



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85371 (13) C2

(51) МПК (2009)
A61K 39/245МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) МОДИФІКОВАНИЙ ВІРУС КОРОВ'ЯЧОЇ ВІСПИ АНКАРА ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ НОВОНАРОДЖЕНИХ

1

2

(21) 20041008381

(22) 16.04.2003

(24) 26.01.2009

(86) РСТ/ЕР03/03994, 16.04.2003

(31) РА 2002 00590

(32) 19.04.2002

(33) DK

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ЧАПЛІН ПОЛ, GB/DE, СУТЕР МАРК, CH/CH,
АКЕРМАН МАТІАС, CH/CH, ФРАНЧІНІ МАРКО,
CH/CH, ВОЛЛШТЕДТ САБІНЕ, DE/CH, ХЕФТІ
ХАНС ПЕТЕР, CH/CH

(73) БАВАРІАН НОРДІК А/С

(56) US3914408 A, 21.10.75.

WO9817283 A, 30.04.98.

ZHU Y-D ET AL: "Evaluation of Recombinant
Vaccinia Virus-Measles Vaccines in Infant Rhesus
Macaques with Preexisting Measles Antibody"
VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US,
vol. 276, no. 1, 10 October 2000 (2000-10-10), pages
202-213.KOVARIK JIRI ET AL: "Induction of adult-like
antibody, Th1, and CTL responses to measles
hemagglutinin by early life murine immunization with
an attenuated vaccinia-derived NYVAC(K1L) viral
vector." VIROLOGY, vol. 285, no. 1, 20 June 2001
(2001-06-20), pages 12-20.RIDGE JOHN PAUL ET AL: "Neonatal tolerance
revisited: Turning on newborn T cells with dendritic
cells." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 271, no.
5256, 1996, pages 1723-1726.DADAGLIO GILLES ET AL: "Efficient in vivo priming
of specific cytotoxic T cell responses by neonatal
dendritic cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.
168, no. 5, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 2219-
2224.

WO0242480 A, 30.05.02.

(57) 1. Застосування модифікованого вірусу ко-
ров'ячої віспи Ankara (MVA) для виготовлення
медикаменту для лікування новонароджених тва-
рин і людини, де MVA являє собою вірус, здат-
ний невдало інфікувати новонароджених тва-
рин, включаючи людину, та де лікування
викликає або підсилює дозрівання імунної сис-
теми.2. Застосування за п. 1, де MVA є штамом
MVA-BN, депонованим у Європейській Колекції
Культур Тваринних Клітин (ECACC), Salisbury (UK)

під депозитним номером V00083008, або його по-
хідними, де похідні відрізняються тим, що (i) здатні
до репродуктивної реплікації у фібробластах куря-
чого ембріона (CEF) та клітинній лінії BHK, але не
здатні до репродуктивної реплікації в клітинній лінії
людини, та (ii) не можуть реплікуватися в мишачо-
му штамі, що не здатний продукувати зрілі В та Т
клітини, та, отже, є дещо імунодефектними й ви-
сокосприйнятливими до реплікації вірусу.

3. Застосування за п. 2, яке відрізняється тим, що
клітинна лінія людини являє собою HaCat або
HeLa.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрі-
зняється** тим, що прискорення дозрівання імунної
системи корелюється з підвищенням кількості ден-
дритних клітин та їхніх клітин-попередників.

5. Застосування за п. 4, яке **відрізняється**
тим, що клітини-попередники дендритних клітин
являють собою плазмацитоїдні дендритні клітини-
попередники.

6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрі-
зняється** тим, що прискорення дозрівання імунної
системи корелюється з принаймні 1,5-кратним
збільшенням концентрації Flt3-L двома днями піз-
ніше після введення MVA.

7. Застосування за будь-яким з пп. 1-6, яке **відрі-
зняється** тим, що медикамент вводять оральним,
назальним, внутрішньом'язовим, внутрішньовен-
ним, внутрішньочеревинним, інтрадермальним,
внутрішньошлунковим та/або підшкірним шляхом.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрі-
зняється** тим, що медикамент застосовують у
терапевтично ефективній кількості в першій іно-
куляції ("первинній інокуляції") та другій інокуляції
("підсилюючій інокуляції").

9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, яке **відрі-
зняється** тим, що медикамент вводять тварині,
включаючи людину, в кількості принаймні 10¹
TCID₅₀ (доза інфікування тканинної культури) MVA.

10. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, яке
відрізняється тим, що вірусний геном включає
принаймні одну гетерологічну послідовність нукле-
їнової кислоти.

11. Застосування за п. 10, яке **відрізняється** тим,
що гетерологічна послідовність нуклеїнової кисло-
ти вибрана з послідовності, що кодує принаймні
один антиген, антигенний епітоп та/або терапевти-
чну сполуку.

(13) C2

(11) 85371

(19) UA

12. Застосування за п. 10, яке **відрізняється** тим, що гетерологічна послідовність нуклеїнової кисло-

ти кодує протеїн, вибраний з інтерферону, IL-12, Flt3-L та GM-CSF.

Винахід полягає у використанні вірусу для виготовлення медикаментів для вакцинації або лікування новонароджених або внутрішньочеревинного лікування тварин, включаючи людину, причому вірус здатний інфікувати клітини новонароджених або внутрішньоутробних тварин, включаючи людину, але нездатний бути реплікованим у інфекційне вірусне потомство в новонароджених або внутрішньоутробних тваринах, включаючи людину.

Вірус, переважно є модифікованим вірусом коров'ячої віспи Анкага.

Зокрема, винахід відноситься до вакцинації новонароджених проти вірусних інфекцій, які відносяться до тієї самої групи, що й вірус використаний для вакцинації. Крім того, винахід відноситься до вакцинації новонароджених проти антигенів, вибраних з чужорідних антигенів та пухлинних антигенів, де пухлинний антиген та/або чужорідний антиген є відмінним від антигенів асоційованих з вірусом. Винахід також, відноситься до використання зазначених вище вірусів для збільшення рівня факторів, котрі активують дендритні клітини або їхні клітини-попередники та/або для збільшення кількості дендритних клітин або їхніх клітин-попередників та/або для підвищення вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону (IFN) або IL-12.

Передумови створення винаходу

Природне середовище, що оточує тварин та людей містить велику різноманітність збудників інфекції, таких як, віруси, бактерії та грибки. Більшість з цих збудників інфекції можуть спричиняти захворювання у носія інфекції. За нормальних умов носій інфекції відновлюється після захворювання, викликаного збудником інфекції після деякого періоду. Відновлення відбувається завдяки імунній системі тварини чи людини.

Імунна система є частиною тіла тварини або людини, яка відповідає за знищення збудників інфекції. Імунна відповідь поділяється на специфічну та неспецифічну (вроджену) реакцію, хоча обидві тісно взаємодіють. Неспецифічна імунна відповідь є безпосереднім захистом проти широкої різноманітності чужорідних сполук та збудників інфекції. У вродженій імунній відповіді проти вірусів інтерферони IFN- α та IFN- β є надзвичайно необхідними для стримування початкової реплікації вірусу та активації природних клітин-кілерів (NK) для безпосереднього знищення інфікованих клітин. Внутрішньоклітинні бактеріальні або паразитичні патогени індукують IL-12, котрий є позитивним регулятором IFN- γ в клітинах NK та/або деяких підгрупах Т-клітин. Клітини NK із активова-

ним IFN- γ можуть вбивати внутрішньоклітинні патогени. Більш того, IFN- γ також активує макрофаги та робить їх здатними вбивати одержані патогени.

Найбагатшим джерелом IFN- α/β у розрахунку на клітину є дендритні клітини (DC), що є спеціалізованими клітинними популяціями, стратегічно розповсюдженими в усьому тілі. Плазмацитоїдні DC або CD11c⁺ CD8⁺ DC знаходяться серед найкращих продуцентів IFN- α/β . CD8⁺ DC інфіковані внутрішньоклітинними невірусними патогенами є найбільш важливими клітинами, здатними виробляти IL-12, необхідний на ранніх етапах імунного захисту.

Специфічна імунна відповідь може бути індукована до окремих зовнішніх речовин (антигенів) після лаг-фази, коли організм стикається із речовиною вперше. Ініціація специфічної імунної відповіді також координується DC. Існує постійний рух цих клітин з периферії до вторинних лімфатичних органів, лімфатичних вузлів або селезінки де циркулюють неспецифічні Т та В-клітини. Антиген, який несе DC до цих органів уможливорює активацію неспецифічних Т та В-клітин у ефektorні Т та В-клітини.

Для цього DC не лише несуть антиген, а й пластичність розпізнавання патогену допускає активацію інших генів в DC і, таким чином, патоген регулює затравку Т-клітин.

Специфічна імунна відповідь є високоефективною й відповідає за той факт, що особа яка одужала від певної інфекції є захищеною проти цієї інфекції. Таким чином, повторне зараження тим самим або дуже схожим збудником інфекції призводить до значно менших симптомів або до повної їх відсутності, таким чином, це є "раніше набутий специфічний імунітет" до цього збудника. Такий імунітет та імунологічна пам'ять, відповідно, зберігаються на протязі тривалого часу, в деяких випадках на протязі всього життя. Відповідно, індукування імунологічної пам'яті може бути використано для вакцинації, тобто, для захисту індивідууму від інфікування специфічним патогеном.

Для вакцинації на імунну систему діють вакциною, котра сама по собі є менш ушкоджуючою ніж патоген, проти якого індукується імунна відповідь. Вакцина містить або експресує епітопи, котрі знаходяться в, або експресуються агентом проти якого проводиться вакцинація. Таким чином, організм є імунізованим проти агенту, який містить епітоп, що є частиною вакцини.

Типові вакцини є ослабленими або інактивованими вірусами (наприклад, вакцини від поліомієліту та віспи), рекомбінантними протеїнами (на-

приклад, рекомбінантний S-протеїн вірусу гепатиту В), бактеріальні токсини, інактивовані нагріванням (токсин *Clostridium tetani*) або полісахаридами капсули бактеріальної стінки (*Streptococcus pneumoniae*).

Отже, інфекційні захворювання можуть призводити до тяжких клінічних станів у новонароджених та малят, це є приводом для вакцинації дітей та малюків на стільки рано, на скільки це можливо. Прикладом станів, проти яких вакцинація є бажаною є поксвірусні інфекції, включаючи віспу. Однак, спробам успішної вакцинації заважає той факт, що імунна система новонароджених тварин ще не є зрілою. Імунна система новонароджених малюків тварин-савців стає зрілою поступово на протязі певного проміжку часу. У людей дозрівання настає протягом першого року життя. Це є причиною, чому вікова група новонароджених залишається відкритою для багатьох інфекцій протягом першого року життя [Gans et al., J. Am. Med. Assoc. (1998) 280,527-532]. Більш детально, новонароджені малюки мають недорозвинену функцію В-клітин, недостатність презентації первинного антигену дендритними клітинами та обмежену проліферацію Т-клітин [Gans et al., J. Am. Med. Assoc. (1998) 280,527-532]. Одразу після народження рівень Т-клітин в селезінці в 1000 разів менший ніж у дорослих.

Для досягнення принаймні слабкої імунізації було запропоновано використовувати реплікуючі віруси або складі, що містять ад'ювант для імунізації. Однак, із реплікацією вірусів завжди є ризик, що незріла імунна система не справиться із вірусною інфекцією або живою вакциною, оскільки Т-клітини є необхідними для знищення вірусів [Hassett et al., J. Virol. (1997) 71,7881-7888]. Отже, у новонароджених цитокініни продукуються Th-1 Т-хелперами в меншій кількості, відповіддю у малят є переважно Th-2. Також, цитотоксичні Т-клітини не є мобілізовані, й знищення вірусу не відбувається.

Ситуація у ссавців є дуже подібною до ситуації у людей, тобто імунна система після народження не є зрілою. У новонароджених мишей кількість селезінкових Т-клітин CD4+ становить 80000 та стільки ж Т-клітин CD8+, що в 1000 разів менше ніж в селезінці дорослих. Також, у цих мишей незрілою є система, що продукує інтерферон (IFN). Таким чином, новонароджені миші є нездатними ефективно протидіяти розповсюдженню внутрішньоклітинних патогенів в місці інфікування за допомогою IFN. На додаток, низька кількість та неадекватна стадія активації імунних клітин є значною перешкодою для протидії швидко поширюваним патогенам або вірусам, що реплікуються і які було використано для вакцинації.

Із-за ризику, пов'язаного із живими вірусними вакцинами, не рекомендується вакцинувати новонароджених тварин, включаючи людей, вірусами, що реплікуються. Наприклад, не рекомендується вакцинувати новонароджених проти віспи штамми вірусу коров'ячої віспи, котрі використовувалися при боротьбі із віспою, такими як штами Elstee, Copenhagen та NYC6H. Згідно теперішніх рекоме-

ндацій в США, діти молодші за 12 місяців не повинні одержувати сучасні комерційні вакцини віспи.

Вакцинація новонароджених препаратами, що містять ад'ювант, мають той недолік, що багато небезпечних речовин потрапляє в організм. Отже, вакцинація новонароджених людей проводиться лише у виключних випадках, наприклад, у випадку інфекції вірусом гепатиту Б.

На закінчення, вказано, що при народженні імунна система не є зрілою. Оскільки, вакцинація вірусами, здатними до реплікації, або препаратами, що містять ад'ювант мають значні недоліки, малюки не вакцинуються до 2-х місячного віку в Німеччині (Empfehlung der Standigen Impfkommision STICO, 2001) та 6-й тижнів в США (ACIP "Recommended Childhood Immunization Schedule, United States").

Затримка в розвитку імунної системи частково компенсується за рахунок передачі материнських антитіл від матері до малюка під час виношування та грудного годування. Однак, не всі малюки викормлюються грудьми, з огляду на різні причини. Таким чином, період до 6-8-и місячного віку у людей є дуже критичним, протягом цього періоду малюк, який має незрілу, і таким чином не повністю функціонуючу імунну систему не отримує материнських антитіл, а також в цей час вакцинація зазвичай є не успішною або занадто небезпечною.

Подібна ситуація спостерігається у ссавців, зокрема, для економічно важливих тварин, таких як, корови або домашніх тварин, таких як, коти та собаки. Для зниження витрат, кількість молока, що отримує теля від корови часто значно знижена. Замість цього теля одержує суміш із молочного порошку, закваски та спеціального концентрованого корму, іноді вже на першому тижні після народження. Також, теля не одержує необхідну кількість та різноманітність материнських антитіл, і таким чином імунна система стає дуже сприйнятною до інфекцій. До того ж, фермери, які розводять телят та вирощують їх для м'ясної продукції часто є не одні й ті самі. У віці від 4 до 6 тижнів телят збирають й відправляють на інші ферми для м'ясного виробництва. В цей час материнських антитіл мало й імунна система ще не повністю розвинена, але тварини вже піддані ризику нових інфекційних чинників за стресових умов. Це збільшує ризик інфекцій, котрі могли бути попереджені вакцинацією. Подібну ситуацію можна спостерігати в закладах по утриманню або розведенню кішок або собак, де також високе інфекційне навантаження.

Об'єкт винаходу

Об'єктом даного винаходу є створення засобу вакцинації новонароджених дітей та тварин, відповідно, від зовнішніх антигенів та антигенів, пов'язаних із захворюваннями людей та тварин, відповідно. Більш конкретно, об'єктом даного винаходу є створення засобу, що дозволяє прискорити дозрівання імунної системи новонароджених тварин та людей. Також об'єктом даного винаходу є створення засобу, який дозволяє здійснювати вакцинацію новонароджених тварин, включаючи людей, проти поксвірусних інфекцій, зокрема проти віспи.

Докладний опис винаходу

Згідно даного винаходу, неочікувано було виявлено, що можливим є безпечно та надійно вакцинувати та/або лікувати новонароджених або внутрішньоутробних тварин, включаючи людей, вірусами, які здатні інфікувати клітини новонароджених-або внутрішньоутробних тварин, включаючи людей, але не здатні бути реплікованими у згаданих клітинах у інфекційне вірусне потомство. Зокрема було показано, що віруси, використані згідно з даним винаходом, такі як MVA, зокрема MVA-BN та їхні похідні (див. далі), можуть бути застосовані до новонароджених без виявлення будь-яких негативних наслідків. Вакцинація тварин вірусом призводить до специфічної імунної відповіді проти вірусу, застосованого для вакцинації та/або до загальної вакцинації проти чужорідних антигенів та пухлинних антигенів, як більш докладно пояснено нижче. Більше того, віруси, використані згідно з даним винаходом призводять до індукції та/або посилення дозрівання імунної системи, що пов'язане із збільшенням кількості дендритних клітин та таких факторів як інтерферон. Вакцинація вірусами, застосованими, згідно з даним винаходом, є можливим навіть тоді, коли композиція, що застосовується до тварин не містить ад'ювант.

Коротко, віруси, котрі використовуються згідно даного винаходу (i) викликають ефективну імунну відповідь у новонароджених, (ii) можуть бути застосовані без використання ад'юванту та (iii) не мають ризику зашкодити організму.

Згідно даного винаходу, захисний ефект діє принаймні 5 днів, переважно, принаймні, 7, 14 або 28 днів після першої вакцинації.

Віруси, які "здатні інфікувати клітини", є вірусами, що несуть на вірусній поверхні структури, здатні взаємодіяти із клітинами-носіями, таким чином, що вірус або, принаймні, вірусний геном стає інкорпорованим в клітину-носію. Оскільки віруси, використані згідно даного винаходу, є здатними інфікувати клітини-носії, вони не здатні бути реплікованими у інфекційне вірусне потомство в інфікованих клітинах. В контексті даного винаходу термін, "вірус не здатний бути реплікованим у інфекційне вірусне потомство у вказаних клітинах" відноситься до вірусів, геном яких є принаймні частково транскрибований та трансльований у вірусні протеїни або навіть реплікований, однак, неупакований в інфекційні вірусні частки. Таким чином, віруси, використані згідно даного винаходу, є вірусами, що призводять до невдалих інфекцій носія.

Невдала інфекція може мати місце з двох причин: згідно першої, клітина може бути сприйнятливою до інфекції але не бути здатною до розмноження вірусу, наприклад, завдяки тому факту, що не всі необхідні вірусні гени для розмноження вірусу у згаданій клітині експресуються та/або присутні в вірусному геномі. Прикладом такого типу вірусу, згідно даного винаходу, в клітинах ссавців є модифікований вірус коров'ячої віспи Ankara (MVA), котрий буде більш детально описаний далі. Згідно іншого варіанту, невдале інфікування також може бути результатом інфікування клітини дефектними вірусами, котрі не мають повного набору вірусних генів. Прикладом такого вірусу, згідно

даного винаходу, для клітин людини є DISC HSV-1 (одноциклічний симплексвірус герпесу), наприклад, симплексвірус герпесу, котрий має обмеження на один цикл інфекції (Dilloo et al., Blood 1997,89: 119-127). У цього вірусу відсутній ген життєво необхідного глікопротеїну H (gH), але він може бути вирощений у великому титрі в комплементній клітинній лінії, яка експресує gH. Вирощування в некомплементних клітинних лініях, придатних для росту вірусу герпесу, обмеженого до одного циклу реплікації, приводить до вивільнення неінфекційних вірусів. Термін "не здатний бути реплікованим" відноситься, переважно до вірусів, які зовсім не реплікуються в клітинах вакцинованих тварин. Однак, також ці віруси є, в межах представленого винаходу, такими, котрі демонструють невелику залишкову реплікаційну активність, котра керується незрілою імунною системою новонародженого.

Вірус відповідно до даного винаходу може бути будь-яким вірусом, здатним до інфікування тваринних клітин, але не здатним бути реплікованим у інфекційне вірусне потомство у вказаних клітинах. Має бути зрозумілим, що вірус, здатний інфікувати клітини тварин одного виду але не здатний бути реплікованим в інфекційне вірусне потомство у вказаних клітинах, може поводитися інакше в другому виді тварин. Наприклад, для людей MVA-BN та його похідні (див. нижче) є віруси, здатні інфікувати клітини людини, але вони не здатні бути реплікованими в інфекційне вірусне потомство в клітинах курчат. Особі досвідченій в даній галузі відомо, який вірус має бути обраний для конкретного виду тварин. Тест, який використовує мишачий штам AGR129, дозволяє визначити здатність вірусу бути реплікованим в новонародженій тварині або внутрішньочеревинно, описано в WO 02/42480. Результат одержаний на цій мишачій моделі є показовим для людей.

Таким чином, термін "не здатний бути реплікованим у інфекційне вірусне потомство" як він використовується в даному винаході відповідає терміну "нездатний реплікуватися *in vivo*" як використано для мишей в WO 02/42480. Більш детально про цей тест буде йти мова нижче. Віруси, згідно даного винаходу є переважно здатні бути реплікованими в принаймні одному типі клітин принаймні одного виду тварин.

Таким чином, можливо ампліфікувати вірус перед застосуванням на тварині, котру буде вакциновано та/або котру будуть лікувати. Як приклад, робиться посилення на MVA-BN, котрий може бути ампліфіковано в клітинах CEF, але це вірус, який не здатний бути реплікований у інфекційне вірусне потомство в новонароджених людей або внутрішньочеревинно. В цьому контексті зауважено, що хімічно або фізично інактивовані віруси не мають всі властивості цього переважного втілення, оскільки інактивовані віруси є здатними інфікувати клітини новонароджених тварин або внутрішньочеревинно, включаючи людей і не здатні бути репліковані в інфекційне вірусне потомство у новонароджених тварин або внутрішньочеревинно, включаючи людей, але ці віруси не є

здатними до реплікації в принаймні одному типі клітин принаймні одного виду тварин.

Переважаючий вірус є ДНК вірусом. Більш бажано, щоб він був вірусом клітин ссавців, зокрема клітин людини, ДНК вірусом, вибраним з DISC-Нерес вірусів та модифікованим вірусом коров'ячої віспи Ankara (MVA).

Вірус Коров'ячої Віспи Ankara (MVA) відноситься до вірусу Коров'ячої Віспи, члену роду Orthorovirus в сімействі Poxviridae. MVA було одержано 516-а послідовними пасажами на фібробластах курячих ембріонів зі штаму вірусу коров'ячої віспи Ankara (CVA) (для ознайомлення дивись Mayr, A., et al. *Infection* 3,6-14 [1975]). В результаті цих довготривалих пасажів одержаний вірус MVA втратив близько 31 тис. основ своєї геномної послідовності, і тому був описаний як дуже обмежений щодо носіїв до пташиних клітин (Meurer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72,1031-1038 [1991]). Було показано, на різноманітних тваринних моделях, що одержаний MVA має значну авірулентність (Mayr, A. & Danner, K. [1978] *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34). До того ж, цей штам MVA, було випробувано в клінічних тестах як вакцину для імунізації проти віспи людини (Mayret al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org.* B 167,375-390 [1987], Stickl et al., *Dtsch. Med. Wschr.* 99,2386-2392 [1974]). До цього дослідження було залучено близько 120,000 людей, включаючи пацієнтів високого ризику, й доведено, що порівняно із вакцинами, заснованими на коров'ячій віспі, MVA мав знижену вірулентність або інфекційність, тоді як зберігав добру імуногенність.

Переважними штамми, згідно даного винаходу є MVA 575, депонований в Європейській колекції Культур тваринних клітин (ECACC) під депозитним номером V00120707 та MVA-BN, депонований в тому самому закладі під депозитним номером V000083008, та їхні похідні. Якщо це призначено для вакцинації/лікування людей, то переважним, зокрема, є MVA-BN та його похідні.

Властивості, надзвичайно бажаних штамів MVA, переважно найбільш бажаних штамів для людей, таких як MVA-BN та його похідних, можуть бути узагальнені як наступні:

i. здатність до репродуктивної реплікації у фібробластах курячого ембріону (CEF) та клітинній лінії ВНК, але нездатність до репродуктивної реплікації у клітинній лінії людини HaCat,

ii. неможливість реплікуватися *in vivo*,

iii. індукція більш високої імуногенності порівняно із відомим штамом MVA 575 (ECACC V00120707) на летальних моделях та/або

iv. індуквання, принаймні, в значній мірі, такого ж рівня імунності у режимі вірус коров'ячої віспи первинне/вірус коров'ячої віспи посилююче, порівняно із режимом ДНК-первинне/вірус коров'ячої віспи посилююче.

Переважні штамми MVA, згідно даного винаходу, мають властивість (ii) нездатність реплікуватися в організмі, котрий вакциновано або проліковано та/або у відповідній тест-системі, як пояснено нижче та, бажано, одна додаткова, з наведених вище, властивостей, більш бажано дві додаткові, з наведених вище, властивостей. Найбільш бажано, щоб штамми MVA мали всі, з наведених вище, вла-

стивостей. Прикладом штаму MVA, що мають всі, з наведених вище, властивостей є MVA-BN людини. Бажаними похідними MVA-BN є похідні, які мають додатково до риси (ii) принаймні одну з, наведених вище, властивостей, більш бажано принаймні дві з, наведених вище, властивостей. Найбільш бажано, щоб похідні MVA-BN мали всі з, наведених вище, властивостей.

Для більш докладної інформації щодо методів, використаних для визначення чи має штам MVA одну або більше зі згаданих рис від (i) до (iv), зроблено посилання на WO 02/42480. Ця публікація, також розкриває як можуть бути отримані віруси, які мають потрібні властивості. Зокрема, WO 02/42480 надає детальне визначення характеристик MVA-BN та похідних MVA-BN й розкриває в деталях біологічні методи, які використовуються для визначення чи є штам MVA штамом MVA-BN або його похідним. Іншими словами, характеристики MVA-BN, опис біологічних тестів, що дозволяють визначити чи є штам MVA штамом MVA-BN або його похідним та методи, що дозволяють одержувати MVA-BN або його похідні розкрито в WO 02/42480. Далі коротко підсумовано, як досвідчена в даній галузі особа одержує в штаммах MVA одну або більше з наведених вище рис та як він може визначити чи має даний штам MVA одну або більше із вище згаданих рис і є, таким чином, найбільш бажаним вірусом згідно даного винаходу. Наступне узагальнення не може розумітися як обмеження релевантності WO 02/42480 для даної заявки до наступної інформації. Замість цього, WO 02/42480 таким чином включено сюди повністю шляхом посилання.

Термін "нездатний до репродуктивної реплікації" в клітинній лінії HaCat (Boukamp et al. 1988, *J Cell Biol* 106 (3): 761-71) використовується в даній заявці як визначено в WO 02/42480. Таким чином, вірус, котрий "нездатний до репродуктивної реплікації" в клітинній лінії HaCat є вірусом, який показує ампліфікаційний коефіцієнт менший за 1 в клітинній лінії людини HaCat. Переважно, ампліфікаційний коефіцієнт вірусу, використаного як вектор, відповідно до даного винаходу, є 0,8 або менше в клітинній лінії людини HaCat. "Ампліфікаційний коефіцієнт" вірусу є співвідношенням між кількістю вірусу, виробленого в інфікованій клітині (Вихід) та кількістю вірусу, первісно застосованого для інфікування клітин в першому місці (Вхід) ("Ампліфікаційний коефіцієнт"). Коефіцієнт "1" між виходом та входом означає ампліфікаційний стан, при якому кількість вірусу виробленого в інфікованих клітинах є такою самою як і кількість вірусу використаного для інфікування клітин. Термін "похідні" вірусів, які депоновано в ECACC під номером V00083008 відноситься, переважно, до вірусів, які здебільшого показують такі ж самі характеристики реплікації як і депонований штам, але мають відмінності в одній або більше частинах геному. Віруси, які мають такі самі "характеристики реплікації", що й депонований вірус є вірусами, які реплікуються в клітинах CEF та клітинних лініях ВНК, HeLa, HaCat та 143B із подібним реплікаційним коефіцієнтом, що й депонований штам, та котрі мають подібну реплікацію *in vivo* як визначе-

но на трансгенній мишачій моделі AGR129 (див. нижче).

Термін "нездатний реплікуватися *in vivo*", використовується в даній заявці, як визначено в WO 02/42480. Таким чином, згаданий термін відноситься до вірусів, які не реплікуються в людському організмі та мишачих моделях, як пояснено в WO 02/42480. Миші використані в WO 02/42480, не здатні виробляти зрілі В- та Т-клітини (миші AGR129). Зокрема MVA-BN та його похідні не вбивають мишу AGR129 протягом, принаймні, 45 днів, більш бажано, принаймні, 60 днів, найбільш бажано, принаймні, 90 днів після інфікування 10^7 pfu вірусу застосованого інтраперитонеально. Бажано, щоб віруси, що мають "нездатність до реплікації *in vivo*", також характеризувалися тим, що віруси не можуть бути виділені з органів або тканин мишей AGR129 45 днів, більш бажано, принаймні, 60 днів, найбільш бажано, принаймні 90 днів після інфікування 10^7 pfu вірусу застосованого інтраперитонеально.

Замість мишей AGR129 можуть бути використані будь-які інші мишачі штами, котрі не здатні виробляти зрілі В- і Т-клітини і, є по суті дещо імунодефектними й високо сприйнятливими до реплікації вірусу.

Деталі експериментів летального інфікування що використовувалися для визначення чи має штам MVA "більшу імуногенність порівняно до відомих штамів MVA 575" пояснюються в WO 02/42480. В таких моделях летального інфікування невакцинована миша померла після інфікування здатним до реплікації вірусом-коров'ячої віспи таким як штам Western Reserve L929 TK+ або IHD-J. Інфікування здатним до реплікації вірусом коров'ячої віспи відноситься до "інфікування" в контексті опису моделі летального інфікування. Чотирма днями пізніше, після інфікування, мишу звичайно забивали й визначали вірусний титр в яєчниках стандартним методом бляшок з використанням клітин VERO. Вірусний титр визначався у невакцинованих мишей та у мишей, вакцинованих MVA-BN та його похідними. Детальніше, MVA-BN та його похідні характеризувалися в цьому тесті тим, що після вакцинації дозою 10^2 TCID₅₀/ml вірусу, вірусний титр в яєчнику був знижений на, принаймні, 70%, бажано, принаймні, 80%, більш бажано, принаймні, 90% порівняно із невакцинованою мишею.

У бажаному втіленні винаходу, вірус, згідно даного винаходу, такий як MVA, зокрема MVA-BN та його похідні, є корисними для первинного/підсилюючого застосування. Віруси, зокрема штами MVA, що є найбільш бажані для використання в даному винаході, такі як MVA-BN та його похідні так само як і відповідні рекомбінантні віруси, що несуть гетерологічні послідовності, можуть бути ефективно застосовані спочатку для первинної й потім для підсилюючої імунної відповіді у нативних тварин, а також у тварин із існуючим імунітетом до поксвірусів. Отже, найбільш бажаний вірус, згідно даного винаходу викликає, принаймні, в значній мірі, такий імунності у режимі вірус коров'ячої віспи первинне/вірус коров'ячої віспи поси-

лююче, порівняно із режимом ДНК-первинне/вірус коров'ячої віспи посилюючий.

Вірус коров'ячої віспи, зокрема штам MVA розглядається як індукуючий, принаймні, в значній мірі, такий самий рівень імунітету в режимах первинний вірус коров'ячої віспи/підсилюючий вірус коров'ячої віспи коли порівнюється із режимами первинний ДНК/підсилюючий вірус коров'ячої віспи, якщо відповідь CTL як визначалося "методом 1" та "методом 2" розкритих в WO 02/42480, бажано обома, є принаймні, в значній мірі, той самий в режимах первинний вірус коров'ячої віспи/підсилюючий вірус коров'ячої віспи порівняно із режимами первинний ДНК/підсилюючий вірус коров'ячої віспи. Більш бажано щоб відповідь CTL після застосування первинного вірусу коров'ячої віспи/підсилюючого вірусу коров'ячої віспи була вищою принаймні в одному з аналізів, порівняно із режимами первинним ДНК/підсилюючим вірусом коров'ячої віспи. Більш бажано, щоб відповідь CTL була вищою в обох аналізах.

Вірус використаний, згідно даного винаходу може бути нерекомбінантним вірусом, таким як MVA, наприклад, вірусом, що не містить гетерологічних нуклеотидних послідовностей. Прикладом нерекомбінантного вірусу коров'ячої віспи є MVA-BN та його похідні. Також, вірус може бути рекомбінантним вірусом, таким як рекомбінантний MVA, котрий містить додаткові нуклеотидні послідовності, котрі є гетерологічними для вірусу.

Термін "гетерологічний", як він використовується в даній заявці, відноситься до будь-якої комбінації послідовностей нуклеїнових кислот, котрі зазвичай не бувають тісно пов'язані із вірусом в природі, і такий вірус також називають "рекомбінантним вірусом".

Гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти, переважно, вибирається з послідовності, яка кодує хоча б один антиген, антигенного епітопу, корисного протеїну та/або терапевтичної речовини.

Термін "корисний протеїн", як він використовується в даній заявці відноситься до будь-якого протеїну, котрий є корисним для захисту тварин проти антигену, вибраного з пухлинного антигену та чужорідного антигену, де пухлинний антиген та чужорідний антиген є відмінними від антигену пов'язаного із вірусом.

Також, і більш детально, "корисні протеїни" є діючими на збільшення рівня факторів, котрі активують дендритні клітини та/або діють на збільшення кількості дендритних клітин та/або діють на збільшення вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону (IFN) або IL-12. Отже, прикладами для таких корисних протеїнів є інтерферони такі як IFN-альфа або IFN-бета, IL-12, Flt-3-L та/або GM-CSF.

Антигенні епітопи можуть бути будь-якими епітопами до яких є сенс викликати імунну відповідь. Прикладами антигенних епітопів є епітопи з *Plasmodium falciparum*, *Mycobacteria*, вірусу грипу, з вірусів вибраних з сімейства *Flaviviruses*, *Paramyxoviruses*, вірусів гепатиту, вірусів імунодефіциту людини або з вірусів, що спричиняють геморагічну лихоманку таких як віруси Hanta або

Filoviruses, напр., вірус Ebola або Marburg. Отже, якщо, наприклад, рекомбінантний MVA експресує гетерологічні епітопи, які використовуються для вакцинації новонароджених, згідно даного винаходу, то результатом цього лікування є не лише загальна вакцинація завдяки прискореному становлення імунної системи але й специфічна вакцинація проти гетерологічного епітопу, який експресовано з гетерологічного MVA.

"Терапевтична сполука", кодована гетерологічною нуклеїновою кислотою в рекомбінантному вірусі може бути, напр., терапевтичною нуклеїновою кислотою або пептидом або протеїном із бажаною біологічною активністю.

Введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти здійснюється, переважно, в не основний регіон вірусного геному. Також, гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти вводиться в сайт делеції, що природно зустрічається у вірусному геномі (для MVA описано в РСТ/EP96/02926). Методи введення гетерологічних послідовностей у вірусний геном, такий як поксвірусний геном, є відомими особі досвідченій в даній галузі.

Даним винаходом, також, пропонується фармацевтична композиція та вакцина, яка включає вірус, згідно даного винаходу, такий як MVA, напр., для викликання імунної відповіді в живому організмі тварини, включаючи людину.

Фармацевтична композиція, може, звичайно, включати один або декілька фармацевтично прийнятних та/або дозволених носіїв, добавок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розчинників та/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути вода, сольовий розчин, гліцерол, етанол, зволожуючі або емульгуючі агенти, рН-буферні речовини, або подібні. Придатними носіями зазвичай є великі, повільно метаболізуючі молекули, такі як протеїни, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, сополімери амінокислот, ліпідні агрегати, або подібні.

Для виготовлення вакцин, вірус або його рекомбінанти переводять у фізіологічно прийнятну форму. Такі методи відомі особі досвідченій в даній галузі. Для MVA та інших поксвірусів вакцина може бути виготовлена, базуючись на досвіді виготовлення поксвірусних вакцин, які використовувалися для вакцинації проти віспи (як описано Stickl, H. et al. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99,2386-2392). Наприклад, очищений вірус зберігався при -80°C з титром 5×10^8 TCID₅₀/ml виготовлений на близько 10mM Tris, 140 mM NaCl pH 7.4. Для виготовлення вакцинних доз, наприклад, 10^1 - 10^8 часток вірусу, такого як MVA було ліофілізовано в 100 ml фосфатно-буферному сольовому розчині (PBS), в присутності 2% пептону та 1% людському альбуміні в ампулі, бажано в скляній ампулі. Також, вакцинні дози можуть бути одержані поетапним ліофільним сушінням вірусу в композиції. Композиція може додатково містити добавки такі, як манітол, декстран, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон або інші добавки такі, як антиоксиданти, інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні протеїни (напр., альбумін сироватки людини) придатні для застосування *in vivo*. Скла

ампула потім може бути закриватися й зберігатися між 4°C та кімнатною температурою на протязі декількох місяців. Однак, коли в ній не має потреби ампула може зберігатися при температурі нижче -20°C .

Для вакцинації або терапії ліофілізат може бути розведено в 0.1-0.5мл водного розчину, бажано, фізіологічному розчині або Tris-буфері, та застосовано як системно так і місцево, наприклад, парентерально, інтрамускулярно або іншим шляхом введення відомим досвідченому професіоналу. Спосіб застосування, доза і кількість введень може бути оптимізована тим хто має досвід відомим способом.

Вірус, згідно даного винаходу, зокрема MVA, може бути застосований орально, назально, інтрамускулярно, внутрішньовенно, інтраперитонеально, інтрадермально, внутрішньоматочко, та/або підшкірним введенням. У малих тварин інюкація для імунізації, бажано має проводитися парентерально або назально, тоді як у більших тварин або людини, бажано, підшкірною, інтрамускулярною або оральною інюкацією.

MVA вводиться, переважно, в дозі від 10^1 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose - доза інфікування тканинної культури) до 10^9 TCID₅₀.

Як було відмічено раніше, вірус, згідно даного винаходу, зокрема MVA, такий як MVA-BN та його похідні можуть вводитися в терапевтично ефективній кількості при першій інюкації ("первинній інюкації") та при другій інюкації ("посилючій інюкації").

В контексті даного винаходу термін "тварина" також охоплює і людей. Більш загально, тварина є хребетною твариною, переважно, твариною ссавцем, включаючи людину. Специфічними прикладами тварин є домашні тварини такі, як собаки та коти, господарські тварини такі, як телята, велика рогата худоба, вівці, коза, коні, свині та інші тварини такі, як миші та щурі. Для цих видів тварин та для людей MVA та DISC-HSV є в значній мірі переважними вірусами. Винахід також відноситься до господарських птахів таких, як індиків, качок, гусей, курей якщо віруси здатні інфікувати клітини птахів але не здатні бути реплікованими у інфекційне потомство вірусу у згаданих клітинах.

Термін "домашні тварини" як використано в даному описі відноситься переважно до ссавцевих домашніх тварин, більш переважно до собак, котів, телят, рогатої худоби, вівців, кіз, свиней, коней, оленів.

Відповідно до першої альтернативи, віруси згідно даного винаходу, зокрема, MVA-BN та його похідні, можуть бути використані як специфічні вакцини, наприклад, для виклику імунної відповіді, котра захищає новонароджених проти захворювань спричинених вірулентними вірусами, які відносяться до тієї самої групи, сімейства чи роду, що й вірус використаний для вакцинації. За для прикладу MVA, як зазначено раніше, зокрема, MVA-BN та його похідні можуть бути використані для вакцинації новонароджених людей проти поксвірусних інфекцій, зокрема проти віспи. MVA, зокрема MVA-BN та його похідні, також можуть бути використані для вакцинації хребетних тварин проти

поксвірусних інфекцій, які важливі для ветеринарії. Відповідно до перших в переліку, вірус використаний для вакцинації може бути нерекомбінантним вірусом, таким як MVA-BN та його похідні, або рекомбінантним вірусом, який несе у вірусному геномі гени, котрі природньо не зустрічаються у згаданому геномі. Переважно, рекомбінантний вірус несе додаткові гени котрі корисні для стимуляції імунної відповіді.

Прикладами цього виду генів є гени цитокініну та гени інтерферону.

Відповідно до другої, але спорідненої альтернативи, новонароджені вакцинуються рекомбінантним вірусом, який несе гетерологічну послідовність нуклеїнової кислоти, як було раніше зазначено, для індукування імунної відповіді проти амінокислотної послідовності, експресованої з гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти. Для прикладу послідовності нуклеїнової кислоти, яка може кодувати антиген або антигенний епітоп, як було раніше зазначено. Прикладами рекомбінантного вірусу відповідно до цього втілення винаходу є рекомбінантний MVA, зокрема, рекомбінантний MVA-BN та його похідні, які мають в собі гетерологічну нуклеїнову кислоту, кодує антигени з (i) вірусів інших ніж MVA, таких як HIV-1, HIV-2, вірусу Dengue, вірусу West-Nile, вірусу японського енцефаліту, вірусу кору, (ii) пухлинних антигенів, (iii) бактерій, (iv) грибів. Якщо антиген, експресований з рекомбінантного вірусу, наприклад, антиген B1L, то можливо застосувати рекомбінантний вірус для викликання імунної відповіді у вакцинованого новонародженого проти B1L та попереджати СНІД. В більш широкому розумінні, рекомбінантний вірус, який експресує антиген або антигенний епітоп використовується для індукування імунної відповіді проти агента з якого отримано гетерологічну послідовність та/або проти агента, котрий несе в собі антиген або антигенний епітоп.

Згідно третьої альтернативи, неочікувано було виявлено, що віруси, котрі здатні до інфікування клітин новонароджених або ще ненароджених тварин, включаючи людину, але нездатні бути реплікованими в інфекційне потомство вірусу в новонародженій або ще ненародженій тварині, включаючи людину, може використовуватись для виготовлення медикаментів для захисту тварини, зокрема новонародженої тварини, включаючи людину, проти антигену вибраного з пухлинного антигену та чужорідного антигену, де пухлинний антиген та/або чужорідний антиген є відмінними від антигенів асоційованих із вірусом.

Відповідно до третьої альтернативи, новонароджені, вакциновані вірусом, відповідно до даного винаходу, зокрема MVA, таким як MVA-BN та його похідними, є захищеними проти зараження чужорідними антигенами такими як збудники інфекцій. Отже, віруси, відповідно до даного винаходу, зокрема MVA, є загальними вакцинами для новонароджених, наприклад, після вакцинування новонароджених вірусом, відповідно до даного винаходу, зокрема MVA, імунна система новонароджених стає більш компетентна для взаємодії із чужорідними антигенами, такими як віруси. В розділі при-

кладів наведено приклад вакцинації за допомогою MVA, та наступним інфікуванням симпліксвірусом герпесу 1-го типу. Отже, якщо вірус, відповідно до даного винаходу, зокрема MVA, було використано для вакцинації новонароджених, вакциновані тварини є більш захищені від зовнішніх антигенів ніж невакциновані тварини у критичний проміжок часу до тих пір коли не запрацює функціональна та зріла імунна система.

Згідно даного винаходу, "пухлинний антиген та/або чужорідний антиген є відмінним від антигенів пов'язаних із вірусом". Цей термін має бути інтерпретований таким чином відповідно до втілення, що винахід в першу чергу не спрямований на використання вірусу такого як MVA для викликання імунної відповіді проти самого вірусу. Замість цього вірус використовується для викликання імунної відповіді або, принаймні, загальної імунної стимуляції котра захищає носія проти чужорідних антигенів та пухлинних антигенів, відповідно, котрі не асоційовані із вірусом. Термін "антиген асоційований із вірусом" відноситься до епітопів та антигенів вірусної часточки та до антигенів та епітопів поверхні клітини, інфікованої вірусом, котрі є результатом експерсії вірусного геному.

В контексті даної реалізації, термін "чужорідні антигени" відноситься до будь-яких антигенів та епітопів котрі не є природньою частиною або компонентом тваринного організму. Чужорідними антигенами, головним чином, є антигени та епітопи токсинів та збудників інфекцій. Типовими збудниками інфекцій є віруси такі як герпесвіруси, ретровіруси, віруси сказу, рабдовіруси, аденовіруси; бактерії такі як Salmonella, Mycoplasma, Meningococcus, Hemophilus; пріони та грибки.

Винахід є не лише засобом для вакцинації тварин проти зовнішніх антигенів але й, як альтернативне застосування, також придатний для вакцинації проти пухлинних антигенів. "Пухлинні антигени" є антигенами пов'язаними із певними пухлинними захворюваннями. Пухлинні антигени, найчастіше, є антигенами, кодованими геномом носія, у якого розвивається пухлина. Отже, в буквальному розумінні, пухлинні антигени не є зовнішніми антигенами. Тоді як, пухлинні антигени виявляються в значній кількості пухлин, певна кількість пухлинних антигенів в нормальних тканинах знаходяться в незначній кількості та найчастіше пухлинні антигени відсутні в нормальній тканині. Приклади пухлинних антигенів є відомими досвідченим особам в цій галузі та включають, наприклад, антигени MAGE. MVA є ефективним проти цих пухлинних антигенів тому вакцинація тварин веде до активації та/або прискоренню дозрівання імунної системи, що потім може вести до руйнування пухлинних клітин.

Термін "захищає проти антигену" відноситься до розвитку імунної відповіді, котра спрямована проти чужорідного або пухлинного антигену. Якщо зовнішній антиген є збудником інфекції то носій є захищеним проти даного агента, наприклад, носій розвиває імунну відповідь проти даного антигену.

Відповідно, інфікування збудником інфекції призводить до менш тяжкого захворювання або до повної відсутності захворювання. Термін "захи-

щає" не повинен розумітися в сенсі, що це вже є 100% захист проти зовнішнього або пухлинного антигену. Замість цього, термін "захист" як він використовується в даній заявці позначає будь-яку позитивну дію, котра допомагає тварині справлятися із зовнішнім антигеном або пухлинним антигеном, відповідно.

Згідно із даним винаходом, такий захисний ефект розпочинається, принаймні, 6 днів, бажано, принаймні 7, 14 або 28 днів після першої вакцинації. Іншими словами, вакцинована або лікована тварина є захищеною, наприклад, від зовнішнього антигену, якщо тварина стикнеться із згаданим антигеном після 5, 7, 14 та 28 днів, відповідно.

В контексті даного винаходу, ефект від вакцинації новонароджених вірусом відповідно до даного винаходу, зокрема MVA може бути пояснений індукуванням або прискоренням дозрівання імунної системи та/або активацією імунної системи. В контексті даного винаходу, термін "індукування або прискорене дозрівання імунної системи та/або активація імунної системи" стосується, між іншим, прискореного збільшення дендритних клітин або їхніх попередників у вакцинованих порівняно із контрольними. Терміни "прискорення становлення" імунної системи "посилення дозрівання" імунної системи використовуються взаємозамінно в цьому описі.

"Активация імунної системи" характеризується експресією на поверхні клітин молекул та гормонів котрі полегшують клітинну взаємодію або перенесення та/або шляхом секреції згаданих молекул та гормонів клітинами. Специфічні рецептори приймають ці сигнали та відповіді. Маркерами активації, між іншим є, Flt3-L, IL-12, IFN- α , MHC-II та CD8, зокрема CD8 α (див. нижче).

Прискорений розвиток/дозрівання імунної системи корелює із підвищенням рівня факторів, які активують та/або мобілізують дендритні клітини (DC) або їхні клітини-попередники та/або збільшують кількість дендритних клітин та їхніх клітин-попередників та/або збільшують вироблення та/або клітинний вміст інтерферону або IL-12. Прикладом клітин-попередників DC, котрі індуковані вірусом, згідно даного винаходу, зокрема MVA, є плазматичні попередники DC, котрі дуже важливі для захисту проти вірусних інфекцій й котрі можуть виробляти IFN- α/β .

Більш докладно, стимуляція дозрівання імунної системи є, переважно, зумовленою, принаймні, 2-разовим збільшенням поверхневих маркерів знайдених на DC, таких як MHC-II, CD40 та/або CD80/86. Переважно таке збільшення може бути визначене в крові. Також маркерами, якими характеризується посилення дозрівання імунної системи є Flt3-L, IL-12, IFN- α , MHC-II та CD8 α (див. нижче). Більш того, прискорене дозрівання імунної системи корелює із, принаймні, 1,5-кратним збільшенням, бажано, 2-кратним збільшенням кількості CD11-позитивних клітин в крові та/або селезінці через 7 днів після введення MVA-BN новонародженій тварині, порівняно із контрольними тваринами, котрі не одержали MVA-BN.

Також, посилення дозрівання імунної системи може, переважно бути корельованим із, принай-

ні, 1,5-кратним збільшенням, бажано, 2-кратним збільшенням концентрації Flt3-L двома днями пізніше вакцинації новонароджених вірусом, відповідно до даного винаходу, порівняно із відповідним віковим контролем.

В цьому контексті має бути відмічено, що є зв'язок між фенотипом і функцією мишачих та людських популяцій DC, котрі можуть бути охарактеризованими за їхніми фенотипами поверхні (Hochrein et al. 2002. *Hum. Immunol.* 63: 1103). DC в крові можуть бути визначені за допомогою проточної цитометрії з використанням ряду поверхневих маркерів (MacDonald et al. 2002. *Blood.* 100: 4512), що також дозволяє визначити специфічні популяції DC, такі як, плазматичні DC (Dzionek et al. 2002. *Hum. Immunol.* 63: 1133; Dzionek et al. 2000. *J. Immunol.* 165: 6037). Використовуючи подібні методи також можуть бути визначені DC в інших тканинах людини (Summers et al. 2001. *Am. J. Pathol.* 159: 285).

Відповідно до даного винаходу, віруси, які означено вище, можуть бути застосовані для введення новонародженим або ще ненародженим тваринам для підвищення рівня факторів, які активують та/або мобілізують дендритні клітини (DC) або їхніх попередників та/або підвищують кількість дендритних клітин та їхніх клітин-попередників та/або підвищують вироблення та/або клітинний вміст інтерферону або IL-12. Було продемонстровано, що після вакцинації MVA-BN плазматичні дендритні клітини виробляють значно більше IL-12 й мають підвищене вироблення IFN- α та підвищуючу регуляцію MHC-II та CD8 α . Підвищення рівня IL-12 після застосування вірусів, згідно даного винаходу, переважно, в 2 рази, більш переважно 100 разів, 500 разів, 1000 разів, 2500 разів або 5000 разів. Збільшення концентрації Flt3-L через два дні після вакцинації у новонароджених, вірусом, згідно даного винаходу, більш бажано MVA-BN або його похідними, є переважно, 1,5 разів, більш переважно 2,0 рази порівняно із відповідними віковими контрольними групами.

Термін "активация дендритних клітин та їхніх прекурсорів" відноситься до дозрівання DC до антиген презентивних клітин через визначні завоювання стадії клітин, які керуються гормонами та стимулами. Попередники DC називаються прекурсорами. Ці незрілі DC досягають периферії. Різні (антигенні) стимулятори активують DC. Маркерами активації, котрі простимульовані в активуваних дендритних клітинах є між іншим Flt3-L, IL-12, IFN- α , MHC-II та CD8 α (див. нижче).

Було відмічено, що гормони такі, як GM-CSF призводять до збільшення кількості незрілих DC на периферії. Оскільки GM-CSF призводять до збільшення кількості прекурсорів DC в кістковому мозку, крові та периферійних органах (й клітини мають рухатися туди), цей феномен був названий "мобілізація дендритних клітин або їхніх прекурсорів". Це визначення також використано в даному описі.

Отже, вакцинація тварин, включаючи людей, є особливо корисною, якщо вона спрямована на підвищення рівня факторів, які активують дендритні клітини (DC) або їхні клітини-попередники

та/або збільшення кількості дендритних клітин або їхніх клітин-попередників та/або збільшення вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону або IL-12.

Фактори, котрі активують дендритні клітини, крім інших, включають Flt3-L (Lyman et al., Cell 1993,75: 1157-1167) та GM-CSF. Типовими інтерферонами, згідно даного винаходу, є IFN-alpha та IFN-beta. Віруси, використані, згідно даного винаходу індукують Flt3-L та припускається, що деякі з корисних дій, що спостерігалися завдячують згаданих індукції.

В контексті даної заявки, новонароджена тварина або людина означається як тварина або людина, яка ще не має зрілої імунної системи. В усьому описі терміни "новонароджена тварина" та "неонатальна тварина" використовуються синонімічною зріла імунна система, характеризується здатністю повністю активувати вроджену імунну систему та тим фактором, що всі відомі функції та продукти T- та B-клітин мають місце, зокрема імунноглобулінові ізотипи такі як IgA та IgE. Таким чином, незріла імунна система характеризується низькою кількістю T- та B-клітин та дендритних клітин, порівняно із дорослими, виробленням IFN, котре є нижчим порівняно із дорослими, і тим фактом, що вторинні лімфоїдні органи не є повністю зрілими. Більш докладно, "неонатальний" або "новонароджений" в контексті даного винаходу може бути визначений як молода тварина, яка має кількість клітин CD4+ меншу, переважно у 2 рази, більше переважно у 20 разів, ще більш переважно у 200 разів, ще більш переважно у 2,000 разів, найбільш переважно у 20,000 разів меншу за середню кількість селезінкових клітин CD4+ у дорослих.

У мишей імунна система є зрілою у віці 4 тижні. У людей зрілість припадає ймовірно на 6 місяців до 1 року. У котів та собак імунна система є зрілою зазвичай у віці 6 місяців, у телят, овець та свиней у віці 4-12 тижнів. Вакцинація вірусом, згідно даного винаходу, зокрема MVA, бажано має бути виконана у період до зрілості імунної системи. Однак, оскільки зрілість розвивається переважно експоненціально після народження, найбільш бажано вакцинувати вірусів, відповідно до даного винаходу, зокрема MVA, як раніше після народження як можливо. Оскільки в усіх найважливіших домашніх тварин та людей імунна система дозріває на раніше 4-х тижнів після народження, в загальні, бажано, щоб вакцинацію вірусом, згідно даного винаходу, зокрема MVA, бажано проводитись на протязі 4-х тижнів після народження, більш бажано на протязі 2-х тижнів після народження, ще більш бажано на протязі 1-го тижня після народження, найбільш бажано на протязі 3-х днів після народження. Ці загальні умови є застосовними до всіх важливих домашніх тварин, зокрема, важливих домашніх ссавцевих тварин, включаючи людей. Особа досвідчена в даній галузі має розуміти той факт, що також доросліші тварини можуть розглядатися як новонароджені/неонатанти в контексті даного винаходу та, що, таким чином, вакцинація може бути успішно проведена у доросліших тварин, коли ще імунна система не є зріла після віку 4-х тижнів. Таким чином,

у людей вакцинація може проводитись в межах 6-й місяців після народження, більш бажано, в межах 3-х місяців після народження, ще більш бажано в межах 2-х місяців після народження, ще більш бажано в межах 4-х тижнів після народження, ще більш бажано в межах 2-х тижнів після народження, ще більш бажано в межах 1-го тижня після народження, найбільш бажано в межах 3-х днів після народження.

Оскільки, найкращі результати від вірусу, згідно даного винаходу, зокрема MVA як загальною вакциною, спостерігалися, коли застосовували до незрілої імунної системи, то може бути більш бажаним вакцинувати ще ненароджених тварин, включаючи людей. Пренатальна вакцинація може бути бажаною у економічно важливих тварин таких як велика рогата худоба та свині. Таким чином, вакцинація материнської тварини для пренатального вакцинування є перспективною для тварин, які мають placenta endotheliochorialis (ендотеліальну плаценту), такі як собаки, коти, щурі та миші або мають placenta haemochorialis (гематохореальну плаценту), такі як примати, включаючи людей. У тварин, які мають placenta chorionepithelialis, такі як велика рогата худоба, вівці або ті, що мають placenta syndesmochorialis, такі як свині та коні, вакцинація, бажано може бути виконана in utero. Звісно, що цей метод застосування також може бути виконаний тваринам, які мають placenta endotheliochorialis або haemochorialis.

Оскільки віруси, згідно даного винаходу, зокрема MVA, призводить до прискореного дозрівання імунної системи, та оскільки, віруси, згідно даного винаходу, зокрема MVA, також є придатними в якості звичайних вакцин, вакциновані тварини є захищеними також проти інших захворювань. Більш докладно, віруси, згідно даного винаходу, зокрема MVA може бути використаний для загальної вакцинації та проти собачого герпесу або інфекційних перитонів собак. Віруси, згідно даного винаходу, зокрема MVA можуть використовуватися для собак для загальної вакцинації та проти захворювань (вірусних) дихального тракту. Віруси, згідно даного винаходу, зокрема MVA можуть бути застосовані до свиней для загальної вакцинації та проти інфекцій спричинених Hemophilus або Mycoplasma, зокрема у жирових свиней.

Як було відмічено, переважним здійсненням, для використання вірусу, згідно даного винаходу, зокрема MVA, у новонароджених або ще не народжених тварин для захисту згаданих тварин від зовнішнього антигену та/або пухлинного антигену, де пухлинний антиген є відмінним від антигенів асоційованих із вірусом, що використовувався для вакцинації. Тим не менш, це здійснення не обмежується новонародженими або ще ненародженими тваринами. Навпаки, в альтернативному втіленні винахід може бути застосований до тварин усіх вікових груп, оскільки позитивний ефект може спостерігатися також у дорослих тварин. Отже, згідно до цієї реалізації віруси, як зазначено вище, зокрема MVA-BN та його похідні також корисні для захисту тварин, включаючи людину, проти антигену, вибраного між пухлинним антигеном та зовні-

шнім антигеном, пухлинний антиген та/або зовнішній антиген є відмінними від антигенів пов'язаних із вірусом. Як відмічено вище, віруси застосовані, згідно даного винаходу здатні інфікувати клітини тварини, але не здатні бути реплікованими в інфекційне вірусне потомство у вказаних клітинах. Уся інформація, визначення, включаючи визначення тривалості захисної дії, приклади так само як і бажані, більш бажані і найбільш бажані виконання приведені вище для новонароджених також використовуються в даному виконанні згідно до якого вірус також може застосовуватись дорослим.

На відміну від новонароджених, імунна система дорослих тварин вже сформована. Тим не менш, може так бути, що імунна система є ослабленою із-за певної хвороби або просто із-за віку тварини.

Особливо у людей із послабленою імунною системою та у людей похилого віку застосування вірусів, згідно даного винаходу, зокрема MVA та до тварин може мати позитивний ефект, між іншим, через збільшення рівня факторів, що активують та/або мобілізують дендритні клітини (DC) або їхні клітини-попередники та/або через збільшення кількості дендритних клітин або їхніх клітин-попередників та/або збільшення вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону або IL-12. Таким чином, навіть у дорослих тварин застосування вірусів, згідно даного винаходу, зокрема MVA, може призводити до збільшеної компетентності імунної системи для боротьби з зовнішніми антигенами та/або пухлинними антигенами. Іншими словами, віруси використані, згідно даного винаходу є корисними для активації імунної системи взагалі.

Винахід також стосується вірусів, згідно даного винаходу, зокрема MVA, для виготовлення медикаментів для застосування їх тваринам, включаючи людину, де вказаний медикамент збільшує рівень факторів, котрі активують дендритні клітини та/або збільшують кількості дендритних клітин та/або збільшують вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону (IFN) або IL-12. Усі визначення подані вище для інших реалізацій також застосовні для даної реалізації. Згідно даної реалізації винахід не спрямовано, в першу чергу, на індукування захисту проти зовнішнього антигену та/або пухлинного антигену. Замість цього застосування спрямоване на лікування станів та захворювань, які характеризуються низьким рівнем факторів, які активують дендритні клітини та/або недостатньою або дуже низькою кількістю дендритних клітин та/або низьким виробленням та/або клітинним вмістом інтерферону (IFN) або IL-12. Таким чином, відповідно до цього застосування лікування вірусом згідно даного винаходу, зокрема MVA може захистити проти алергій та аутоімунних захворювань. Також це лікування може бути застосоване, якщо віруси, згідно даного винаходу MVA застосовані до новонароджених тварин.

Також, відповідно до наступного виконання винаходу, вірус, згідно даного винаходу, такий як MVA, зокрема MVA-BN та його похідні, є надзвичайно корисними для індукування імунних відповідей у тварин з ослабленим імунітетом, наприклад,

мавпи (CD4<400/tel в крові) інфіковані SIV або люди з ослабленим імунітетом. Термін "з ослабленим імунітетом" описує стан імунної системи особи, котрий проявляє лише неповні імунні відповіді або має знижену ефективність в захисті проти збудників інфекцій.

Винахід, також, стосується способу захисту тварин, включаючи людину, проти антигену, вибраного з поміж пухлинного антигену та зовнішнього антигену, який полягає й застосуванні вірусу згідно даного винаходу, зокрема модифікованого вірусу коров'ячої віспи Ankara (MVA), де пухлинний антиген та/або зовнішній антиген є відмінними від антигенів пов'язаних із вірусом.

В наступному втіленні винахід включає спосіб лікування тварини, включаючи людину, спрямований на збільшення рівня факторів, які активують дендритні клітини та/або збільшують кількість дендритних клітин та/або збільшують виробленням та/або клітинний вміст інтерферону (IFN) або IL-12, який включає застосування модифікованого вірусу коров'ячої віспи Ankara (MVA).

Стисле викладення винаходу

Використання вірусу для виготовлення медикаменту для вакцинації або лікування новонароджених або внутрішньоутробних тварин, включаючи людину, при якому вірус здатний інфікувати клітини новонародженої або внутрішньочеревинної тварини, включаючи людину, але не здатний бути реплікованим в інфекційне вірусне потомство у новонародженій або внутрішньочеревинній тварині, включаючи людину.

Спосіб лікування або вакцинації новонародженої або внутрішньочеревинної тварини, включаючи людину, який включає введення вірусу, де вірус здатний інфікувати клітини новонародженої або внутрішньочеревинної тварини, включаючи людину, але не здатні бути реплікованими в інфекційне вірусне потомство у новонародженій або внутрішньочеревинній тварині, включаючи людину.

Вірус для вакцинації або лікування новонароджених або внутрішньоутробних тварин, включаючи людину, при якому вірус здатний інфікувати клітини новонародженої або внутрішньочеревинної тварини, включаючи людину, але не здатний бути реплікованими в інфекційне вірусне потомство у новонародженій або внутрішньочеревинній тварині, включаючи людину.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де вірус є ДНК вірусом.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де вірус вибрано з поміж DISC-герпесвірусів та модифікованого вірусу коров'ячої віспи Ankara (MVA).

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де штам MVA є MVA-BN, депонований в Європейській Колекції Культур Тваринних Клітин (ECACC) із депозитним номером V00083008 та його похідні.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де MVA застосовується орально, назально, внутрішньом'язево, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно, інтрадермально, внутрішньочеревинно та/або підшкірним введенням.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де MVA застосовується в терапевтично ефективній кількості в першій інюкуляції ("первинній інюкуляції") та другій інюкуляції ("підсилюючій інюкуляції").

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де MVA застосовується до тварин, включаючи людину, в кількості принаймні 10^7 TCID₅₀ (доза інфікування тканинної культури). Використання способу або вірусу, як зазначено вище, де вакцинація здійснюється проти поксвірусної інфекції.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де поксвірусна інфекція є звичайною віспою.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де вірусний геном включає, принаймні, одну гетерологічну послідовність нуклеїнової кислоти.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти вибрана з послідовності, що кодує, принаймні, один антиген, антигенний епітоп та/або терапевтичну сполуку.

Використання, спосіб або вірус, як зазначено вище, де вакцинація здійснюється проти агенту, з якого походить гетерологічна послідовність, або агенту, який включає принаймні один антиген або антигенний епітоп.

Використання, спосіб або вірус, де вакцинація проводиться для захисту тварин, включаючи людину, проти антигену, вибраного з поміж пухлинного антигену та чужорідного антигену, де пухлинний антиген та/або чужорідний антиген є відмінними від асоційованих з вірусом антигенів.

Використання, спосіб або вірус, де чужорідний антиген вибраний з інфекційних агентів та токсинів.

Використання, спосіб або вірус, де інфекційний агент вибраний з вірусів, бактерій, пріонів та грибків.

Використання, спосіб або вірус, де вакцинація або лікування проводиться для викликання або підсилення дозрівання та/або активації імунної системи.

Використання, спосіб або вірус, де лікування проводиться для (i) збільшення рівня факторів котрі активують та/або мобілізують дендритні клітини або їхні клітини попередники, (ii) для збільшення кількості дендритних клітин або їхніх клітин попередників або (iii) для збільшення вироблення та/або клітинного вмісту інтерферону (IFN) або IL-12.

Використання, спосіб або вірус, де фактор, котрий активує дендритні клітини є Flt3-L та/або GM-CSF.

Використання, спосіб або вірус, де інтерферон є IFN- α або IFN- β .

Фармацевтична композиція яка включає вірус, як описано вище.

Вакцина яка включає вірус, як описано вище.

Короткий опис фігури

Фігура 1A: Новонароджену мишу було ін'єктовано одноразово на протязі 24-48 годин після народження 10^6 p.f.u. MVA або DISC HSV-1 або введено фізіологічний сольовий розчин (NaCl), як контроль. У віці 7-й днів, CD11c, ran-DC маркер було застосовано для визначення цих клітин в

периферичній крові проточною цитометрією. Показано середнє й стандартне відхилення від 3 до 5 експериментів.

Фігура 1B: Експеримент як на Фіг.1A. Однак, клітини CD11c було визначено в селезінці проточною цитометрією.

Фігура 1C: Експеримент як на Фіг.1A. Однак, клітини CD11c було визначено в перитонеальній рідині проточною цитометрією.

Фігура 2: Мишу було вакциновано MVA-BN як показано в лівій колонці. Після двох тижнів процентний вміст одиничних CD11c+ та подвійних CD11c+/CD8+ позитивних клітин в селезінці та в крові було визначено проточною цитометрією.

Фігура 3: Новонароджену мишу було ін'єктовано MVA або NaCl як контроль у віці 1 та 5 днів. На 8 день, мишачі Flt3-L було визначено в сироватці цієї миші методом ELISA й значення приведено як pg/ml

Фігура 4: Новонароджену мишу було ін'єктовано одноразово на протязі 24-48 годин після народження 10^6 p.f.u. MVA або DISC HSV-1 або введено фізіологічний сольовий розчин (NaCl) як контроль. Вік 7 днів, усі миші одержали $100 \times$ LD₅₀ штаму F HSV-1. Кількість тварин, що вижили спостерігали на протязі 21 дня.

Фігура 5: Мишей було оброблено як на Фіг.4. Дані представляють 9 різних експериментів із 100 LD₅₀ HSV-1. Жодна з тварин не вижила в експерименті.

Фігура 6: Виживання дорослих мишей, вакцинованих у перший день життя MVA-BN після випробування летальною віспою. Три приплоди по 6 1-денних (18 мишей) було вакциновано (2.5×10^7 TCID₅₀) та у віці 4 тижні (дорослі миші) заражено летальною дозою коров'ячої віспи. Добре зрозуміло, що вакцинація MVA-BN індукує захисний імунітет у новонароджених мишей, котрі дожили до дорослого віку.

Приклади

Наступні приклади детальніше проілюструють даний винахід. Досвідчений в цій галузі особі має бути добре зрозуміло, що приведені приклади ні в якому разі не можуть бути інтерпретовані як обмеження до цих прикладів, застосування технології, запропонованої даним винаходом.

Приклад 1

(i) MVA-BN та DISC-HSV індукують DC фенотипів CD11c+ та CD8+ у новонароджених тварин

Перша серія експериментів: Новонароджені миші є природно імунодефіцитні, оскільки їхня IFN система ще не сформована. Кількість та активований стан DC, найкращих, з відомих на сьогодні, продуцентів IFN ще не була проаналізована. DC можуть бути індуковані *in vitro* так само як і *in vivo* різноманітними стимуляторами. В цих дослідженнях вивчалось чи може контрольована реплікація MVA-BN індукувати DC й аналізовано їхній фенотип. Групи мишей були ін'єктовано 10^6 бляшкоутворюючих одиниць (p.f.u.) MVA-BN або сольовим розчином лише на протязі 1-2 днів після народження і в деяких випадках на 5-й день після народження. Клітини крові та селезінки окремих мишей з кожної групи було проаналізовано за допомогою FACS і дані порівняно.

Дані від 7 до 8 окремих мишей вказують на те, що застосування MVA-BN збільшує кількість CD11c⁺ клітин у 2-3 рази, що супроводжується збільшеною експресією MHC II та збільшеною присутністю Т-клітин типів CD4 або CD8. Цікаво, що CD19/54, маркер зрілих В-клітин зменшувався, вказуючи на те, що ці клітини емігрували до органів, крім селезінки або, що попередники В-клітин були залучені достроково до інших ліній, особливо, DC плазматоїдного фенотипу, котрі несуть маркери ранніх В-клітин (B220).

Дані з трьох різних експериментів вказують на відтворюваність та значні відмінності. Експерименти із DISC-HSV-1, іншою вірусною вакциною із контрольованою реплікацією, індукування схожій кількості клітин CD11c⁺ після неонатального введення.

Результати узагальнено на Фіг.1А-С.

Для подальшого вивчення субпопуляцій DC в крові та селезінці та проаналізувати довготривалу дію лікування MVA-BN, клітини крові та селезінки досліджували у 2-місячному віці. В цей час, оброблені тварини мали приблизно подвійну кількість клітин CD11c⁺ в селезінці ніж у віці одного тижня але одноразове введення вірусу при народженні призводило до 3-кратного збільшення кількості цих клітин в селезінці через два тижні (Фіг.2). Подібний ефект було відмічено в крові, за виключенням того, що CD11c⁺/CD8a⁺ було приблизно в 4 рази вищим. Одноразове оброблення MVA-BN на 7 день життя призвело до збільшення CD11c⁺/CD8a⁺ від 13 до 40 разів із менш вразливою дією на клітини CD11c⁺. Як очікувалося, дві вакцинації при народженні та на 7-й день мали значний ефект на клітини CD11c⁺. Різні ефекти показано на Фігурі 2.

Друга серія експериментів: Миші віком один тиждень були вакциновані при народженні 2.5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN й показали різний склад імунологічно важливих клітинних популяцій в селезінці й крові ніж у контрольних мишей (Таблиця 1). В крові було збільшення кількості CD8-позитивних лімфоцитних популяцій так само як і збільшення кількості NK-клітин. Кількість CD11c⁺-позитивних клітин була приблизно в 3 рази вища за контрольних та відсоток В-клітин (B220 та CD19 подвійно позитивних клітин) значно збільшився. В селезінці загальна кількість клітин не відрізнялася у імунізованих тварин та контролю. На відміну від крові, селезінка вакцинованих тварин мала більше CD4-позитивних Т-лімфоцитів ніж в контролі й кількість NK-клітин не збільшилася. Подібно до крові, відносна кількість CD8-позитивних лімфоцитів збільшилася й кількість В-клітин зменшилася. Відсоток CD11c-позитивних клітин був приблизно втричі вищим ніж в контролі. Ми першими виявили відмінність в процентному відношенні дендритних клітин на 5 день після вакцинації MVA-BN, коли кількість CD11c-позитивних клітин в селезінці 4-х контрольних необроблених була 3.6%, порівняно із 4.8% у 4-х вакцинованих MVA-BN мишей. Така ж кількість інактивованих ультрафіолетом MVA-BN не викликала будь-яких значних змін в клітинних популяціях після вакцинації новонароджених мишей порівняно із контролем (дані показано). Початкова доза вакцинації обиралася довільно. Після титрування інокуляту ми відібрали стандартну дозу для вакцинації 2.5×10^6 TCID₅₀ (в 10 разів менше ніж початкова в експерименті). При такій дозі було індуковано максимальну кількість DC (Табл.2).

Таблиця 1

Зміни індуковані в крові та в селезінці у новонароджених мишей через 1 тиждень після імунізації 2.5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN EMI35

Параметр %	NaCl	Кров MVA-BN	P*	NaCl	Селезінка MVA-BN	P*
Всього клітин $\times 10^6$				17.9 \pm 1.9	24.1 \pm 2.6	0.105
%CD11c	5.4 \pm 1.3	18.6 \pm 1.5	0.001	2.8 \pm 0.1	7.9 \pm 0.8	0.001
%CD11c/CD8 α	0.5 \pm 0.1	2.7 \pm 0.3	0.001	1.1 \pm 0.1	4.6 \pm 0.7	0.002
%CD4/CD3	16.9 \pm 1.1	16.1 \pm 1.5	0.999	4.8 \pm 0.3	8.1 \pm 1.5	0.004
%CD8 α /CD3	6.0 \pm 0.9	10.3 \pm 0.9	0.002	4.7 \pm 0.3	8.4 \pm 1.1	0.002
%NK1.1/DX5	16.4 \pm 1.2	24.4 \pm 3.3	0.032	2.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	0.862
%CD19/B220	22.3 \pm 0.5	8.4 \pm 0.8	0.001	16.2 \pm 1.3	8.6 \pm 0.9	0.004

*U-тест Манна-Уїтні

Таблиця 2

Індукція CD11c-позитивних клітин в селезінці 1-денних білих мишей та мишей із порушеннями спрямованими на ген на протязі 7 днів після обробки MVA.

Мишина лінія	MVA доза (TCID ₅₀)	контроль %CD11c	MVA-BN %CD11c	відн-ня
wt ^a	2.5×10^7	2.8	7.9	2.8
wt	2.5×10^6	2.1	11.9	5.6
wt	2.5×10^5	2.5	6.6	2.6
RAG ^b	2.5×10^7	4.2	5.4	1.3
AG129 ^c	2.5×10^3	2.6	2.7	1.0

^aWt=C57BL/6 та 129Sv/Ev миші.

^bRAG миші із делецією в гені активації рекомбінації (наприклад, не функціонуючі T- та B-клітини).

^cAG129 порушення спрямовані на ген рецептору I типу IFN (IFN- α та - ρ) та II типу (IFN- γ)

(ii) MVA-BN індукуює переважно, плазмацитоїдні дендритні клітини (pDC).

Згідно до інших авторів, вважається, що pDC є CD11c-позитивними клітинами, які теж експресують CD45RA або CD45R (Asselin-Paturel, et al. 2001, Nat Immunol, 12: 1144). Питалося чи індукував MVA-BN збільшення pDC. Було виконано наступний експеримент, в якому також було проаналізовано CD45RA або CD45R на opCD11c-позитивних клітинах. Відсоток CD11c та CD45R подвійно позитивних клітин був значно вищий у мишей оброблених MVA-BN (5.60. 7%) ніж в обох контрольних групах (необроблені $3.0 \pm 0.3\%$, $p=0.01$; УФ-інактивовані MVA-BN $3.0 \pm 0.2\%$, $p=0.006$. U-тест Манна-Уїтні).

iii. Новонароджені миші оброблені MVA-BN мали підвищений рівень сироваткового Flt3-L

Flt3-L є гематопоетичним фактором котрий призводить до підвищення рівнів DC у дорослих тварин. У людей і можливо мишей найбагатшим джерелом цього фактору є активовані T-клітини. Для визначення чи може підвищена кількість DC результатом індукування Flt3-L, сироватка мишей

оброблений MVA-BN була порівняна із тваринами обробленими фіз. розчином на присутність цього фактору. Тварини оброблені на другий та п'ятий день мали подвоєні рівні Flt3-L в сироватці, порівняно із сироваткою оброблених фіз. розчином. Звідси, Flt3-L є одним з факторів які можуть бути відповідальні за підвищення кількості DC (Фіг.3).

Час курсу індукції Flt3-L у новонароджених мишей було визначено після введення MVA-BN. У новонароджених, вакцинація MVA-BN викликала збільшення концентрації Flt3-L на протязі 24 годин. Індукція досягла максимуму після 48 годин і все ще тривала на 7-й день, коли звичайно досліджували клітини селезінки й перевіряли резистентність до HSV-1 (див. нижче). У вакцинованих мишей концентрація в сироватці Flt3-L збільшилася у два рази через 24 та 48 годин після вакцинації, порівняно із відповідним віковим контролем.

Приклад 2

(i) новонароджені миші, яким було введено MVA-BN пережили зараження від 100 до 500 LD₅₀ HSV-1

Група мишей, яким було введено стандартну дозу MVA-BN на перший чи 2-й день після народження були заражені від 100 до 500 LD₅₀ симплеквірусом герпесу 1 (HSV-1) (Фіг.4). Миші яким було введено MVA-BN пережили зараження HSV-1, тоді

як усі контрольні миші загинули на протязі 5-6 днів після інюкуляції заражуючим вірусом.

Подальше підтверджує ці спостереження, 9 експериментів із зараженням було виконано на 40 мишах, яким було введено MVA BN та 45 контрольних мишах. Більш ніж 80% мишах, яким було введено вірус пережили зараження, тоді як всі контрольні загинули (Фіг.5).

В окремій серії експериментів мишам ввели при народженні MVA-BN (2.5×10^6 TCID₅₀/мишу). На 8-й день було виконане введення по 10^3 (1LD₅₀) або 10^5 (100LD₅₀) PFU HSV-1. Після вакцинації MVA-BN 65% мишей пережило зараження вірусною дозою, яка вбила 100% контрольних мишей (100LD₅₀) та 90% пережило вірусну дозу, яка вбила 45.5% контролю (1LD₅₀). В додаткових експериментах група із 7 мишей вакцинована інактивованим ультрафіолетом MVA-BN була інфікована HSV-1. П'ять з них загинули на протязі 7 днів. Інші 2 тварини, що залишилися, припинили рости й загинули на 22 та 29 день. Миші яким ввели MVA-BN досягли стану підвищеної резистентності до HSV-1, що було пов'язане із живим MVA-BN, а не з інактивованим MVA-BN.

В контрольному експерименті проведеному на мишах, які не мали функціональних Т-клітин було визначено, що не було захисту від HSV-1 після вакцинації MVA-BN із-за перехресно-реактивних цитотоксичних Т-лімфоцитів індукованих MVA-BN.

Було перевірено чи є клітини DC відповідальними за захист від HSV-1 після вакцинації MVA-BN. Для цього нативні миші віком 8 днів були заражені 5×10^4 PFU HSV-1 через 4 години після перенесення клітин від мишей, яким було введено MVA. В першому експерименті спленоцити від 8-денних мишей, яким в перший день життя було введено MVA-BN було розділено на багату на DC (низької щільності) та багату на DC (високої щільності) фракції. 50% мишей які отримали 5×10^6 клітин із фракції багатой на DC пережили випробування тоді як усі миші, котрі отримали у 10 разів біднішу на DC суспензію або зовсім не отримали загинули на протязі 5 днів. Другий підхід було виконано перенесенням виділених CD11c-позитивних клітин від 8-денних мишей котрим було введено у перший день життя MVA-BN до нативних які не отримували цього. Введення суспензії 2×10^6 спленоцитів містила більш ніж 80% CD11c-позитивних клітин від мишей яким ввели MVA-BN захистило нативних мишей від HSV-1. На відміну від цього, 4 миші з одного приводу так само, як і 8 інших мишей яким нічого не ввели загинули після випробування. Також, миші, які отримали таку саму кількість клітин селезінки або одержали один селезінковий еквівалент (50×10^6 клітин) з негатив-

ної фракції не показали підвищеної резистентності до HSV-1. Отже, Cd11c-позитивні клітини здатні захищати мишей від HSV-1.

Після застосування MVA короткотривалий захисні ефекти в межах 24 годин було описано в літературі (Vilmsmeier, B., Berl. Munch.Tierarztl. Wschr. 112 (1999), 329-333). Оскільки віруси використані у вказаній публікації не є вірусами, котрі не здатні бути реплікованими в інфекційне вірусне потомство в новонароджених та пренатальних тваринах, було перевірено, чи спосіб дії описаний у Vilmsmeier є подібним до способу дії описаному в даному винаході. Більш докладно, Vilmsmeier описує, що MVA, зокрема інактивованій MVA, індукує параімунний ефект на протязі приблизно 24 годин. Для перевірки чи параімунний ефект також лежить в основі захисної дії яку описано в даній заявці миші на 24 годину після народження були вакциновані MVA-BN та інактивованим MVA-BN. На 7 день життя мишей було заражено летальною дозою HSV-1 (10^5 PFU HSV-1f). Невакциновані контрольні миші загинули через 6 днів після випробування. Також миші вакциновані інактивованим MVA-BN були незахищені від зараження HSV-1. Кількість клітин DC у цих мишей не піднялася. На відміну від цього, миші вакциновані неінактивованим MVA-BN були значно більш захищені від зараження HSV-1. Через 30 днів після випробування більше 80% мишей все ще були живі. Двома днями після вакцинації було знайдено підвищений сироватковий Flt3-L у сироватці. Підвищена кількість DC була знайдена в селезінці. Підсилений Flt3-L було пов'язано із підвищеною кількістю DC. Це підтверджує, що ефект параімунності не відповідає за даний захист.

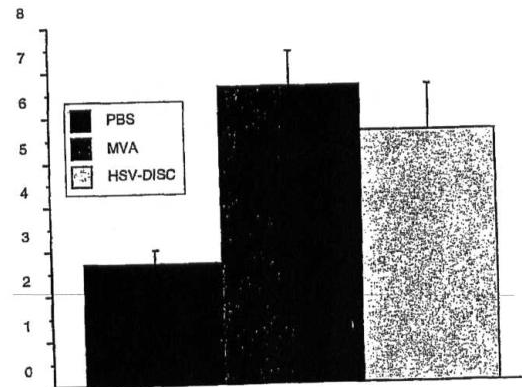
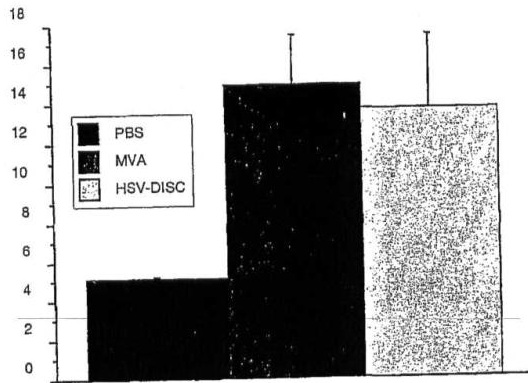
(ii) MVA-BN індукує специфічну імунність у новонароджених яка залишається до подорослішання

Одноденні миші C57Bl/6 (розмір групи 18) були вакциновані (i. p) MVA-BN (2.5×10^7 TCID₅₀). Чотирма тижнями пізніше, коли миші вже вважаються дорослими їх було заражено летальною дозою (1×10^7 TCID₅₀) коров'ячої віспи Western Reserve (VV-WR). За виключенням однієї тварини всі інші, вакциновані MVA-BN вижили. Тоді як, усі вакциновані плацебо тварини загинули на протязі 7 днів із усіма клінічними проявами хвороби, такими як, збита шерсть, втрата ваги та знижена активність. Добре видно, що це є демонстрація, того, що MVA-BN не лише безпечна у новонароджених тварин, алей здатна викликати захисну імунну відповідь проти смертельної інфекції коров'ячої віспи (близького вірусу до MVA-BN).

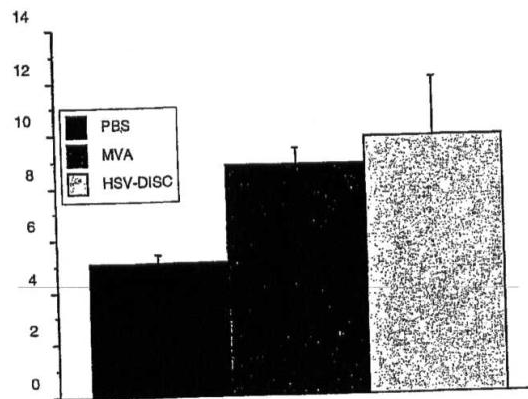
31

85371

32



ФІГ. 1А



ФІГ. 1В

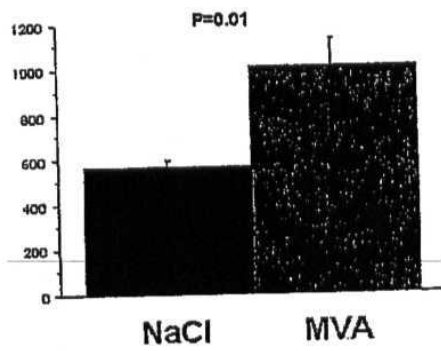
ФІГ. 1С

Експеримент В№9		кров		селезінка	
	n	% CD11c	% CD11c CD8	% CD11c	% CD11c CD8
naïve	3	3.5	0.4	4.9	1.3
1 Вакцинація при народженні	3	7.4	2.1	16.1	2.0
1 вакцинація на 7 день	4	21.5	17.0	4.4	17.6
2 вакцинація на день 0 та день 7	4	42.7	35.6	27.9	25.7

Вміст CD11c клітин у мишей за два тижні
після вакцинації MVA

ФІГ. 2

Flt3L у сироватці мишей на 8 день



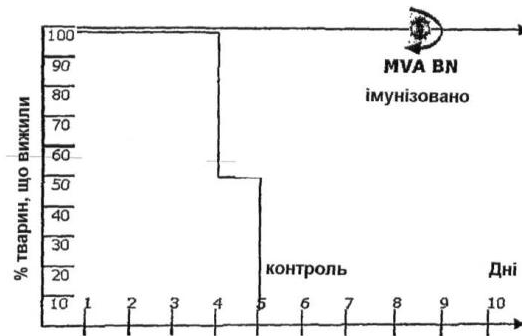
Ін'єкції MVA на 1 та 5 день

ФІГ. 3

	інфіковано	вижило
Контроль	45	0
MVA	40	34

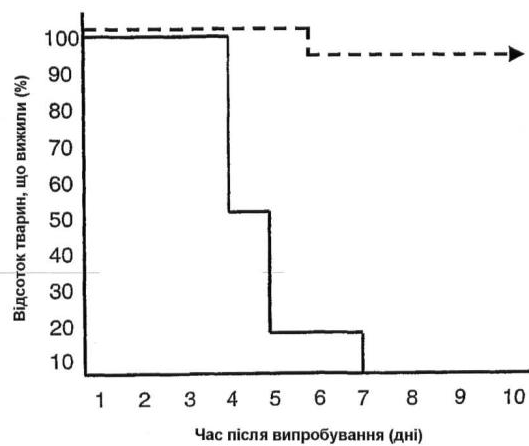
9 експериментів із HSV-1

ФІГ. 5



Захист проти летального інфікування

ФІГ. 4



ФІГ. 6