

SP031610/G

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01806494.9

[51] Int. Cl.

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

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1291012C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/20 (2006.01)

[22] 申请日 2001.3.10 [21] 申请号 01806494.9

[30] 优先权

[32] 2000.3.14 [33] DK [31] PA200000410

[86] 国际申请 PCT/EP2001/002703 2001.3.10

[87] 国际公布 WO2001/068820 英 2001.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.13

[73] 专利权人 巴法里安诺迪克有限公司

地址 丹麦克维斯特加德

[72] 发明人 安东·梅尔

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 黄益芬 巫肖南

权利要求书 4 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)的变株

[57] 摘要

本发明提供修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)的新毒株,其对于大多数哺乳动物特别是人有着强减毒毒性,虽然如此但是其仍在被核准为产生治疗性物质(例如疫苗)的传代细胞系的细胞中生长。本发明还提供一种生产所述适应的MVA株的方法。所述适应的MVA可以作为载体系统,或者以作为辅助剂或作为免疫系统的非特异性成分的调节剂的活性或灭活形式用于例如肠胃外的免疫接种。

1. 一种修饰的安卡拉牛痘病毒 MVA, 适应在传代细胞系的细胞中生长, 其中所述细胞系是 Vero 细胞系。

2. 根据权利要求 1 的 MVA, 其中所述细胞系是 Vero 细胞系 ATCC No.CCL-81。

3. 根据权利要求 2 的 MVA, 保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 ECACC, Salisbury, UK, 保藏号是 99101431。

4. 根据权利要求 2 的 MVA, 其是适应在所述 Vero 细胞系中, 以和保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 ECACC、保藏号为 99101431 的保藏菌株的生长速度基本上相同的速度生长, 但是与该保藏的菌株相比其基因组中至少有一处差别的 MVA。

5. 根据权利要求 2 的 MVA, 保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 ECACC, Salisbury, UK, 临时登记号是 01021411。

6. 根据权利要求 2 的 MVA, 其是适应在所述 Vero 细胞系中, 以和保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 ECACC、临时登记号是 01021411 的保藏菌株的生长速度基本上相同的速度生长, 但是与该保藏的菌株相比其基因组中至少有一处差别的 MVA。

7. 根据前面权利要求 1-6 任一项的 MVA, 含有至少一种异源核酸序列。

8. 根据权利要求 7 的 MVA, 其中异源核酸序列能编码治疗性蛋白质和/或抗原决定簇。

9. 根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 病毒感染的一种宿主细胞。

10. 一种组合物, 含有根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 和/或 MVA 的 DNA。

11. 权利要求 10 的组合物, 该组合物是药物组合物。

12. 根据权利要求 10 或 11 的组合物, 其中所述组合物是疫苗。

13. 根据权利要求 10 或 11 的组合物, 用于对包括人的活动物体的免疫接种。

14. 权利要求 12 的组合物, 用于对包括人的活动物体的免疫接种。

15. 根据权利要求 12 的组合物, 用于免疫抵抗正痘感染。

16. 根据权利要求 13 的组合物, 用于免疫抵抗正痘感染。
17. 根据权利要求 14 的组合物, 用于免疫抵抗正痘感染。
18. 根据权利要求 12 的组合物, 用于使猫免疫抵抗猫痘感染, 使小鼠免疫抵抗先天性缺肢畸形感染和/或使骆驼免疫抵抗骆驼痘感染。
19. 根据权利要求 13 的组合物, 用于使猫免疫抵抗猫痘感染, 使小鼠免疫抵抗先天性缺肢畸形感染和/或使骆驼免疫抵抗骆驼痘感染。
20. 根据权利要求 14-17 任一项的组合物, 用于使猫免疫抵抗猫痘感染, 使小鼠免疫抵抗先天性缺肢畸形感染和/或使骆驼免疫抵抗骆驼痘感染。
21. 根据权利要求 10 的组合物, 其中 MVA 是免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂。
22. 一种组合物, 含有根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 和/或 MVA 的 DNA 作为辅助剂。
23. 权利要求 22 的组合物, 其是一种药物组合物。
24. 一种组合物, 含有根据权利要求 7 或 8 的重组 MVA 和/或重组 MVA 的 DNA, 用于基因治疗。
25. 权利要求 24 的组合物, 其是一种药物组合物。
26. 一种将同源和/或异源核酸序列导入靶细胞的方法, 包括用根据权利要求 7 或 8 的 MVA 和/或 MVA 的 DNA 感染靶细胞。
27. 获得根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 株的方法, 包括以下步骤:
 - a) 用野生型 MVA 感染 Vero 细胞系的细胞,
 - b) 收集从步骤 a) 感染的细胞中得到的病毒,
 - c) 用步骤 b) 中收集的新产生的病毒感染 Vero 细胞系的新细胞, 和任选包括
 - d) 重复 b) 和 c), 直到病毒适应在 Vero 细胞系的细胞中生长。
28. 权利要求 27 的方法, 其中所述野生型 MVA 为保藏在 ECACC, 保藏号是 V 94012707 的 MVA。
29. 产生根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 的病毒颗粒的方法, 包括以下步骤:
 - a) 在合适的条件下培养 MVA 能在其中复制的细胞系的细胞,
 - b) 用所述 MVA 感染所述细胞系, 以及

- c) 收集由所述细胞产生的病毒颗粒。
30. 一种制备核酸序列、肽和/或多肽的方法，包括以下步骤：
- a) 用根据权利要求 7 或 8 的重组 MVA 感染宿主细胞，
 - b) 在合适的条件下培养感染的宿主细胞，以及任选包括
 - c) 分离和/或富集由所述宿主细胞产生的核酸序列、肽和/或蛋白质。
31. 根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 的用途，用于制备一种治疗或预防由所述 MVA 引起的疾病或障碍的药物组合物。
32. 根据权利要求 31 的用途，用于制备一种使包括人的活动物体免疫的疫苗。
33. 根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 在制备免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂中的用途。
34. 根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA 在制备辅助剂中的用途。
35. 根据权利要求 1-8 的 MVA 作为疫苗的用途。
36. 根据权利要求 1-8 的 MVA 作为辅助剂的用途。
37. 根据权利要求 1-8 的 MVA 作为免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂的用途。
38. 权利要求 10-20 任一项的组合物的用途，用于制备使包括人的活动物体免疫的药物。
39. 权利要求 21 的组合物的用途，用于制备包括人的活动物体的免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂。
40. 权利要求 22 或 23 的组合物的用途，用于制备增强包括人的活动物体体内抗疫苗中抗原决定簇的免疫应答的药物。
41. 权利要求 7 或 8 的 MVA 的用途，用于制备对包括人的动物体实施体外或离体的基因治疗的药物。
42. 权利要求 7 或 8 的 MVA 的用途，用于制备对动物体实施体内基因治疗的药物。
43. 根据前面权利要求 1-8 任一项的 MVA，由包括下面步骤的方法获得：
- a) 用野生型 MVA 感染 Vero 细胞系的细胞，
 - b) 收集由所述细胞系感染的细胞中产生的病毒颗粒，以及任选地包括
 - c) 用新产生的病毒感染 Vero 细胞系的新细胞，并收集所述细胞中产生

的病毒，其中重复步骤 c)，直到病毒适应在所述细胞系的细胞中生长。

44. 权利要求 43 的 MVA，其中所述野生型 MVA 为保藏在 ECACC，保藏号是 V 94012707 的 MVA。

修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)的变株

本发明涉及修饰的安卡拉(Ankara)牛痘病毒(MVA)的新的毒株。该毒株对于大多数哺乳动物特别是人有着强减毒毒性,虽然如此,但它生长在能有效产生治疗性物质例如疫苗的传代细胞系的细胞中。

本发明还涉及产生这种修饰的MVA株的方法。MVA可以作为载体系统,或者以作为辅助剂或者作为免疫系统的非特异性成分的调节剂的活性或灭活形式用于例如肠胃外的免疫接种。

发明背景

生物体总是不断地受到一些感染性物质如细菌、病毒、真菌或寄生虫的侵袭。免疫系统通过破坏和消除这些感染物质和它们所产生的毒性分子而防止生物体受到由这些物质引起的经常性感染。免疫系统可分为特异性和非特异性部分,但这两部分是紧密地交叉关联的。非特异性免疫应答能够立即防御各种各样的外来物质和感染性试剂。相反,特异性免疫应答是当生物体第一时间受到一种物质的攻击时,在某一滞后期之后产生。但是,特异性免疫应答是高效的。特异性免疫应答的作用是保护一种从特异性感染恢复的肌体,使其能抵抗这种特异性感染,但是对其它传染性疾病仍然易受感染。一般情况下,受相同或者非常相似感染物质的第二次感染会引起轻得多的症状或者根本没有症状。该免疫性持续时间长,在一些情况下甚至是终生的。这种免疫记忆被用于接种疫苗,这时生物体受到无毒或灭活形式的感染试剂的攻击而诱发特异性免疫。有时将辅助剂掺入疫苗中以增强特异性免疫应答。

对于传染性疾病和免疫性的认识大多来自对天花的研究。这种疾病是由天花病毒引起的,天花病毒是正痘病毒属中的一员。近两个世纪以前,开始用牛痘进行免疫性接种,产生抗天花免疫。用牛痘病毒进行随后的免疫接种。二十世纪五十年代早期,很多工业化国家通过利用牛痘病毒疫苗的接种消除了地方性天花。然而,用这种牛痘病毒接种疫苗有时会导致严重的并发症,例如接种后脑炎、扩散化牛痘或者接触性感染。

Anton Mayr 开发出一种不表现出这些并发症的新的疫苗。这种痘病疫

苗由修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)组成并且用于肠胃外接种抵抗天花, 大约 150 000 例接种没有引起与该接种相关的任何并发症。即使具有免疫缺陷的儿童也没有表现出严重的副作用。MVA 是通过在鸡胚胎成纤维细胞培养物中诱变和筛选源安卡拉牛痘病毒传代 575 代之后获得的。生物学、化学和物理学特性反映出该 MVA 是安全的。MVA 具有低的分子量, 基因组中有 6 处缺失, 并且对于哺乳动物细胞是高度减毒的, 即其合成 DNA 和蛋白质, 但是基本上不产生病毒颗粒。Anton Mayr 开发的修饰的安卡拉牛痘病毒保藏在欧洲细胞培养物收集中心(the European Collection of Cell Cultures (ECACC)), Salisbury, UK, 保藏号是 No. V 94012707。

抗天花疫苗接种是非常成功的。在 1979 年, 世界卫生组织(World Health Organization)宣告天花被根除。因此, 对儿童中止了大量接种疫苗, 而只有一些国家的实验室工作人员和军队成员接受该接种。

根除天花的同时, 去除了人的痘病感染的主要致因。但是, 一些非人痘病毒减小了宿主特异性, 即它们不只是在它们典型的宿主中引起感染(例如对于母牛牛痘感染), 而且还引起其它动物感染(例如鼠和猫)。人也可以受到这种途经的感染。因为部分人口不再有抗天花的免疫能力, 动物物种的正痘感染对于他们是危险的。驯养动物是感染人的主要来源。因此, 对驯养动物接种抵抗正痘病毒的疫苗越来越重要。另外, MVA 作为基因治疗的载体是有意义的, 即将核酸序列转移到靶细胞中在那里表达。

对于 MVA 的对数复制, 需要原代和次生鸡胚胎成纤维细胞的细胞培养物。从孵化 10-12 天的鸡蛋获得该细胞。由于使鸡蛋发生生物变异性, 因此从该细胞培养体系获得的细胞在细胞水平上也是变异的。另外, 在鸡胚胎“成纤维细胞培养物”中经常发现其它细胞类型例如上皮细胞。这种细胞变异也导致鸡胚胎成纤维细胞中产生的病毒的变异。因此难以将细胞培养体系标准化并且使之有效, 以保证不断产生高质量 MVA。此外, 孵化的鸡蛋中已经存在的微生物或病毒对细胞培养体系的污染不能完全排除。当 MVA 在病毒污染的细胞中生长时, MVA 可能会与污染的病毒重组。因此可以产生具有新的和不可预计特征的 MVA。对于在悬浮培养物中大规模产生病毒, 原代或次生鸡胚胎成纤维细胞也不是最合适的。另外, 超梯度离心对 MVA 的纯化和浓缩会是有益的。然而, 当原代或次生鸡胚胎成纤维细胞上培养 MVA 时, 这样的纯化是困难的。最后, 越来越多的患者产生了抗鸡蛋的白蛋白的变应性。

虽然该培养法的体外条件大大降低了变应原的潜在性,但是不能完全排除变应性反应的危险。

总之,一方面,MVA 只能有效地生长在原代或次生鸡胚胎成纤维细胞中,但是产生很多缺点;另一方面,其作为疫苗的大规模接种已证明了 MVA 对人的拯救性应用。

发明目的

本发明的目的是提供产生 MVA 同型病毒颗粒的条件。另外,所述条件将使得 MVA 容易大规模地生产。

发明的详细描述

为了实现上述目的和其它目的,本发明提供适合在传代细胞系细胞中生长的 MVA 毒株,所述细胞系对产生治疗性物质是有效的。

本发明第一次使有效且大规模生产 MVA 成为可能。由于传代细胞系的细胞是同种的并且它们的特征是稳定的,因此从这些细胞系收获的 MVA 也是同种的,具有高度可预测特征。此外,可以控制微生物遭污染的危险并且能够排除在鸡胚胎成纤维细胞上培养 MVA 时发现的鸡蛋蛋白质对 MVA 制备的污染。可方便地处理永久保留的细胞系,因此非常适合工业化应用。

在本发明优选的实施方案中,MVA 适合在哺乳动物细胞系的细胞中生长,这为疫苗的生产提供可能条件。出人意料地发现适应于哺乳动物细胞系例如非洲绿猴肾细胞系的 MVA 对人以及对各种各样的其它哺乳动物仍然具有减毒毒性。因此,MVA 是高度减毒的,即合成 DNA 和蛋白质时实际上没有产生病毒颗粒,结果实际上排除了产生疾病的能力。因此,根据本发明的 MVA 也非常适合作为人用和各种各样的哺乳动物用的疫苗。因此,MVA 在兽医领域特别适用。

此外,本发明提供了获得 MVA 株的方法。根据本发明的实施方案,用野生型 MVA 感染适合产生治疗物质的细胞系的细胞。优选的是,对于这种感染使用的是高度的多重感染 (MOI),即对于一个细胞使用多种病毒。然后,收获病毒并且用新制备的病毒感染相同细胞系的新细胞。重复所述过程(连续传代)直到 MVA 适应所述细胞系。当感染后 72 小时达到适应时,病毒效价与输入的病毒效价相比,提高至少 1-至 9-倍,优选 10-至 99-倍,更优选 100-

至 10^6 -倍, 最优选高于 10^7 -至 10^{10} -倍。这种适应是在有限次数的传代之后达到的。

"适应生长"是指与最初用来感染细胞的病毒的量(输入)相比, 提高了由感染产生的病毒的量(输出)。在这种情况下, 输出/输入之比大于 1。

在 ECACC, Salisbury, UK 保藏的保藏号是 99101431 和/或临时登记号 01021411 的 MVA 的"衍生物"是指这样的一种 MVA, 其适合以基本上和该保藏菌株的生长速度相同的速度在非洲绿猴肾细胞中生长, 但是与保藏的菌株相比其基因组中至少有一处差别。

术语"免疫系统"主要描述在防御生物体抵抗外来物质和微生物中所涉及的一种复合体。它分为含几种细胞类型(例如淋巴细胞和从白细胞衍生的其它细胞)的细胞部分, 和含肽和蛋白质(例如抗体、补体因子、和细胞因子)的体液部分。

术语"免疫应答"是指当外来物质或微生物进入生物体时免疫系统的反应。一般情况下, 免疫应答分为特异性和非特异性反应, 而这两部分紧密地交叉关联。非特异性免疫应答被认为是抵抗各种各样外来物质和感染物质的即时防御。特异性免疫应答是表征生物体抵抗外来物质的一种高效防御机制, 其在滞后期之后产生抵抗所述外来物质并且对于所述物质是高度特异性的。特异性免疫应答对于保护从特异性感染恢复的个体在将来抵抗这种特异性感染的现象中起着决定作用。

"免疫系统的激活剂"是指能激发或者增强免疫应答的任何物质。

"免疫系统的抑制剂"是指能够降低或抑制免疫应答的任何物质。

"免疫系统的稳定剂"是指能够保持免疫应答为恒定水平的任何物质。

本发明人提供了两种优选的 MVA 株, 它们是适应于称为 Vero 细胞系(ATCC No. CCL-81)的非洲绿猴细胞系。在非洲绿猴肾细胞中传代 100-代的 MVA-株称为"Vero-MVA", 其保藏在欧洲细胞培养物收集中心(the European Collection of Cell Cultures (ECACC)), Salisbury, UK, 保藏号是 No. 99101431。在非洲绿猴肾细胞中传代 200-代后的 MVA-株称为"Vero-MVA-200", 保藏在 ECACC, 临时登记号是 01021411。

通过在合适的条件下培养核准的细胞系的细胞, 用 MVA 感染细胞并且收获由所述细胞产生的病毒颗粒, 进一步扩增如上所述获得的 MVA。因此该 MVA 能够被大规模有效并且容易地扩增。出人意料的是, 本发明的 MVA 在

除 Vero 细胞之外的细胞例如人细胞系包括 HL, HEP-2 或 HeLA 中没有表现出高的毒性。

在本发明另一个实施方案中, MVA 包含至少一种异源核酸序列, 即自然状态下在 MVA 基因组(重组 MVA)中没有发现的核酸序列。优选的是, 该异源核酸序列是一种基因, 更优选是一种编码免疫蛋白质的基因, 并且最优选是一种编码能抵抗疟疾、狂犬病和/或肝炎的免疫蛋白质的基因。所述异源核酸序列的表达, 优选的是在牛痘病毒启动子的转录调控下进行, 更优选处于 MVA-自身启动子的调控下进行。在本发明另一个优选实施方案中, 在 MVA 基因组天然存在的缺失位点处插入该异源核酸的所述序列(PCT/EP96/02926 中公开)。

利用重组 MVA 将核酸序列导入靶细胞中, 所述核酸序列对于靶细胞是同源的或异源的。将异源核酸序列导入靶细胞中可以用来产生由体外所述核酸序列编码的异源核酸、肽和/或多肽和/或蛋白质。该方法包括用重组 MVA 感染宿主细胞, 在合适的条件下培养感染的宿主细胞, 并且任选地分离和/或富集由所述宿主细胞产生的肽和/或蛋白质。

此外, 同源或异源序列的导入可应用于体外、优选体内的基因治疗。对于体外和离体各自基因治疗来说, 从要治疗的个体分离细胞, 用重组 MVA 转化并且再次导入取出这些细胞的个体中。对于体内基因治疗, 直接对活动物体包括人体施用重组 MVA。在本发明优选实施方案中, 所述重组 MVA 表达抗原或者抗原表位。最优选的是, 所述载体表达了 *Plasmodium falciparum*、分枝杆菌(*Mycobacteria*)、疱疹病毒(*Herpes virus*)、流感病毒(*Influenza virus*)、肝炎病毒、或人免疫缺陷病毒的抗原决定簇。

因为本发明的 MVA 出人意料地仍然是高度减毒的, 所以 MVA 对于广大的哺乳动物包括人的免疫是理想的。因此, 本发明还提供一种含 MVA 的疫苗, 用于活动物体包括人的免疫以抵抗痘感染, 优选抵抗正痘感染。除了 MVA 之外, 所述疫苗可以含有一种或多种添加剂例如抗生素、防腐剂、或者稳定剂。该疫苗特别适用于兽医领域, 例如用于对动物免疫接种以抵抗正痘感染, 例如使猫免疫抵抗猫痘, 使小鼠免疫抵抗先天性缺肢畸形, 或者使骆驼免疫抵抗骆驼痘。该免疫接种优选在肠胃外进行。

加入上述的辅助剂通常能增强疫苗中抗原决定簇的免疫作用。辅助剂以非特异方式共同刺激免疫系统, 引起抗疫苗抗原决定簇的更强的特异性免疫

反应。根据本发明的另一个实施方案, MVA 被用作辅助剂, 来辅助刺激抵抗疫苗的抗原决定簇的免疫应答。在这种情况下, 优选的是 MVA 是灭活的。例如通过加热或者用化学品可以对 MVA 进行灭活。优选地, 通过 β -丙醇酸内酯对 MVA 灭活。根据本发明的该实施方案, 可以将灭活 MVA 加到抵抗各种传染病的疫苗中来提高抵抗这种疾病的免疫性。

在感染情况下, 肌体的免疫、神经、激素和血管系统一起密切地起作用。这些相互作用能通过非特异性免疫系统的元件例如细胞因子如干扰素和白细胞介素进行调节。痘病毒能够影响免疫系统的调节(Swiss Vet. 11/99, 13-17)。因此, 在本发明的另一个实施方案中, 对哺乳动物(包括人)使用 MVA、优选被灭活的 MVA 来调节非特异性(先天的)免疫系统的细胞和体液。优选的是, MVA 被用作生物调节剂, 其中免疫系统的功能障碍被消除并且身体本身的防御机理被激活、稳定和/或抑制。最优选的是, 在病毒感染, 例如疱疹、乙肝或丙肝感染的情况下, 在慢性炎症疾病和/或支持性肿瘤治疗的情况下, MVA 被用作生物调节剂。MVA 也可以在提高抗感染敏感性的情况下例如应激反应和新生儿情况下被用来稳定免疫系统。活性的和/或优选被灭活的 MVA 可以全身施用, 例如肌肉和/或局部如通过粘膜和/或皮肤施用。

总之, 本发明提供了 MVA 株, 其一般是用于与野生型 MVA 相同的用途, 但它消除了由野生型 MVA 在鸡胚胎成纤维细胞中扩增而引起的若干问题。

发明概述

本发明具体包括下面单一的或组合的特征:

一种修饰的安卡拉(Ankara)牛痘病毒(MVA), 适应在传代细胞系的细胞中生长, 所述细胞系被核准为产生治疗性物质的细胞系。

如上所述的 MVA, 适应在哺乳动物细胞系的细胞中生长。

如上所述的 MVA, 其中所述细胞系被核准为产生疫苗的细胞系。

如上所述的 MVA, 其中所述被核准的细胞系是非洲绿猴肾细胞系。

如上所述的 MVA, 其中所述被核准的细胞系是非洲绿猴肾细胞系 ATCC No. CCL-81。

如上所述的 MVA, 保藏在欧洲细胞培养物收集中心(the European Collection of Cell Cultures (ECACC)), Salisbury, UK, 保藏号是 No. 99101431

和/或其衍生物。

如上所述的 MVA，保藏在 ECACC, Salisbury, UK，临时登记号是 01021411 和/或其衍生物。

如上所述的 MVA，含有至少一种异源核酸序列。

如上所述的 MVA，含有一种异源核酸序列，其编码治疗性蛋白质和/或抗原决定簇例如免疫抵抗疟疾、肝炎和/或狂犬病感染的肽。

由上述 MVA 感染的宿主细胞。

一种组合物，优选药物组合物，含有上述 MVA 和/或 MVA 的 DNA。

如上所述的药物组合物，其中该药物组合物是疫苗。

对活动物体包括人进行免疫接种的上述疫苗。

为抵抗正痘感染而进行免疫接种的上述疫苗。

为使猫能抵抗猫痘，使小鼠能抵抗先天性缺肢畸形，和/或使骆驼能抵抗骆驼痘而进行免疫接种的上述疫苗。

上述药物组合物，其中 MVA 是非特异性免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂。

含有上述 MVA 和/或 MVA 的 DNA 作为辅助剂的药物组合物。

含有上述重组 MVA 和/或重组 MVA 的 DNA 的药物组合物。

在基因治疗中使用的上述药物组合物。

将同源和/或异源核酸序列导入靶细胞的方法，包括用上述 MVA 感染靶细胞。

获得如上所述 MVA 株的方法，包括 a) 用野生型 MVA，优选保藏在 ECACC，保藏号是 No. V 94012707 的 MVA 感染核准的细胞系的细胞，b) 收集病毒，c) 用新产生的病毒感染相同细胞系的新细胞，和任选包括，d) 重复 b) 和 c) 直到病毒适应在所述细胞系的细胞中生长。

制备上述 MVA 的病毒颗粒的方法，包括在合适的条件下培养核准的细胞系的细胞，用所述 MVA 感染所述细胞系，并且收集由所述细胞产生的病毒颗粒。

如上所述的方法，其中用在 ECACC 保藏的保藏号是 No. 99101431 的和/或在 ECACC 保藏的临时登记号是 01021411 的 MVA 或者这些毒株之一的衍生物感染所述细胞系。

制备核酸序列、肽、多肽和/或蛋白质的方法，包括用上述重组 MVA 感

染宿主细胞,在合适的条件下培养感染的宿主细胞,以及,任选包括分离和/或富集由所述宿主细胞产生的核酸序列、肽和/或蛋白质。

上述 MVA 在制备药物组合物中的用途,该药物组合物用于治疗或预防由所述 MVA 引起的疾病或障碍。

上述 MVA 在制备用于使活动物体包括人免疫的疫苗中的用途。

上述 MVA 在制备非特异性免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂中的用途。

如上所述的用途,用于制备辅助剂。

上述 MVA 作为疫苗的用途。

上述 MVA 作为辅助剂的用途。

上述 MVA 作为非特异性免疫系统的激活剂、抑制剂和/或稳定剂的用途。

使活动物体包括人免疫的方法,所述方法包括对需要免疫的人施用治疗有效量的上述药物组合物。

将同源和/或异源核酸序列导入靶细胞的方法,包括用上述 MVA 和/或 MVA 的 DNA 感染靶细胞。

激活、抑制和/或稳定活动物体包括人的免疫系统的方法,所述方法包括对活动物体包括人施用上述药物组合物。

增强抗疫苗中抗原决定簇的特异性免疫应答的方法,包括对活动物体包括人施用作为辅助剂的上述 MVA。

适应在传代细胞系的细胞中生长的修饰的安卡拉牛痘病毒可通过包括下面步骤的方法获得:感染被核准为产生治疗性物质的细胞系的细胞,收集由所述细胞系产生的病毒颗粒,并且任选地包括重复进行上述步骤,直到在所述细胞中获得该 MVA 所需的生长特征。

实施例

下面的实施例进一步详细说明本发明。本领域技术人员应当很理解,提供的实施例不在任何方面解释为将本发明技术的应用限制于这些实施例。

实施例 1:MVA 对 Vero 细胞的适应和所述 MVA 株的表征

1. MVA 对非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)的适应

Anton Mayr 开发的修饰的安卡拉牛痘病毒野生型 MVA 保藏在 ECACC, 保藏号是 No. V 94012707。该野生型 MVA 通过该病毒在 Vero 细胞中连续传代而适应在 Vero 细胞中生长(表 1)。在第 148 至 165 代中使用静态 Vero 细胞系(WHO 原种 ECACC No. 88020401)的细胞克隆 ATCC-No. CCL-81 (WHO 批量菌种, Master and Working Bank)。该细胞在由 Earle's MEM (ICN), pH 7.4, 和 5% 的血清替代品 BMS (Biochrom)组成的培养基中繁殖。根据本领域技术人员公知的技术, 通常是以 1:2 至 1:4 分裂细胞接种相同的工作库的细胞。培养基每毫升含有大约 250 000 个细胞。细胞分别在试管(2ml), Roux 皿(100ml), 和塑料皿(分别是 6 和 40 毫升)中繁殖。一般情况下, 16-24 小时之后, 细胞汇合形成单层。然后, 用没有任何添加剂的普通 Earle's MEM 置换培养基。

对于野生型 MVA 的适应作用使用试管培养系统进行试验。表 1 和 2 总结了传代的结果。用 10 MOI(感染的多重性)野生型 MVA 感染非洲绿猴肾细胞, 即平均来说, 每个非洲绿猴肾细胞有 10 个病毒颗粒。开始使用的野生型 MVA 是遗传学上同源的, 并在鸡胚胎成纤维细胞中传代 575 代之后的噬斑纯化的 MVA (效价: $10^{7.75}$ KID₅₀/ml)。24 小时之后, 汇合单层非洲绿猴肾细胞的 90% 被中毒方法破坏(50%被毒性破坏, 40%被溶胞破坏)。收集细胞冷冻和解冻之后的培养基加细胞碎屑, 含有产生的病毒, 并且在培养试管中的单层非洲绿猴肾细胞(第 2 代)上接种 0.2 毫升的该混合物。将该过程重复 200 次。第 3 代之后, 不再发现毒性作用, 而观察到 4-6 天后转染(p. inf.)期间细胞变圆和溶胞为特征的轻微细胞病变作用(CPE)。病毒效价是 $10^{1.0}$ KID₅₀/ml。总之, MVA 在非洲绿猴肾细胞中的增殖虽然开始了但是非常无效力。第 5 代之后, 发现典型的 CPE 在 4-5 天感染之后完成。病毒效价从第 3 代之后的 $10^{1.0}$ KID₅₀/ml 提高到第 5 代之后的 $10^{4.0}$ KID₅₀/ml。因此, 扩增的病毒在非洲绿猴肾细胞中更有效。在第 5 至 11 代, 观察到越来越早地完成 CPE, 并且每一代病毒效价都提高。在 No. 11 代, 在 $10^{7.5}$ KID₅₀/ml 达到平稳期。因此, 11 代之后实现 MVA 对非洲绿猴肾细胞的适应。在接下来的又 30 代中, 对所有传代的结果是相同的并且是能高度复制的: CPE 已经开始 24 小时 p. inf. 并且在 p. inf.三天之后影响所有的细胞。那时, 20% 的非洲绿猴肾细胞是完整的而 80%溶胞。p. inf.三天之后, 病毒效价总是大约 $10^{7.75}$ KID₅₀/ml。15 代之后, 总是在 p. inf.2-3 天之后收集病毒, 并且只用 1MOI 代替 10 MOI 感染细胞(表

2)。在接下来的其它几代中，MVA 的生长特征只是稍微改变。显然，最佳病毒效价进一步提高并且在 200 代达到 10^{10} KID₅₀/ml。

总之，病毒在非洲绿猴肾细胞中以指数方式可重复生长。所述生长特征出人意料地不同于野生型 MVA 的特征。因此，通过连续传代获得新 MVA 株。所述新株称为"Vero MVA"，在非洲绿猴肾细胞中传代 200 代之后称为"Vero-MVA-200"。

大量培养 Vero-MVA 和 Vero-MVA-200。对于贮存，离心浓缩 Vero-MVA，重新悬浮于 2.5 %的血浆代用品(polygeline)并且在 2 毫升的小瓶中冻干。冻干之后的效价仍然至少是 $10^{8.5}$ KID₅₀/ml。对冻干的 Vero-MVA 和 Vero-MVA-200 检测污染和毒性并且在 +4℃ 下贮存。

2. Vero-MVA 生物性能的特征

将 Vero-MVA (传代 100 代)和 VeroMVA-200 (传代 200 代)的生物特性与野生型 MVA 的特性相比较(表 3 和表 5)。因而使用的是本领域技术人员公知的技术。本发明人证明，除了非洲绿猴肾细胞之外，病毒的宿主范围没有改变，而且对于人或动物的毒性也没有增加。Vero-MVA 仍然被鉴定出在非容许的宿主细胞中繁殖失败。

与牛痘病毒的 Elstree 株病毒颗粒相比较，Vero-MVA 病毒颗粒的主要特性是通过抵抗 Elstree 株产生的抗体的交叉反应来证明的。Elstree 株是 WHO 推荐用于天花接种疫苗的牛痘株。将抵抗 Elstree 株产生的兔多克隆超免疫血清加到 Vero-MVA 中。 100 KID₅₀/ml 的 Vero MVA 被完全中和，血清稀释度是 1 : 512。需要血清的 2 倍稀释度来中和相同量的牛痘 Elstree 株(1 : 256)。因此，牛痘免疫血清仍能够有效中和 Vero-MVA。

如表 3, 4 和 5 所示，通过几种附加试验比较了 Vero-MVA、Vero-MVA-200 和野生型 MVA。本发明人证明 Vero-MVA 和 Vero-MVA-200 对于哺乳动物包括人的毒性与野生型 MVA 相比没有提高。还证明了 Vero-MVA 和 Vero-MVA-200 对于哺乳动物包括人没有触染性和毒性。出人意料的是，除了对非洲绿猴肾细胞之外，Vero-MVA 的细胞特异性与野生型 MVA 的特异性或多或少是相同的：Vero-MVA 扩增和野生型 MVA 一样，在人细胞系细胞(参见表 4：HL-, HEP-2-, 和 HeLa-细胞)中几乎是无效的。因此，尽管人细胞和非洲绿猴肾细胞在种系发生学上密切相关，但是 Vero-MVA 没有获得在人细胞中扩增的能力。在其它试验中，没有观察到显著差别。

此外,还比较了野生型 MVA 和 Vero-MVA-200 的物理、化学、和生物学特征(表 5)。与最初在安卡拉分离的痘病毒的基因组相比,在鸡胚胎成纤维细胞培养物中生长的野生型 MVA 在左侧反转末端区中有三处缺失,而 Vero-MVA-200 在左侧末端区中有四处缺失。因此,野生型 MVA 在非洲绿猴肾细胞中传代导致附加的缺失。

使用 Vero-MVA 使驯养动物免疫抵抗正痘感染。收集动物的血清并且进行中和试验。本发明人证明动物产生高效价抗体。该抗体效价至少在 111 天时间内是稳定的。还证明在噬斑减少试验中所述抗体能够体外中和 MVA 病毒颗粒。总之, Vero-MVA 可以被用作驯养动物和人抗正痘感染的疫苗。

表 1: MVA 对 Vero 细胞的适应

传代	细胞培养物	最高病毒效价 [log ₁₀ /ml]	结果	结论
1	24 小时之后的毒性作用	2.0	接种病毒的静止	盲传代区 带现象和 细胞因子 产生
3	没有毒性, 4-6 天之后中度 CPE	1.0	接种病毒的静止? 病毒繁殖开始	
5	4-5 天之后完成的典型 CPE	4.0	渐增的病毒繁殖	
11	3 天之后完成的 CPE	7.5	对数病毒繁殖	成功适应
12-42*	24 小时之后开始 CPE, 3 天之后完成 CPE	7.75	重复性病毒繁殖	Vero-MVA
43-100*	24 小时之后开始 CPE, 3 天之后完成 CPE	8.0	重复性病毒繁殖	
100-200*	24 小时之后开始 CPE, 3 天之后完成 CPE	10.0	重复性病毒繁殖	产生-200

* 传代 11 代之后只用 1 MOI 代替 10 MOI 接种

表 2: MVA 适应 Vero 细胞期间病毒效价的变化

传代序号	[p.inf.天数]之后收集	每毫升效价[log ₁₀ /ml]
1	1	<2.0
2	3	2.0
3	5	1.0
5	5	4.0
8	4	6.5
11	3	7.5
18	2	8.0
19	2	7.75
20	3	8.0
25	2	7.75
29	2	7.75
30	3	7.75
31	3	8.0
45	2	7.75
51	3	7.75
60	2	8.0
66	2	7.75
68	2	8.0
75	3	8.0
100	2	8.0
200	2	10.0

表 3:野生型 MVA 和 Vero-MVA 的生物学特征之比较

标志	野生型 MVA	Vero-MVA (传代 100 代)	Vero-MVA-200
单层细胞培养物中 CPE(接种 IMOI)	5 天之后细胞变圆并且溶胞 (90 % CPE)	5 天之后细胞变圆并且溶胞 (100 % CPE)	3-5 天之后细胞变圆并且溶胞 (100 % CPE)
最佳收集时的效价	$10^{8.0}$ KID ₅₀ /ml	$10^{7.75}$ KID ₅₀ /ml	$10^{10.0}$ KID ₅₀ /ml
在非容许细胞体系中病毒繁殖失败	是	是	是
对于人和动物降低毒性	是	是	是：根本没有毒性
感染性	无	无	无
绒毛尿囊膜上初生噬斑的特征	没有增殖节没有坏死	没有增殖节没有坏死	没有增殖节没有坏死
血细胞凝集 (鸡红细胞)	阴性	阴性	阴性
β -丙醇酸内酯引起的灭活	一级动力学 0.05 %	一级动力学 0.05 %	一级动力学 0.04-0.05 %
VSV-幼鼠攻击试验中的保护作用	有	有	有
对人和动物的毒性	无	无	无
细胞因子刺激	α 干扰素, IL-2 和 12, CSA	α 干扰素, IL-2 和 12, CSA	α 和 γ 干扰素, IL-1, 2 和 12, CSA
吞噬作用, 天然杀伤细胞, 和 T-淋 巴细胞的激活作用	有	有	有, 提高的

表 4：不同细胞培养体系中 KID_{50}/ml 的 Vero-MVA
和野生型 MVA 的繁殖速度 $[\log_{10}/ml]$

细胞培养体系	Vero-MVA (31. Vero-传代)	野生型 MVA(原代鸡胚胎 成纤维细胞 575.传代)
¹⁾ Vero(非洲绿猴肾细胞)	8.0	4.5
原代鸡胚胎成纤维细胞	4.5	8.5
^{1,2)} HL(人肺)	3.0	2.5
^{1,2)} HEP-2 (人表皮样瘤)	3.0	2.5
^{1,2)} HeLA (人子宫颈癌)	2.75	2.75
^{1,2)} BHK(仓鼠肾细胞)	5.75	5.25
^{1,2)} MDBK(牛肾细胞)	3.5	3.5
^{1,2)} PK-15(猪肾细胞)	3.25	3.5

1) 括号中标明从组织和物种衍生的传代细胞系。

2) 从德国慕尼黑医学微生物研究中心(collection of the institute of medical microbiology in Munich, Germany)获得的细胞系。

表 5:野生型 MVA(鸡胚胎成纤维细胞(CEF)572 传代)
与 Vero-MVA-200 (非洲绿猴肾细胞中 200 传代)之比较

标志	野生型 MVA	Vero-MVA-200
遗传标记 (与安卡拉分离的痘病病毒比较)	左侧末端区有三处缺失(反向末端复制) 基因组大小从 208 减小到 178kb 原基因组分子量损失 15 % 失去干扰素受体	左侧末端区有四处缺失 基因组大小进一步减小到 172kb 原基因组分子量损失 20 % 另外失去例如 IL-1 β
细胞标记	T-辅助细胞的激活作用(CD4, CD8, CD25) NK 细胞的激活作用 在哺乳细胞(除 BHK 细胞之外)繁殖失败	细胞毒性 T-淋巴细胞增强的激活作用 NK 细胞增强的激活作用 进一步缩窄细胞培养体系宿主范围
细胞因子	α 干扰素, IL-2, IL-12	α 和 γ 干扰素, IL-1, 2, 12
病毒效价	CEF: $10^{9.5}$ KID ₅₀ /ml Vero 细胞: $10^{4.0}$ KID ₅₀ /ml	CEF: $10^{4.5}$ KID ₅₀ /ml Vero 细胞: $10^{9.5}$ KID ₅₀ /ml
免疫系统	特异性免疫系统活性降低	非特异性免疫系统活性增强
对人和动物的毒性	低	没有