

Настоящее изобретение относится к процессу репродукции поксвируса, в частности, хордопоксвируса, где поксвирус культивируют при температуре ниже 37°C. Данный процесс способствует повышенному размножению вируса при пониженной температуре.

### Предпосылки изобретения

Roxviridae включает в себя большое семейство сложных ДНК-содержащих вирусов, которые реплицируются в цитоплазме клеток позвоночных и беспозвоночных. Семейство roxviridae может быть поделено на подсемейство chordoroxvirinae (поксвирусы позвоночных) и entomoroxvirinae (поксвирусы насекомых) (Fields Virology/eds.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.; 3<sup>rd</sup> ed/ISBN 0-7817-0253-4/ см. в частности раздел 83).

Chordoroxvirinae включает множество поксвирусов животных (классифицированные в различные роды), такие как вирусы оспы верблюдов, вирусы оспы овец, вирусы оспы коз или авипоксвирусы, в частности поксвирусы птиц, а также таковые, относящиеся к человеческим, такие как вирус оспы и вирус вакцины.

Поксвирусы, в частности, chordoroxvirinae, являются важными патогенами человека и животных. Также имеет место длительная история вакцинации против поксвирусных инфекций. Около двух столетий назад, людей с целью профилактики прививали вирусом коровьей оспы для иммунизации их против оспы. Позднее иммунизацию проводили с помощью вируса вакцины. Однако вакцинация против оспы с помощью вируса вакцины иногда приводила к серьезным осложнениям, таким как поствакцинальный энцефалит, генерализованная вакцинация или контактная инфекция. Затем, Anton Mayr разработал новую вакцину, которая не вызывала таких осложнений. Поксвакцина состояла из поксвируса модифицированного вируса вакцины Ankara (MVA), и ее применяли для вакцинации против оспы в приблизительно 150000 случаях вакцинирования без развития осложнений, связанных с вакцинацией. Даже у детей с иммунодефицитом не развивались серьезные побочные эффекты. MVA получали путем мутации и селекции исходного вируса вакцины Ankara после 575 пассажей в культуре фибробластов куриных эмбрионов. Безопасность данного MVA отражена в его биологических, химических и физических характеристиках. MVA имеет сниженную молекулярную массу, шесть делеций в геноме и является специально аттенуированным для клеток млекопитающих, то есть, ДНК и белок синтезируются, а вирусные частицы фактически не образуются.

Вакцинация против оспы была очень успешной. В 1979 г. Всемирная Организация Здравоохранения объявила об искоренении оспы. Соответственно, массовая вакцинация детей была прекращена, и сохранена только вакцинация работников лабораторий и военнослужащих некоторых стран.

С искоренением оспы преобладающая причина поксвирусной инфекции у людей была устранена. Однако у некоторых нечеловеческих поксвирусов специфичность к хозяину снизилась, т.е. они вызывают инфекции не только у их типичного хозяина (например, для коровьей оспы - у коровы), но также и у других животных (например, крыс и кошек). Таким же путем могут быть заражены люди. С тех пор, как часть популяции больше не имеет иммунитета против оспы, инфекции видами поксвирусов животных могут оказаться опасными для них. Домашние животные являются главным источником инфекции для людей. Соответственно, вакцинация домашних животных против поксвирусов является делом значительной важности. Кроме того, поксвирусы являются важными векторами для экспрессии чужеродных генов, например, для применения в качестве вакцины или для генной терапии, т.е. для переноса последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-мишень, где они экспрессируются. Следовательно, требуется рациональный и экономически эффективный способ получения поксвирусов.

Поксвирусы можно амплифицировать в клетках различных типов. Например, chordoroxvirinae, в частности MVA амплифицируются в культурах клеток первичных или вторичных фибробластов куриных эмбрионов (CEF). Клетки получали из эмбрионов куриных яиц, которые инкубируют в течение 10-12 дней.

Затем клетки эмбрионов разделяли и очищали. Данные первичные клетки CEF применяли непосредственно или после одного дополнительного пассажа клеток, как вторичные клетки CEF. Впоследствии первичные или вторичные клетки CEF инфицировали MVA. Для амплификации MVA инфицированные клетки инкубировали в течение 2-3 дней при 37°C (см., например, Meyer, H. et al. 1991; J. of General Virology 72, 1031-1038; Sutter et al. 1994, Vaccine, Vol. 12, No. 11, 1032-1040). Хотя другие хордопоксвирусы амплифицируют в различных типах клеток, в этих случаях выбирают температуру 37°C. Например, вирус вакцины, доступный из ATCC (№ VR1354), который культивировали в клетках HeLa S3 (клетки карциномы шейки матки человека), также инкубировали в течение 3 дней при 37°C (Current protocols in molecular biology 1998, Chapter 16, Unit 16.16, John Wiley & Sons, Inc). Более того, MVA адаптированный для роста в клетках Vero (клетки почек обезьян), также амплифицировали при 37°C (PCT/EP01/02703). Следовательно, независимо от клеток, применяемых для амплификации и независимо от видов или штаммов хордопоксвируса, амплификацию вирусов проводят при 37°C. Данный выбор температуры хорошо согласуется с общими знаниями специалиста: поксвирусы, амплифицируемые в лабораториях, почти исключительно получают от теплокровных животных с температурой тела приблизительно 37°C. Так как хордопоксвирусы адаптированы для развития у указанных животных, они адаптированы для роста при 37°C, т.е. они наиболее эффективно амплифицируются при 37°C.

Вследствие этих же причин энтомопоксвирусы культивируют при температуре ниже 37°C: Температура тела насекомых существенно ниже, чем 37°C и зависит от большого диапазона температуры окружающей среды. Следовательно, в отличие от хордопоксвирусов, энтомопоксвирусы адаптированы для роста при более низких температурах. Патенты США 5721352 и 5174993 описывают оптимальную температуру для роста видов энтомопоксвируса *Amsacta moorei* Entomopoxvirus (AmaEPV) - 28°C в лаборатории. Однако данные патенты не описывают культивирование хордопоксвирусов при данных температурных условиях.

Более того, получение вакцин против других вирусных инфекций обычно проводят при 37°C. Только некоторые вакцины против кори получают при более низкой температуре. В таком случае, вакцина против кори, которую исходно получали при 37°C, и которая часто вызывала тяжелые побочные эффекты, ослабляли путем непрерывных пассажей вируса при 32°C. После 85 пассажей штамма при 32°C, штамм ослаблялся, т.е. способность вируса вызывать заболевание значительно снижалась (Plotkin, Orenstein: *Vaccines*, 3<sup>rd</sup> edition, 230-232). В заключение, ожидают, что вирусы теплокровных животных и особенно вирус вакцины, более эффективно амплифицируются при 37°C, так как они обнаружены у животных с указанной температурой тела и адаптация к более низкой температуре достигается только после множественных пассажей при указанной более низкой температуре. Более того, адаптация к более низкой температуре ассоциирована с ослаблением и, вследствие этого, со снижением репродуктивной способности вируса.

В патенте США 5616487 описан способ получения стабилизированного вируса, в частности, стабилизированного ретровируса, путем культивирования клеток, продуцирующих вирус, со стабилизирующим агентом при температуре ниже 37°C. Стабилизирующими агентами являются липиды или поверхностно-активные вещества. Патент, в частности, описывает Pluronic F-68 и Lipid Concentrate в качестве стабилизирующих агентов. Считается, что Lipid Concentrate содержит холестерин, жир печени трески, Pluronic F-68, ацетат d-альфа-токоферола и Tween 80. В альтернативном варианте реализации изобретения патент США 5616487 описывает процесс культивирования специфических клеток, продуцирующих ретровирус, при температуре ниже, чем 37°C, где продуцируемый ретровирус стабилизируют с помощью применения стабилизатора, как указано выше.

#### **Объект изобретения**

Объектом настоящего изобретения являлось обеспечение способа получения поксвирусов, в частности, хордопоксвирусов, который ведет к более высокому образованию вирусных частиц в зараженной клетке.

#### **Подробное описание изобретения**

Указанный результат достигали путем получения поксвируса, в частности хордопоксвируса, при котором клетки, продуцирующие вирус, культивировали при температуре ниже 37°C.

Неожиданно было обнаружено, что способ по изобретению ведет к значительно более эффективной амплификации вируса при более низкой температуре (ниже 37°C), что в свою очередь ведет к более высокому количеству полученного вируса по отношению к числу инфицированных клеток. Следовательно, требуется меньшее количество клеток для получения такого же количества вируса. Это особенно выгодно для модифицированного вируса вакцины Ankara (MVA), так как получение клеток CEF, требующихся для амплификации MVA, является трудоемким и дорогим процессом. Более того, уменьшение температуры инкубации позволяет экономить энергию во время процесса амплификации поксвируса и вследствие этого уменьшать затраты на получение вирусов.

Термин «поксвирус», применяемый в настоящей заявке, относится предпочтительно к поксвирусам подсемейства *chordopoxvirinae* (поксвирусы позвоночных) (Fields Virology/eds.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.; 3<sup>rd</sup> ed/ISBN 0-7817-0253-4/ см. в частности раздел 83). Термины «хордопоксвирусы», «*chordopoxvirinae*» и «поксвирусы позвоночных» применяются в настоящей заявке, заменяя друг друга. Предпочтительными хордопоксвирусами являются вирусы родов *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Lepripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* и *Yatapoxvirus*. Наиболее предпочтительными являются поксвирусы родов *Orthopoxvirus* и *Avipoxvirus*.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения поксвирусом, получаемым при помощи способа по настоящему изобретению, является поксвирус, в частности хордопоксвирус, который является полезным для применения в качестве вакцины или который может быть использован в качестве вектора для генной терапии с целью введения интересующих генов в клетках организма-хозяина. Подходящие штаммы вируса хорошо известны опытному специалисту. Подходящие штаммы могут быть получены, например, из Американской Коллекции Образцов Культур (ATCC) или Европейской Коллекции Культур Клеток Животных (ECACC).

Как отмечено выше, особенно предпочтительными поксвирусами для получения в соответствии с настоящим способом являются авипоксвирусы и ортопоксвирусы. Примерами ортопоксвирусов являются вирусы вакцины, такие как штаммы вируса вакцины Elstree, Western Reserve, Wyeth, NYVAC, NYCBON, Paris, Copenhagen, более предпочтительно, различные штаммы вируса MVA и наиболее предпочтительно MVA-BN, хранящийся в ECACC под № V00083008, или его производные. MVA-BN и его

производные были детально описаны в РСТ заявке РСТ/EP01/13628, озаглавленной «Модифицированный вариант вируса вакцины Анкага».

«Производным» хранящегося вируса является вирус, который проявляет по сути такие же характеристики роста, в частности, такую же температурную зависимость, как и хранящийся штамм, но может отличаться, как минимум, одним участком генома.

Способ по настоящему изобретению можно осуществить с вирусами дикого типа, аттенуированными вирусами и рекомбинантными вирусами, соответственно.

«Аттенуированным вирусом» является вирус, происходящий от патогенного вируса, но инфицирование им организма-хозяина ведет к более низкой смертности и/или заболеваемости по сравнению с неаттенуированным родительским вирусом. Примеры аттенуированных поксвирусов известны специалистам в области техники. Примером аттенуированного вируса вакцины является штамм MVA, в частности штамм, который хранится в ЕСАСС с номером хранения V00083008 (см. выше).

Термин «рекомбинантный вирус» относится к любому вирусу, имеющему в геноме вируса вставку гетерологичного гена, который не является естественной частью вирусного генома. Гетерологичный ген может быть терапевтическим геном, геном, кодирующим пептид, включающим, как минимум, один эпитоп для индукции иммунного ответа, антисмысловой последовательностью экспрессии или геном рибозима. Способы получения рекомбинантных вирусов известны опытным специалистам в данной области техники.

Наиболее предпочтительным поксвирусным вектором является MVA, в особенности MVA 575 и MVA-BN (см. выше).

В отличие от всех предыдущих мнений в уровне техники авторы настоящего изобретения обнаружили, что при шести температурах между 26 и 37°C поксвирусы, в частности хордопоксвирусы, амплифицируются, по меньшей мере, так же, как при температуре инкубации (культивирования) 37°C.

Неожиданно было обнаружено, что способ амплификации поксвируса, в частности хордопоксвируса, приводит к более высокому образованию вируса, если клетки, продуцирующие вирусы, культивируют при температуре ниже 37°C, предпочтительно между 36,5 и 26°C или между около 26 и около 36°C, более предпочтительно между 28 и 33°C, еще более предпочтительно между 28 и 32°C, наиболее предпочтительно при 30°C.

Другой предпочтительный диапазон температур составляет от 30 до 36,5°C. В частности, хорошие результаты были получены в поддиапазонах 30 до 35°C, 30 до 33°C и 30 до 32°C. Наиболее предпочтительной температурой является 30°C.

Термин «около», в связи с величинами температуры, относится предпочтительно к специально обозначенным температурам и к температурам на 0,5°C выше или ниже, чем специально обозначенные температуры. В качестве примера, температура «около 30°C» может быть интерпретирована как температура в диапазоне от 29,5 до 30,5°C.

В общих словах, в способе по настоящему изобретению соответствующий поксвирус получают путем культивирования инфицированных клеток при температуре ниже температуры тела животного, включая человека, который является хозяином соответствующего поксвируса. Что касается вируса вакцины, в качестве его естественных хозяев рассматриваются буйволы (Baxby, D.: Jenner's smallpox vaccine: the riddle of vaccinia virus and its origin. London: Heinemann Educational; 1981:1-214).

Культивирование клеток, продуцирующих вирусы, предпочтительно проводят в течение как минимум 24 ч, более предпочтительно в течение как минимум 2 дней или как минимум 3 дней. Обычно, свободные от вирусов клетки выращивают при 37°C до получения достаточного количества клеток. Затем культуру клеток инфицируют вирусом и затем температуру снижают до вышеуказанной температуры. В альтернативном варианте осуществления изобретения культуру клеток доводят до вышеуказанной температуры до инфицирования вирусом.

Среда, применяемая для культивирования клеток до инфицирования и для продукции вируса с применением способа по настоящему изобретению, может быть одной и той же или различной. Все среды являются традиционными стандартными средами, известными специалисту в данной области техники. При необходимости является возможным добавление дополнительных веществ, таких как антибиотики, дополнительные аминокислоты и/или фетальная сыворотка.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения среда, применяемая в способе по настоящему изобретению, не содержит липидов или поверхностно-активных веществ для стабилизации липидной оболочки вируса. Более предпочтительно, среда, применяемая в способе по настоящему изобретению, не содержит любого из следующих стабилизирующих агентов: Pluronic F-68, комбинация Pluronic F-68 и Tween 80<sup>TM</sup> или Lipid Concentrate (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, номер по каталогу: 21900-014) который содержит холестерин, жир печени трески, Pluronic F-68, ацетат d-альфа-токоферола и Tween 80.

Для хордопоксвирусов в способе по настоящему изобретению могут быть использованы клетки, известные специалисту в данной области техники. Тип и происхождение клеток не являются критическими, до тех пор, пока клетки могут быть инфицированы соответствующим вирусом и пока потомство ви-

руса может быть продуцировано инфицированной клеткой. Предпочтительно множественность инфицирования должна быть меньше чем 1.

Особенно предпочтительными клетками являются клетки позвоночных, например, клетки млекопитающих или птиц.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения клетками позвоночных, которые могут применяться в способе по настоящему изобретению для вирусов вакцины, в частности, для штаммов вируса вакцины Elstree и MVA, являются фибробласты куриных эмбрионов (CEF). Было особенно неожиданно, что способ по настоящему изобретению можно применять с использованием клеток CEF, так как у курицы средняя нормальная температура тела составляет 41°C. Следовательно, температуры, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, ниже 37°C, предпочтительно между 36,5 и 26°C, более предпочтительно между 28 и 33°C, еще более предпочтительно между 28 и 32°C, наиболее предпочтительно 30°C, сильно отличаются от нормальной температуры тела курицы, вследствие чего можно предположить, что данные клетки не могут быть использованы для размножения вирусов вакцины при данных температурах. Такие же соображения относятся к диапазону температур от 30 до 36,5°C, 30 до 33°C, 30 до 32°C и в особенности к температуре 30°C.

Более того, способ по настоящему изобретению предпочтительно проводят в стационарных (неподвижных) колбах.

Другим преимуществом является тот факт, что данный способ способствует повышенному образованию «нормальных» вирусных штаммов, которые не нуждаются в температурно-чувствительных мутациях или длительной и сложной аттенуации для пониженной температуры. Другими словами, он не нуждается в применении температурно-аттенуированных или температурно-чувствительных мутантов с целью достижения более высокого образования вирусных частиц при более низкой температуре по сравнению с 37°C.

По отношению к температурно-аттенуированным вирусам и температурно-чувствительным мутантам, известно, что они амплифицируются лучше при более низкой температуре; однако такие штаммы в норме являются менее репродуктивными, чем неаттенуированные или температурно-нечувствительные мутанты. Следовательно, большим преимуществом способа по настоящему изобретению является тот факт, что его можно применять для любого нормального, высоко репродуктивного вирусного штамма.

Вирус, полученный согласно настоящему изобретению, предпочтительно применяют в качестве вакцины или для получения композиции, применяемой в протоколах генной терапии. Такое применение поксвирусов хорошо известно в области техники.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлены конкретные значения из эксперимента 1 в двух повторностях (представлено как точки). Столбцы отражают средние значения. Для сравнения одиночных значений представлена табл. 1.

На фиг. 2 представлены конкретные значения из эксперимента 2 в двух повторностях (представлено как точки). Столбцы отражают средние значения. Для сравнения одиночных значений представлена табл. 2.

На фиг. 3 представлены конкретные значения из экспериментов при четырех различных температурах (эксперимент 3), полученные в двух повторностях. Столбцы отражают средние значения. Для сравнения одиночных значений представлена табл. 3.

На фиг. 4 представлены конкретные значения из экспериментов при четырех различных температурах (эксперимент 4), полученные в двух повторностях. Столбцы отражают средние значения. Для сравнения одиночных значений представлена табл. 4.

На фиг. 5 столбцы отражают средние значения экспериментов, полученные в трех повторностях при 30 и 37°C. Для сравнения одиночных значений представлена табл. 5.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к следующим вариантам осуществления изобретения:

способ амплификации поксвируса, в частности хордопоксвируса, отличающийся тем, что вирус размножают при температуре ниже 37°C;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что вирус размножают при температуре от около 26 до около 36°C;

способ, отличающийся тем, что вирус размножается в фибробластах куриных эмбрионов при температуре от 26 до 36°C;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что вирус размножают при температуре культивирования около 30°C;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что размножение вируса происходит в течение, как минимум, 24 ч;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что размножение вируса происходит в течение, как минимум, 2-3 дней;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что поксвирус выбран из группы, включающей ави-поксвирус и ортопоксвирус;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что вирус является вирусом вакцины;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что вирус является модифицированным вирусом вакцины Анкага (MVA), предпочтительно MVA-BN, хранящимся в ЕСАСС под № V00083008 или его производным;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что его проводят в стационарной колбе;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что поксвирус не является температурно-чувствительным мутантным вирусом;

вышеуказанный способ, отличающийся тем, что поксвирус не является температурно-аттенуированным вирусом.

### Примеры

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Пример 1. Влияние температуры на размножение MVA.

#### Условия для культуры клеток

Первичные CEF-клетки сеяли в стационарные колбы с плотностью посева клеток  $2 \times 10^7$  CEF-клеток/185 см<sup>2</sup>. Клетки сеяли в VP-SFM +4 ммоль L-глутамина и 1% антибиотиков/противогрибковые средства. На четвертый день после посева была получена плотность клеток  $5 \times 10^7$  CEF-клеток/185 см<sup>2</sup>. Клетки инфицировали из расчета 0,1 TCID<sub>50</sub>/клетку MVA-BN (хранящийся в ЕСАСС под номером хранения V 00083008) с применением RPMI без FCS. Инфицированные клетки после инкубации в течение 72 ч помещали при 30 и 37°C (в экспериментах 1 и 2 с двумя различными препаратами CEF), при 30, 33, 35 и 37°C (эксперимент 3) и 26, 28, 30 и 33°C (эксперимент 4). Эксперимент проводили в двух повторностях для каждой температуры. Репликацию вируса останавливали путем соскабливания клеток в среду и совместного замораживания среды и клеток при -20°C. Данную смесь замораживали/оттаивали еще два раза для механического высвобождения вируса из клеток. Для экспериментов с 4 различными температурами инфицирования репликацию вируса останавливали путем замораживания стационарных колб при -20°C. Данную смесь замораживали/оттаивали еще три раза для механического высвобождения вируса из клеток.

Титры вируса из каждой стационарной колбы определяли путем применения иммуногистохимического анализа. Инфицированные клетки помечали специфическими антителами к вирусу вакцины. Во-вторых, добавляли HRP-меченные антитела к вирусам вакцины. После добавления субстрата инфицированные клетки становились голубого или коричневого цвета. Оценку результатов анализа проводили с использованием формулы Spearman and Kaerber, определяя TCID<sub>50</sub>/мл (инфицирующая доза для культуры ткани). Эксперименты проводили в двух повторностях. Для нормирования результатов титрования, применяли стандарт MVA-BN с известным титром в качестве внутреннего контроля для каждого титрационного эксперимента. Результаты экспериментов принимали во внимание, только когда величина стандарта MVA-BN не отличалась более чем  $\pm 0,5$  log от общего среднего.

### Результаты

Для учета возможных различий в росте первичных клеток CEF, эксперименты проводили в двух различных препаратах клеток, при сравнении температуры инфицирования 30°C и 37°C. Результаты двух независимых экспериментов по инфицированию показаны в табл. 1-2 и на фиг. 1-2.

Результаты экспериментов 1 и 2 показывают очевидное увеличение выхода вируса при 30°C по сравнению с 37°C. В эксперименте 1 было достигнуто увеличение на 0,5 log и в эксперименте 2 на около 0,7 log.

Таблица 1. В таблице 1 показаны результаты эксперимента 1.

	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 30°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 37°C
Колба а	7,50E + 07	3,20E + 07
Колба б	1,30E + 08	3,20E + 07
Среднее значение	1,00E + 08	3,20E + 07

Таблица 2. В таблице 2 показаны результаты эксперимента 2.

	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 30°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 37°C
Колба а	1,30E + 08	3,20E + 07
Колба б	1,30E + 08	2,40E + 07
Среднее значение	1,30E + 08	2,70E + 07

Данные двух первых экспериментов являются многообещающими в отношении того, что увеличение образования MVA может быть достигнуто путем снижения температуры инкубации после инфицирования. Следовательно, было решено продолжить, а также протестировать другие температуры для об-

наружения оптимальной температуры инфицирования. Применяемыми температурами были 30, 33, 35 и 37°C. Результаты этих экспериментов показаны в табл. 3 и на фиг. 3.

Сравнение выхода вируса при 37°C и при более низких температурах инфицирования (35, 33, 30°C) показало явное увеличение при более низких температурах. Лучший титр вируса [TCID<sub>50</sub>/мл] был получен в данном эксперименте с температурой инфицирования 30°C, который был на 0,8 log выше по сравнению с 37°C.

Таблица 3. В таблице 3 показаны титры вируса [TCID<sub>50</sub>/мл], полученные при 30, 33, 35 и 37°C.

	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 30°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 33°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 35°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 37°C
Колба а	1,30E + 08	5,60E + 07	3,20E + 07	3,20E + 07
Колба б	1,30E + 08	1,00E + 08	7,50E + 07	1,30E + 07
Среднее значение	1,30E + 08	7,50E + 07	4,90E + 07	2,10E + 07

В следующем эксперименте в стационарных колбах тестировали даже более низкие температуры, чем 30°C, для оценки, действительно ли 30°C является оптимальной температурой для размножения MVA в CEF-клетках. Поэтому применяли температуры 26, 28, 30 и 33°C. Результаты данного эксперимента показаны в табл. 4 и на фиг. 4.

Таблица 4. В таблице 4 показаны титры вируса [TCID<sub>50</sub>/мл], полученные при 26, 28, 30 и 33°C.

	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 26°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 28°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 30°C	Титр вируса [TCID <sub>50</sub> /мл] при 33°C
Колба а	3,20E + 07	1,00E + 08	4,20E + 08	1,80E + 08
Колба б	1,00E + 08	1,80E + 08	2,40E + 08	1,00E + 08
Среднее значение	5,60E + 07	1,30E + 08	3,20E + 08	1,30E + 08

Наибольший выход вируса в данном эксперименте был обнаружен при температуре инкубации после инфицирования при 30°C. При сравнении данных предыдущих экспериментов (4 температуры между 30 и 37°C) и данного, было выявлено, что 30°C является оптимальной температурой для инкубации после инфицирования для размножения MVA в CEF-клетках в стационарных колбах.

После анализа вирусных титров при определенных температурах в двух данных экспериментах становится очевидным, что инкубация при 37°C может давать самый низкий выход вируса среди 6 применяемых температур. Наблюдаемый порядок для образования вируса при применяемых температурах был следующий:

30°C > 33°C / 28°C > 35°C / 26°C > 37°C.

Пример 2. Влияние температуры на размножение вируса вакцины штамма Elstree

В другом подходе тестировали вирус вакцины штамма Elstree в добавлении к MVA-BN на зависимость от температуры. MVA-BN и Elstree размножались в CEF-клетках. Для эксперимента первичные CEF-клетки сеяли в стационарные колбы с плотностью посева 2E+07 CEF-клеток/175 см<sup>2</sup>. Клетки сеяли в культуральную среду +4 ммоль L-глутамин и 1% антибиотиков/противогрибковых средств. На четвертый день после посева была получена плотность клеток 5E+07 CEF-клеток/175 см<sup>2</sup>. Клетки инфицировали из расчета 0,1 TCID<sub>50</sub>/клетка MVA-BN с использованием RPMI без FCS и Elstree, соответственно. Инфицированные клетки после инкубации в течение 72 ч помещали при 30 и 37°C. Эксперимент проводили в тройной повторности для каждой температуры. Репликацию вируса останавливали путем замораживания стационарных колб при -20°C. Данную смесь замораживали/оттаивали еще три раза для механического высвобождения вируса из клеток.

Титры вируса в каждой стационарной колбе определяли путем титрования в соответствии с SOP/MVA/04. Для нормирования результатов титрования применяли стандарт MVA F6 с известным титром в качестве внутреннего контроля для каждого эксперимента титрования. Результаты экспериментов принимали во внимание только тогда, когда значения стандарта MVA F6 не отличались более чем ±0,5 log.

Результаты экспериментов по инфицированию показаны в табл. 5 и на фиг. 5.

Данные эксперимента с MVA-BN показали явное увеличение образования вируса при 30°C по сравнению с 37°C (0,667 log). В экспериментах с Elstree было обнаружено увеличение на 1,125 log при 30°C по сравнению с 37°C.

Таблица 5. В таблице 5 показаны титры вирусов [ $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/мл], полученные при 30 и 37°C для MVA-BN вируса вакцины штамма Elstree.

	MVA 30°C	MVA 37°C	Elstree 30°C CEF- клетки	Elstree 37°C CEF- клетки
Колба а	9,0	7,88	7,25	6,375
Колба b	8,0	8,0	8	6,5
Колба с	8,25	7,38	7,5	6,5
Среднее значение	8,42	7,75	7,583	6,458

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ амплификации хордопоксвируса, отличающийся тем, что вирус размножают в культуральной среде при температуре ниже 37°C, причем хордопоксвирус выбран из авипоксвируса и модифицированного вируса вакцины Ankara (MVA), предпочтительно MVA-BN, ECACC № V00083008 или его производных.

2. Способ по п.1, согласно которому поксвирус размножают в клетках птиц.

3. Способ по п.2, согласно которому клетки птицы представляют собой фибробласты куриных эмбрионов.

4. Способ по любому из пп.1-3, согласно которому хордопоксвирус размножают при температуре от около 26 до около 36°C.

5. Способ размножения хордопоксвируса, отличающийся тем, что вирус размножают в фибробластах куриных эмбрионов при температуре от 26 до 32°C.

6. Способ по п.5, согласно которому хордопоксвирус выбран из группы, включающей авипоксвирус и ортопоксвирус.

7. Способ по п.6, согласно которому ортопоксвирус представляет собой вирус вакцины.

8. Способ по п.6, согласно которому вирус вакцины выбран из штамма Elstree и модифицированного вируса вакцины Ankara (MVA), предпочтительно MVA-BN, ECACC № V00083008 или его производных.

9. Способ по любому из пп.1-8, согласно которому хордопоксвирус размножают при температуре около 30°C.

10. Способ по любому из пп.1-9, согласно которому размножение вируса осуществляют в течение по меньшей мере 24 ч.

11. Способ по любому из пп.1-10, согласно которому размножение вируса осуществляют в течение по меньшей мере 2-3 дней.

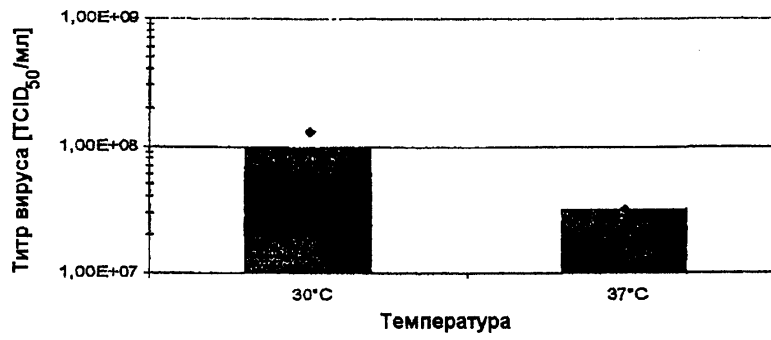
12. Способ по любому из пп.1-11, согласно которому хордопоксвирус может использоваться в качестве вакцины или вектора для генной терапии.

13. Способ по любому из пп.1-12, согласно которому размножение вируса осуществляют в стационарной колбе.

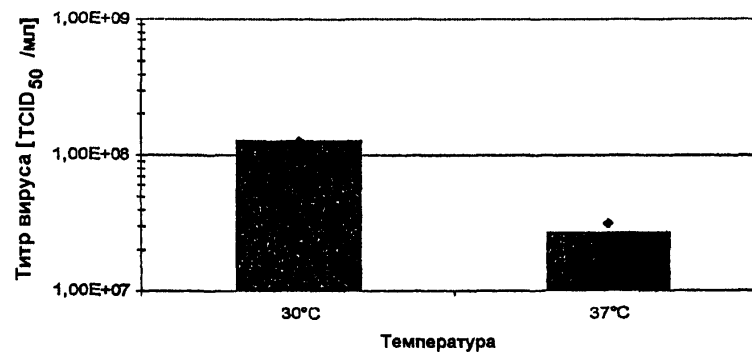
14. Способ по любому из пп.1-13, согласно которому поксвирус не является температурно-чувствительным мутантным вирусом.

15. Способ по любому из пп.1-14, согласно которому поксвирус не является температурно-аттенуированным вирусом.

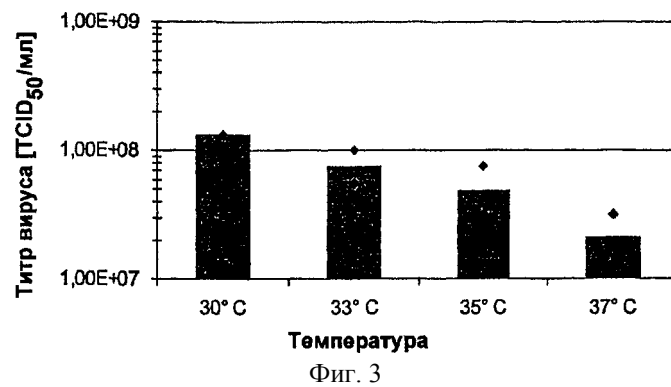
16. Способ по любому из пп.1-15, согласно которому в культуральную среду не добавляют липиды или поверхностно-активные вещества.



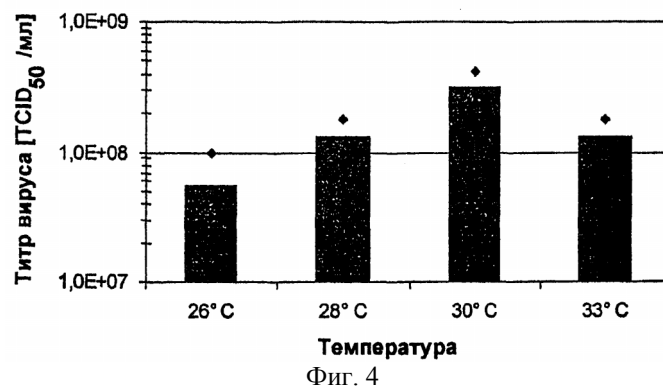
Фиг. 1



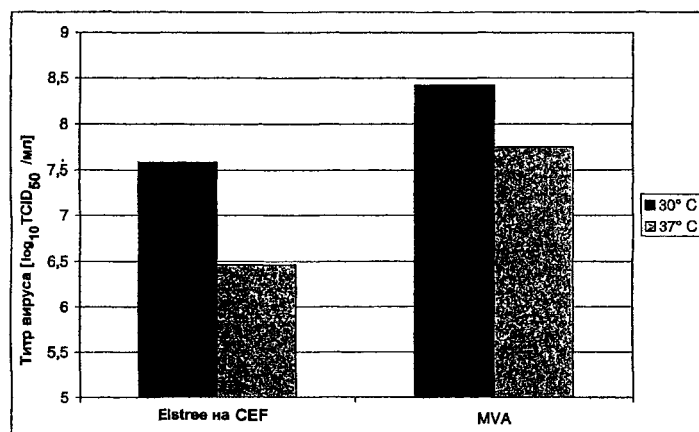
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

