровадженням). MVA-Vero також ампліфікувався в даній лінії клітин (27-разове підвищення в порівнянні з запровадженням). Проте MVA-BN, а також, у меншому ступені, MVA-575 придушувалися в даних лініях клітин (MVA-BN=29-разове зниження в порівнянні з запровадженням, а MVA-575=6-разове зниження в порівнянні з запровадженням).

Що стосується реплікації в клітинах HaCat (клітинної лінії кератиноцитів людини), було показано, що MVA-HLR добре ампліфікується в даній лінії клітин (55-кратне підвищення в порівнянні з запровадженням). MVA-Vero адаптований і MVA-575 виявляли ампліфікацію в даній лінії клітин (1,2 і 1,1-кратне підвищення в порівнянні з запровадженням, відповідно). Проте MVA-BN був єдиним, що виявляв придушення (5-кратне зниження в порівнянні з запровадженням).

На закінчення, можна підтверджувати, що MVA-BN є найбільш пригніченим вірусним штамом даної групи вірусів: MVA-BN виявляє граничне придушення в

лініях клітин людини, показуючи відношення ампліфікації від 0,05 до 0,2 у клітинах нирок ембріона людини (293: ECACC No.85120602) (дані не включені в таблицю 1), він дає далі відношення ампліфікації приблизно 0,0 у клітинах 143B; відношення ампліфікації приблизно 0,04 у клітинах HeLa; відношення ампліфікації приблизно 0,22 у клітинах HaCat. Крім того, MVA-BN виявляє відношення ампліфікації приблизно 0,0 у клітинах CV1. Лише в клітинах Vero може спостерігатися ампліфікація (відношення 2,33), але не в тієї ж ступені, як у пермісивних лініях клітин, таких як BHK і CEF (порівняй із таблицею 1). Таким чином, MVA-BN є єдиним штамом MVA, що демонструє відношення ампліфікації нижче 1 у всіх лініях клітин людини 143B, HeLa, HaCat і 293.

MVA-575 виявляє профіль, подібний із MVA-BN, але не придушується, як MVA-BN.

MVA-HLR добре ампліфікується у всіх тестованих лініях клітин (за винятком клітин 143B), таким чином, його можна розглядати як компетентний у відношенні реплікації у всіх тестованих лініях клітин, за винятком клітин 143B. В одному випадку він ампліфікується в лінії клітин людини (HeLa) навіть краще, ніж у пермісивній клітинній лінії (BHK).

MVA-Vero виявляє ампліфікацію у всіх лініях клітин, але в меншому ступені, чим це демонструє MVA-HLR (при ігноруванні результату з 143B). Проте, із погляду пригнічення його не можна розглядати як такого, що відноситься до того ж "класу", що і MVA-BN і MVA-575.

2. Реплікація in vivo

Приймаючи до уваги те, що деякі штами MVA явно реплікуються in vitro, перевіряли здатність різноманітних штамів MVA реплікуватись in vivo із застосуванням моделі трансгенних мишей AGR129. У даної лінії мишей є спрямовані uszkodження генів рецептора типу I IFN (IFN- α /p) і типу II (IFN- γ) і в гені RAG. Внаслідок даних uszkodжень у мишей відсутня система IFN, і вони не здатні продукувати зрілі B і T клітини, і за змістом мають важке порушення імунітету і високочутливі до вірусу, що реплікується. Групи із шести мишей імунізували (у/б) 107 БОЕ MVA-BN, MVA-HLR або MVA 572 (що застосовувались в 120000 чоловік у Німеччині) і контролювали щодня на предмет клінічних проявів. Усі миші, що були вакциновані MVA-HLR або MVA 572, загинули в межах 28 і 60 днів, відповідно. При скресанні трупів були виявлені загальні ознаки важкої вірусної інфекції в більшості органів, і, за допомогою стандартного тесту по бляшках, у яєчниках був виявлений MVA (108 БОЕ). На противагу цьому, миші, що була вакцинована тієї ж дозою MVA-BN (відповідному штаму ECACC V00083008, що зберігається) виживали протягом більш 90 днів, і MVA не удавалося витягти з органів або тканин.

Дані досліджень, що взяті разом, in vitro і in vivo чітко показують, що MVA-BN пригнічений у значно більшому ступені, чим вихідний і наявний у продажі штам MVA-HLR.

Приклад 2

Імунологічні дані і дані in vivo

Дані експерименти були початі для порівняння різноманітних доз і режимів вакцинації MVA-BN з іншими MVAs.

2.1. Різні штами MVA відрізняються за своєю здатністю стимулювати імунну відповідь.

Здатні до реплікації штами коров'ячої віспи індують сильні імунні відповіді в мишей, а у високих дозах є летальними. Хоча MVA є сильно ослабленими і володіють зниженою здатністю до реплікації в клітинах ссавців, між різноманітними штамми MVA є розходження в ступені ослаблення. Дійсно, MVA BN, очевидно, є більш ослабленим у порівнянні з іншими штамми MVA, навіть у порівнянні з вихідним штамом MVA 575. Для визначення того, чи впливає дане розходження в ступені ослаблення на ефективність MVA в індукції захисних імунних відповідей, робили порівняння різноманітних доз MVA BN і MVA 575 на моделі летального контрольного зараження коров'ячої віспою. Ступінь захисту вимірювали по зниженню титрів коров'ячої віспи в яєчниках через 4 дня після контрольного зараження, оскільки це забезпечувало кількісну оцінку дії різноманітних доз і штамів MVA.

Модель летального контрольного зараження

Вільних від даного патогена 6-8-тижневих самок миші BALB/c (H-2^d) (n=5) імунізували (у/б) різноманітними дозами (10^2 , 10^4 або 10^6 TCID₅₀/мл) або MVA BN, або MVA 575. MVA BN і MVA 575 розмножували на клітинах CІРІЙ, очищали в сахарозі і готували в трис, рН7,4. Через три тижня миші одержували повторну ін'єкцію тієї ж дози і того ж штаму MVA із наступним через два тижні летальним контрольним зараженням (у/б) здатним до реплікації штамом коров'ячої віспи. У якості здатного до реплікації штаму вірусу коров'ячої віспи (що позначається як "rVV") застосовували або штам WR-L929 TK+, або штам IHD-J. Контрольні миші одержували вакцину-плацебо. Захист вимірювали по зниженню титрів у яєчниках, що визначені через 4 дня після контрольного зараження за допомогою стандартного тесту плям. Для цього мишей забивали на 4 день після контрольного

зараження, яєчники виділяли, гомогенізували в PBS (1мл), і титри вірусу визначали за допомогою стандартного тесту по бляшках із застосуванням клітин VERO (Thomson et al., 1998, J. Immunol. 160:1717).

Миші, які вакциновані двома імунізаціями 10^4 або 10^6 TCID₅₀/мл MVA-BN або MVA-575, були цілком захищені, судячи з 100% зниженню титрів rVV у яєчниках через 4 дні після контрольного зараження (Фіг.2). Вірус контрольного зараження був віддалений. Проте при менших дозах спостерігалися розходження в ступені захисту, що забезпечується MVA-BN або MVA-575. Миші, що одержували дві імунізації 10 TCID₅₀/мл MVA-575, не були захищені, судячи з високих титрів rVV у яєчниках (у середньому $3,7 \times 10^7$ БОЕ $\pm 2,11 \times 10^7$). Навпроти, у мишей, що вакциновані тією ж дозою MVA-BN, індукувалось значне зниження (96%) титрів rVV у яєчниках (у середньому $0,21 \times 10^7$ БОЕ $\pm 0,287 \times 10^7$). У контрольних мишей, що одержували вакцину-плацебо, середній титр вірусу складав $5,11 \times 10^7$ БОЕ $\pm 3,59 \times 10^7$ (Фіг.2).

Обидва штаму MVA індукують захисні імунні відповіді в мишей проти летального контрольного зараження rVV. Хоча обидва штаму MVA однаково ефективні при більш високих дозах, MVA-BN є більш ефективним, чим його батьківський штам MVA-575 в індукції захисної імунної відповіді проти летального контрольного зараження rVV, що може бути пов'язане з підвищенням ослабленням MVA-BN у порівнянні з MVA-575.

2.2. MVA-BN у режимах приміюючої-повторної вакцинації

2.2.1. Індукція антитіл проти MVA після вакцинації мишей різноманітними вакцинами проти віспи

Ефективність MVA-BN порівнювали з іншими штамами MVA і коров'ячої віспи, що раніше застосовувались для придушення віспи. Дослідження включало однократні імунізації з застосуванням штамів коров'ячої віспи Elstree і Wyeth, вирощених у клітинах CEF і введених шляхом скарифікації хвоста, і імунізації з застосуванням MVA 572, що раніше застосовували в програмі придушення віспи в Німеччині. Крім того, було проведено порівняння MVA-BN і MVA 572 у якості превакцини з наступною вакцинацією Elstree за допомогою скарифікації хвоста. Для кожної групи використовували вісім мишей BALB/c, і усі вакцинації MVA (1×10^7 TCID₅₀) робили підшкірно на 0 і 3 тижнях. Через два тижні після повторної імунізації мишей піддавали контрольному зараженню коров'ячої віспою (IHD-J), і через 4 дні після контрольного зараження визначали титри в яєчниках. Всі вакцини і режими забезпечували 100% захист.

Імунні відповіді, що індуковані застосуванням даних різноманітних вакцин або режимів, вимірювали у тварин перед контролним зараженням. Застосовували тести для виміру рівнів що нейтралізують антитіл, проліферації Т клітин, продукції цитокінів (IFN-у проти IL-4) і продукції IFN-у Т клітинами. Рівень відповідей Т клітин, що індуковані MVA-BN, за результатами виміру за допомогою ELISPOT, був у цілому еквівалентний тим, що визивалися іншими MVA і вірусами коров'ячої віспи, що показує біологічну еквівалентність. Щотижневий аналіз титрів антитіл проти MVA після застосування різних режимів вакцинації показав, що вакцинації MVA-BN значно підвищували швидкість і розмір відповіді антитіл у порівнянні з іншими режимами вакцинації (Фіг.11). Дійсно, титри антитіл проти MVA були значно вище ($p > 0,05$) на 2, 4 і 5 тижнях (через 1 тиждень після повторної реімунізації на 4 тижні) при вакцинації MVA-BN у порівнянні з вакцинацією мишей MVA 572. Після бустерної вакцинації на 4 тижні титри антитіл були також значно вище в групі MVA-BN у порівнянні з мишами, що одержували однократну вакцинацію штамів коров'ячої віспи Elstree або Wyeth. Дані результати чітко показують, що 2 вакцинації MVA-BN викликають більшу відповідь антитіл у порівнянні з класичною однократною вакцинацією традиційними штамами коров'ячої віспи (Elstree і Wyeth), і підтверджують дані розділу 1,5 про те, що MVA-BN є більш імуногеним, чим інші штами MVA.

2.2.2. Режими приміювання і бустинга MVA викликають той же рівень захисту, що і режими приміювання ДНК і бустинга MVA на моделі контрольного зараження грипом.

Оцінювали ефективність режимів приміювання-бустинга MVA в індукції високоавідних CTL відповідей і порівнювали з режимами приміювання ДНК/бустинга MVA, що, як повідомлялося, є кращими. Різнманітні режими оцінювали з застосуванням мишиної політопної конструкції, кодує або вектором ДНК, або MVA-BN, і порівнювали рівні CTL індукції за допомогою ELISPOT, а авідність відповіді вимірювали як ступінь що досягається захисту після контрольного зараження грипом.

КОНСТРУКЦІЇ

Плазмідна ДНК, що кодує політоп миші (10 епітопів CTL, включаючи грип, овальбумін), була раніше описана [Thomson et al., 1998, J. Immunol. 160: 1717]. Даний політоп миші був вставлений у делеційний сайт II MVA-BN, розмножений у клітинах CEF, очищений у сахарозі і поданий у трис, pH7,4.

МЕТОДИКИ ВАКЦИНАЦІЇ

У даному дослідженні конкретного патогена застосовували 6-8-тижневих самок миші BALB/c (H-2d). Для аналізу ELISPOT використовували групи з 5 мишей, а в експериментах із контрольним зараженням грипом застосовували по 6 мишей на групу. Мишей вакцинували з застосуванням різних режимів приміювання-бустинга з використанням MVA або ДНК, що кодує політоп миші, як докладно описано в результатах. Для імунізації ДНК мишей анестезували і потім вводили однократну ін'єкцію 50мкг вільної від ендотоксина плазмідної ДНК (у 50мкл PBS) у чотиригловий м'яз під наркозом. Імунізації, що приміює, із застосуванням MVA здійснювали або шляхом внутрішньовенного введення 10^7 БОЕ MVA-BN на мишу, або шляхом підшкірного введення 10^7 або 10^8 БОЕ MVA-BN на мишу. Бустингові імунізації проводили через три тижні після приміюючих імунізацій. Бустинг плазмідної ДНК робили тим же чином, що і імунізацію, що приміює, ДНК (дивися вище). Для встановлення CTL відповідей проводили стандартні аналізи ELISPOT [Schneider et al., 1998, Nat. Med. 4; 397-402] на спленоцитах через 2 тижні після останньої бустингової імунізації з застосуванням епітопного пептида CTL грипу (TYQRTRALV), епітопного пептида P. Berghei (SYIPSAEKI), епітопного пептида Cytomegalovirus (YPHFMPNTNL) і/або епітопного пептида LCV (PRQASGVYM).

Для експериментів із контрольним зараженням мишей анестезували і інфікували і/н сублетальною дозою поширеного вірусу грипу, Mem71 ($4,5 \times 10^5$ БОЕ в 50мл PBS). На 5 день після інфікування легені видалляли, і титри вірусу визначали в двох паралелях на лінії клітин нирок собаки Madin-Darby із застосуванням стандартного тесту бляшок грипу.

РЕЗУЛЬТАТИ

При застосуванні однієї вакцини ДНК CTL індукція на 4 H-2^d епітопа, кодує політопом миші, була погана, і лише на два епітопа P. Berghei (SYIPSAEKI) і віруси лімфоцитарного хориомеїнігита (PRQASGVYM) можна було виявити слабкі відповіді. На противагу цьому, при застосуванні режиму приміювання ДНК і бустинга MVA (10^7 БОЕ MVA-BN, що вводився підшкірно) спостерігалася значно велика CTL індукція на SLY (8-кратне підвищення) і PRQ (3-кратне підвищення), і відповіді також спостерігалися у відношенні третього епітопа, цитомегаловірусу миші (YPHFMPNTNL) (Фіг.3А). Проте застосування 10^7 БОЕ MVA-BN, що вводиться підшкірно, при гомологічному режимі приміювання-бустинга індукувало той же рівень відповідей, що і ДНК із наступним MVA-BN (Фіг.3А). Зненацька виявилось, що при застосуванні однієї імунізації MVA-BN (10^7 TCID₅₀) немає істотної різниці в кількості CTL, що індуквані проти трьох епітопів, що вказує на те, що повторна імунізація MVA-BN не підвищує істотно CTL відповіді.

Раніше було показано, що підшкірне введення 10^7 БОЕ MVA є самим неефективним шляхом і концентрацією вірусу для вакцинації при застосуванні інших штамів MVA, особливо в порівнянні з внутрішньовенними імунізаціями (Schneider et al. 1998). Для визначення оптимальних режимів імунізації зазначений вище експеримент був повторений із зміною або кількості вірусу, або способу введення. В одному експерименті вакцинації 10^7 БОЕ MVA-BN були здійснені внутрішньовенно (Фіг.3В). В іншому експерименті 10^8 БОЕ MVA-BN вводили підшкірно (Фіг.3С). У даних експериментах імунізації приміювання-бустинга MVA-BN індукували великі середні кількості CTL проти всіх трьох CTL епітопів у порівнянні з режимами приміювання ДНК і бустинга MVA. Також на відміну від 10^7 БОЕ MVA-BN, що введений підшкірно, імунізація 10^7 БОЕ MVA-BN, що введений внутрішньовенно, і імунізація 10^8 БОЕ MVA-BN, що введений підшкірно, значно підвищувала CTL відповіді, чітко показуючи, що MVA-BN може бути застосований для посилення CTL відповідей при наявності імунітету, що предіснує, проти вектора.

2.2.3. Ефективність вакцини MVA-BN nef у макак резус інфікованих SIV. Визначення ефективності вакцини MVA-BN nef здійснюють шляхом оцінки кількості вірусу і затримки захворювання після контрольного зараження вірулентним первинним ізолятом SIV. Крім того, дослідженням повинно було бути встановлено, чи може MVA-BN бути застосований для безпечно посилення імунних відповідей у мавп з імунною недостатністю при наявності імунітету, що предіснує, проти MVA.

МЕТОДИКИ ВАКЦИНАЦІЇ

Дві групи (n=6) макак резус (Macaca malalta) вакцинували болюсною внутрішньом'язовою ін'єкцією або одним MVA-BN, або рекомбінантним MVA-BN nef на 0, 8 і 16 тижнях. На 22 тижень усіх мавп піддавали контрольному внутрішньовенному зараженню 50 MID₅₀ патогенним, що пов'язаний із клітинами матеріалом SIV (1XC) із первинних некультивованих РВМС макак резус. Клінічний стан тварин відслідковували з високою частотою, і регулярно відбирали зразки крові для виміру віремії, імунологічних показників і повного спектра гематологічних параметрів і параметрів клінічної хімії крові. Тварин, у яких СНІД розвивався у формі хвороби, забивали, а мавп, що вижили, відслідковували протягом 99 тижнів після вакцинації. На 100 тижню мавп, що вижили, імунізували в/м MVA-BN tat, і тварини одержували додаткові імунізації тим же MVA-BN tat на 102 і 106 тижнях.

Не спостерігалось несприятливих ефектів після будь-якої вакцинації або MVA-

BN, або MVA-BN nef. Після інфікування мавп SIV різко зростає рівень віремії з максимумом через два тижні після інфікування (Фіг.4). Через великі стандартні відхилення в межах груп не було значимої різниці між середніми рівнями SIV у групах, що вакциновані MVA-BN nef або MVA-BN. Проте кількість SIV у групі, що вакцинована MVA-BN nef, було в цілому в 10 разів нижче в порівнянні з контрольної (MVA-BN) групою. Більш того, через 35 тижнів після інфікування (початок періоду спостережень) лише 1 із шести мавп, вакцинованих MVA-BN nef, прийшлося умертвити у зв'язку з вагою хвороби в порівнянні з 4 із 6 тварин у контрольній групі (Фіг.5). Розвиток хвороби чітко корелювало з великою кількістю вірусу, у зв'язку з чим тварин спостерігали додатково протягом 29 тижнів після інфікування. Вакцина MVA-BN nef, очевидно, уповільнювала прогресування хвороби в порівнянні з контрольною групою, і навіть на 46 тижню після інфікування 5 із 6 тварин із MVA-BN nef залишалися живі (Фіг.5). Проте до 59 тижня після інфікування ще двоє тварин із групи, що вакцинована nef, були умерщвлені, у результаті чого в живих залишилося п'ять тварин (три з групи MVA-BN nef і два, що вакциновані MVA-BN). Визначення титрів антитіл, які вироблені проти MVA-BN у даних 12 мавп, чітко показало, що MVA-BN може посилювати імунну відповідь навіть при наявності імунітету, що передіснує, проти MVA (Фіг.6). Після імунізації, що приміює, MVA-BN або MVA-BN nef у всіх мавп індукувалась відповідь антитіл проти MVA із середнім титром 1000. Дана відповідь антитіл значно збільшувалась після повторної імунізації, що чітко показує, що MVA може бути застосований для індукції імунної відповіді приміюванням-бустингом у здорових мавп. Дані титри антитіл поступово знижуються, хоча до 49 тижня після імунізації титри виходили на плато, у результаті чого середні титри проти MVA на 99 тижню рівнялися 2000.

П'ять мавп, що вижили, інфікували SIV і мали імунodefіцит із показником CD4 нижче 400/мкл крові. Для дослідження впливу застосовуваного MVA-BN у мавп із порушеним імунітетом п'ять тварин вакцинували три рази MVA-BN tat на 100, 102 і 106 тижнях після вихідної вакцинації. Перша імунізація MVA-BN tat значно підвищувала відповідь антитіл проти MVA у даних мавп із порушеним імунітетом, що додатково підвищувався третьою імунізацією шість тижнів через (Фіг.6). Дані результати додатково показують, що MVA-BN може посилювати імунні відповіді при наявності значного імунітету, що передіснує, до MVA, навіть у мавп із порушенням імунної системи. Хоча імунна відповідь мавп посилювався після імунізації MVA-BN tat, рівні SIV залишалися стабільними, що вказує на те, що імунізації MVA-BN є безпечними і не впливають на рівень SIV у мавп із порушенням імунної системи (Фіг.7).

Дане дослідження показало, що MVA-BN може приміювати-посилювати імунні відповіді в мавп резус із порушенням імунної системи і що імунізації MVA-BN є безпечними і не впливають на рівень віремії у тварин, інфікованих SIV. Затримка в розвитку СНІД-подібної хвороби у тварин, які вакциновані вакциною MVA-BN nef, вказує на успішне формування імунної відповіді на nef.

2.2.4. Терапевтична вакцинація інфікованих SIV мавп, що були піддані протиретровірусному лікуванню

Терапевтична вакцина проти ВІЛ на основі MVA-BN, очевидно, може бути застосована в індивідуумів, що піддаються протиретровірусному лікуванню. У зв'язку з цим у даному дослідженні вивчали безпеку (дія на рівень SIV) і ефективність рекомбінантних MVA, що кодують множину антигенів SIV (gag, pol, env, rev, tat і nef) в інфікованих SIV мавп, що лікувалися PMPA. PMPA являє собою нуклеозидний аналог і ефективний проти ВІЛ і SIV [Rosenwirth, B. et al., 2000, J Virol 74, 1704-11].

КОНСТРУКЦІЇ

Всі рекомбінантні конструкції MVA розмножували на клітинах CEF, очищали в сахарозі і складали в трис pH7,4.

МЕТОДИКА ВАКЦИНАЦІЇ

Три групи (n=6) мавп резус (*Macaca mulatta*) інфікували 50 MID₅₀ патогенного первинного ізоляту SIV (1XC) і потім щодня гоїли PMPA (60мг/кг, вводимого п/к) протягом 19 тижнів. На 10 тиждень тварин вакцинували рекомбінантним MVA-BN (у/м) або фізіологічним розчином, і тварини одержували ідентичні вакцинації через 6 тижнів. Група 1 одержувала суміш MVA gag-pol і MVA-env, група 2 одержувала MVA-tat, MVA-rev і MVA-nef, а група 3 одержувала фізіологічний розчин. Клінічний стан тварин часто перевірявся, і зразки крові регулярно відбиралися для виміру віремії, імунологічних показників і повного спектра гематологічних параметрів і параметрів клінічної хімії крові.

У всіх тварин установлювався високий рівень SIV із максимумом через 2 тижні після інфікування (Фіг.8). Після щоденного лікування PMPA рівні SIV знижувалися і стабілізувалися на низькому рівні до 9 тижня. Як і в попередньому дослідженні, вакцинація MVA на 10 і 16 тижнях не впливали на рівні SIV, що свідчить про те, що MVA-BN є безпечним вакцинним вектором для тварин із порушенням імунної системи. Після припинення лікування тварин PMPA (21 тиждень) рівні SIV збільшуються. Хоча в трьох тварин у групі 1 рівні SIV були знижені в порівнянні з

контрольною групою 3, достовірних розходжень середньої кількості SIV між будь-якими групами після припинення лікування РМРА не було (Фіг.8). За допомогою ELISA для лізатів інфікованих SIV Т-клітин було показано, що у тваринних усіх груп виникає відповідь антитіл проти SIV до 4 тижню після інфікування (Фіг.9). Титр антитіл проти SIV у контрольній групі (фізіологічний розчин) знижувався в ході лікування РМРА і швидко збільшувався після припинення лікування РМРА, що відбиває зниження і наступне підвищення в рівні SIV у період протиретровірусної терапії (Фіг.9). Подібний паттерн титру антитіл проти SIV спостерігався в групі 2, що одержувала MVA-tat, MVA-rev і MVA-nef, що, можливо, відбиває знижену експресію даних регуляторних білків у лізатах інфікованих SIV Т клітин, що показані за допомогою ELISA. На противагу цьому, проте, титри антитіл проти SIV у групі 1 зростали після вакцинацій MVA gag-pol і MVA-env на 10 тижню, що вказує на те, що MVA-BN може посилювати імунну відповідь проти SIV в інфікованих (SIV) тварин, що підлягають протиретровірусній терапії. Важливо, що титри антитіл проти SIV підвищувалися після повторної імунізації на 16 тижню, що знову показує, що MVA може посилювати імунні відповіді у тварин із порушенням імунної системи, навіть при наявності імунітету, що предіснує, проти MVA (Фіг.8). Титри антитіл проти MVA у групі 1 також відбивали даний паттерн із формуванням відповіді антитіл після первинної імунізації, і ця відповідь значно посилювалася після повторної вакцинації (Фіг.10).

ПОСИЛАННЯ

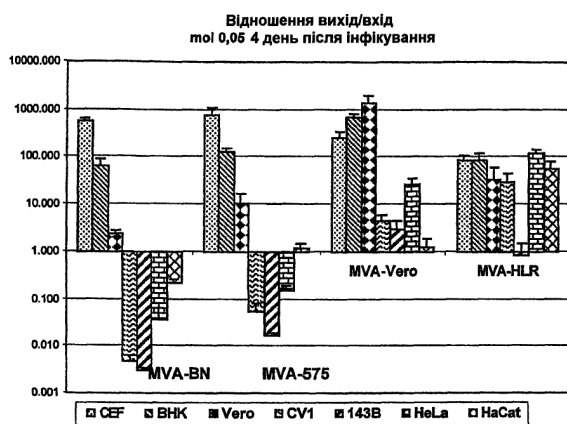
Schneider, J., Gilbert, SC, Blanchard, TJ., Hanke, T., Robson, KJ., Hannan, CM., Becker, M., Sinden, R., Smith, GL, and Hill, AVS. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4; 397-402.

Thomson, SA, Shen-itt, MA, Medveczky, J., Elliott, SL, Moss, DJ., Fernando, GJP., Brown, LE., and Suhrbier, A. 1998. Delivery of multiple CDS cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J. Immunol.* 160: 1717.

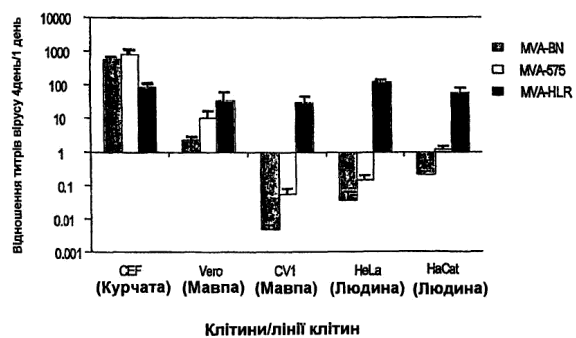
Таблиця 1

	CEF	Hela	HaCat	143B	BHK	Vero	CV-1
MVA-BN	579,73	0,04	0,22	0,00	65,88	2,33	0,00
MVA-575	796,53	0,15	1,17	0,02	131,22	10,66	0,06
MVA-HLR	86,68	124,97	59,09	0,83	87,86	34,97	29,70
MVA-Vero	251,89	27,41	1,28	2,91	702,77	1416,46	4,48

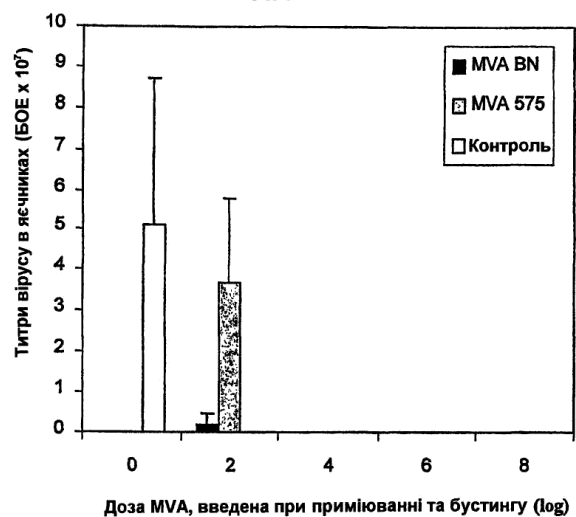
Ампліфікація вірусу вище рівня запровадження через 4 дня після інфікування
Відношення ампліфікації = вихід TCID₅₀ запровадження TCID₅₀- Розміри виражені в TCID₅₀.



ФІГ.1А

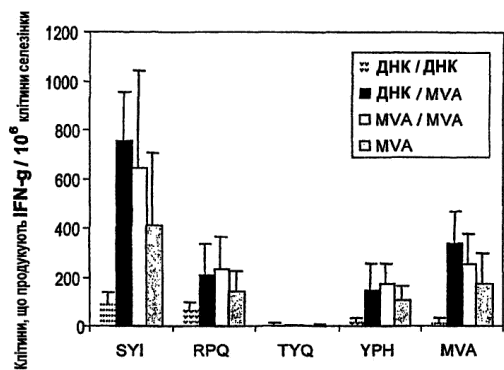


ФІГ.1В

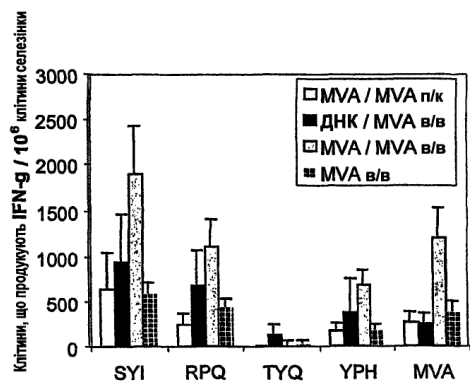


ФІГ.2

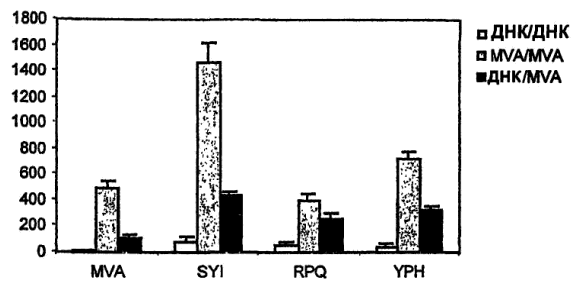
А



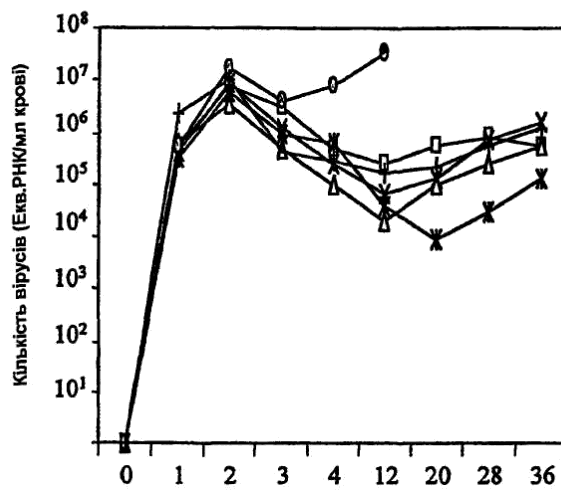
В



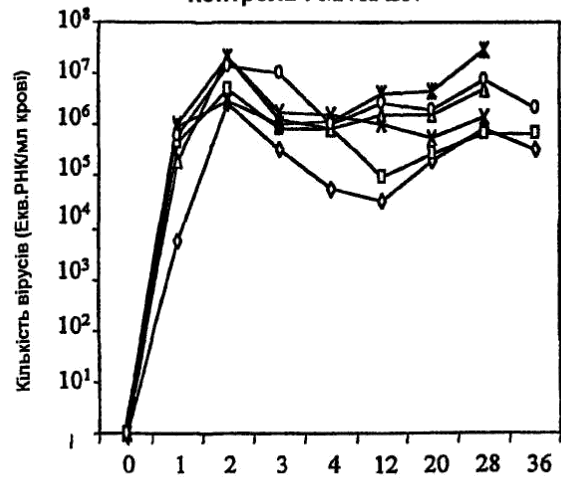
ФІГ.3



ФІГ.3С
Вакцинація MVA nef

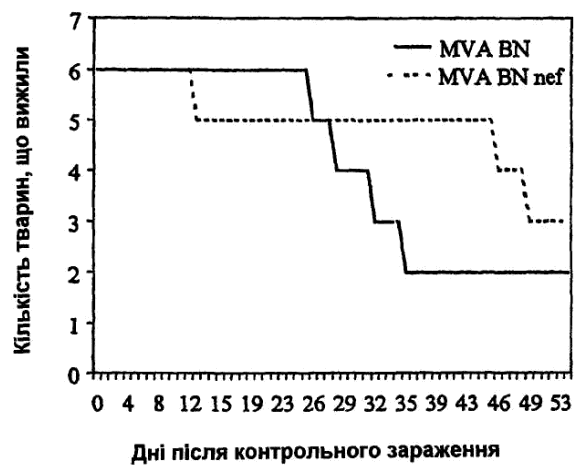


Контроль : MVA-BN

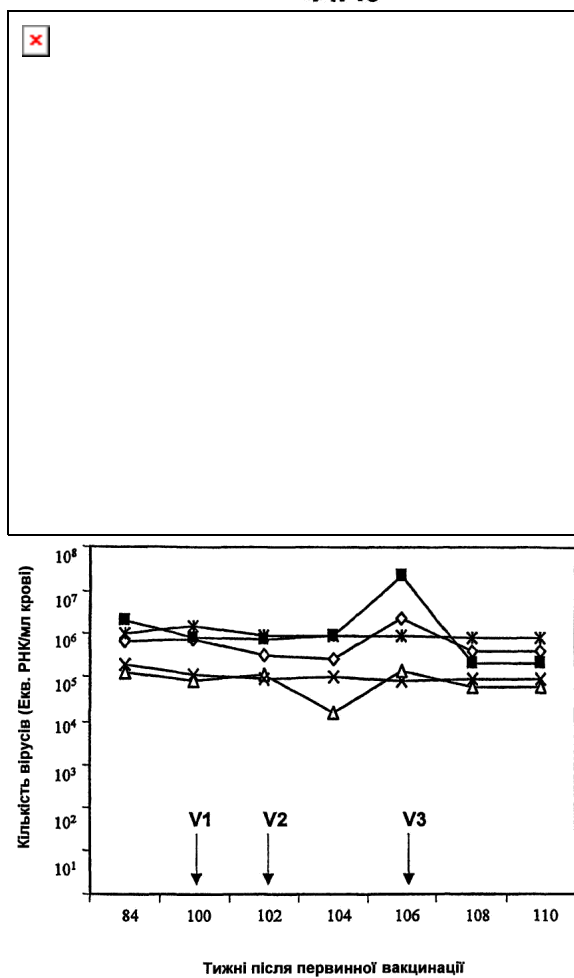


Тижні після інфікування

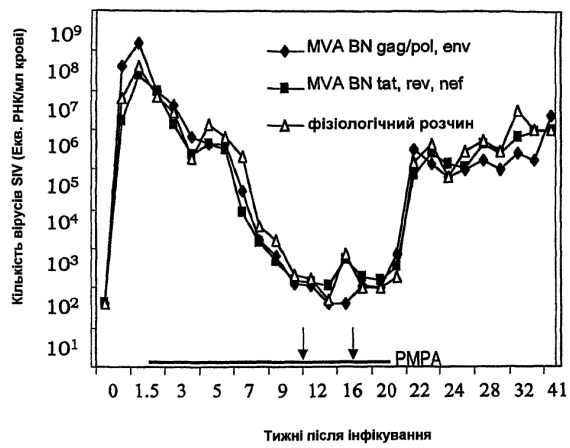
ФІГ.4



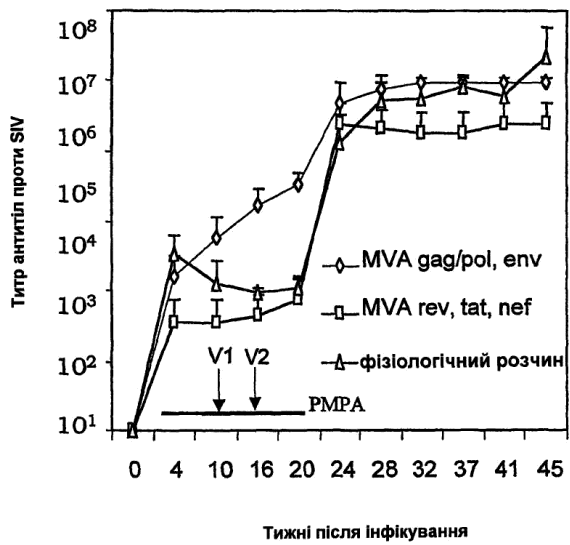
ФІГ.5



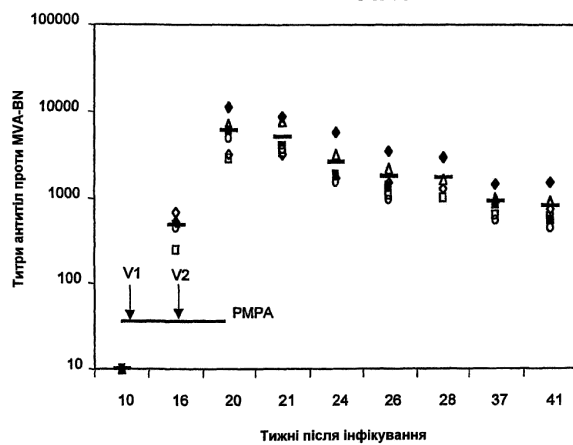
ФІГ.7



ФІГ.8



ФІГ.9



ФІГ.10

