

KORRIGERT FORSIDE / CORRECTED FRONT COVER



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319250

A 61 K 35/76, 39/39, C 12 P 21/00
C 12 N 7/00

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19963462	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.01.17 PCT/EP95/00160
(22)	Inng.dag	1996.08.20	(85)	Videreføringsdag	1996.08.20
(24)	Løpedag	1995.01.17	(30)	Prioritet	1994.02.23, DE, 4405841
(41)	Alm.tilgj	1996.08.20			
(45)	Meddelt	2005.07.04			

(73)	Innehaver	Anton Mayr, Weilheimer Strasse 1, D-82319 Starnberg, DE
(72)	Oppfinner	Anton Mayr, Weilheimer Strasse 1, D-82319 Starnberg, DE
(74)	Fullmektig	Ellen Holm - Bryns Zacco AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO

(54)	Benevnelse	Paramunitetinducer basert på poxviruskomponenter, fremgangsmåte for fremstilling derav og anvendelse som farmasøytiske sammensetninger.
(56)	Anførte publikasjoner	A. Mayr et al., Zbl. Vet. Med. B, vol. 28, 1981, s. 535-552 A. Mayr et al., Zbl. Vet. Med. B, vol. 33, 1986, s. 321-339
(57)	Sammendrag	

Multipotent paramunitetsinducere som er basert på kombinasjoner av poxvirus komponenter avledet fra forskjellige poxviruser med paramuniserte egenskaper og som er blitt forbedret med hensyn på potens og deres paramuniserings-relaterte aktiviteter sammenlignet med kjente paramunitetsinducere samt fremgangsmåter for fremstilling av disse multipotente paramunitetsinducere og anvendelse som medikamenter, er beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører multipotente paramunitetsinducere basert på kombinasjoner av poxviruskomponenter, en fremgangsmåte for fremstilling derav og anvendelse som medikamenter.

5 Immunsystemet til varmblodige dyr, spesielt pattedyr og fugler, består av en antigen-spesifikk del og en antigen-uspesifikk del. De to delene er kryssbundne og danner et eget organisk system. Antigen-spesifikke mekanismer er ansvarlige for å bygge opp en immunitet, mens antigen-uspesifikke mekanismer er ansvarlige for å bygge opp paramuniteten. Av både historiske og funksjonelle grunner er den antigen-uspesifikke delen av forsvaret kjent som det paraspesifikke immunsystemet. Frem til nå har immunologisk forskning hovedsakelig vært opptatt av den antigen-spesifikke delen av immunsystemet, dvs. hvordan immunitet blir dannet. Anvendelse av dette forsvarspotensialet førte for eksempel til utvikling av aktiv og passiv immunisering. I kontrast til dette er granskning av paraspesifikke aktiviteter til immunsystemet for 10 forhindring og leging fortsatt i innledende stadier. Det paraspesifikke immunsystemet gjør det mulig for organismen å fremskaffe et øyeblikkelig forsvar når konfronert med forskjellige fremmede forbindelser, infeksjose patogener, toksiner og transformerte celler til organismen selv. Det er mønstre på nære funksjonelle sammenhenger mellom paraspesifikke og spesifikke aktiviteter til immunsystemet som generelt innbefatter en 15 strøm av informasjon fra paraspesifikke mekanismer som først reagerer overfor spesifikke mekanismer til immunsystemet. På denne måten, i tilfeller hvor det er infeksjon med spesielt virulente patogener, kan det paraspesifikke forsvaret til organismen fylle tomrommet frem til den spesifikke immuniteten har hatt tid til å bli utviklet.

25

Siden Edward Jenner introduserte beskyttende immunisering overfor kopper i 1798 ved anvendelse av en vaksine oppnådd fra dyr (kyr eller hester) og basert på vaccinia virus er empiriske oppnådde resultater blitt rapportert som viser at beskyttende immunisering overfor kopper resulterte i at de som ble vaksinert ble overraskende hurtig helbredet, 30 eller uten komplikasjoner, ved andre infeksjoner og sykdommer, spesielt kroniske og tilbakevendende forstyrrelser, som de led av ved vaksineringsstidspunktet. Dette er spesielt tilfelle for herpesinfeksjoner fra forskjellige genesis, papillomer, kroniske eksemmer og patologiske tilstander i ører, nese og hals. Det ble i tillegg bemerket at de som ble immunisert viste et generelt øket korttids motstandsnivå overfor akutte 35 omgivende infeksjoner. Lignende fenomener er blitt bemerket etter beskyttende immunisering mot former for dyrekopper. Det ble ut fra disse funnet utledet av poxvirusene eller visse strukturelle komponenter av disse virusene kan positivt influere

på organismens evne til å motstå infeksjoner og tumorer, på et uspesifikt nivå. På grunn av at disse uspesifikke legingsprosessene fremkommer rett etter vaksinerings og følgelig 5 til 7 dager før den spesifikke immuniteten gitt av vaksinasjonen blir utviklet, samt parallelt, kalte A. Mayr i 1978 disse uspesifikke konsekvensene ved en profylaktisk immunisering som "paraspesifikk". Medikamenter produsert spesifikt for å undersøke slike paraspesifikke effekter er kjent som "paramunitetsinducere"; se A. Mayr, 'Prämunität, Prämunisierung und paraspezifische Wirkung von Schutzimpfungen', Münch. Med. Wschr. 1978, Col. 120, s. 239 til 242; A. Mayr, H. Raettig, H. Stickl and M. Alexander, 1979: 'Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer', Fortschr. 10 Med. 97, s. 1159 til 1165 og 1205 til 1210.

DE-A-27 14 665 og US-PS 4.191.745 beskriver sammensetninger basert på poxvirus for behandling av herpes zoster og andre herpes infeksjoner. Innen veterinærmedisin er paramunitetsinducere blitt produsert fra rensede, attenuerte og aktiverte avipox og parapox viruser. Disse paraimmunitetsinducere er registrert i europeiske land som 15 "Duphapind^R" (OIND-AVI) og som "Baypamun^R" (PIND-ORF) for alle arter av husdyr og gårdsdyr. Paraimmunitetsinducer PIND-AVI blir fremstilt fra en attenuert parapox virus, stamme D-1701. Attenuerte viruser blir gjort inaktive på en måte som i seg selv er kjent, for eksempel ved γ -bestråling eller kjemiske midler så som behandling med β -propiolakton. 20

Medikamenter med paramuniserende egenskaper som er foretrukket for anvendelse som immunstimulerende midler og tilveiebringe "adjuvantimmunoterapi" innen humanmedisin er BCG (Bacillus Calmette Guerin), levamisol og Corynebacterium parvum (syn. Propionibacterium acnes). Disse preparatene er dårligere i forhold til 25 poxvirus-baserte paramunitetsinducere med hensyn på deres paramuniserende virkning, som vist utfra resultatene oppsummert i tabell 1, som ble oppnådd i tester hvor disse preparatene blir sammenlignet med PIND-AVI og PIND-ORF i VSV babymusetesten, se A. Mayr, A.M. Büttner, S. Pawlas, V. Erfle, B. Mayr, R. Brunner og K. Osterkorn, 1986: 'Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende (paramuniserende) 30 Wirksamkeit von BCG, Levamisol, Corynebacterium parvum und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen "in vivo"- und "in vitro"-Testen', J.Vet.Med. B 33, s. 321 til 339.

35 Det er en hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe, for terapeutiske anvendelser i mennesker og veterinærmedisin, multipotente paramunitetsinducere basert på poxvirus komponenter som er blitt forbedret med hensyn på deres potens og med

hensyn på deres paramuniseringsrelaterte aktiviteter. Det er en ytterligere hensikt ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe en forbedret fremgangsmåte for fremstilling av nevnte multipotente paramunitetsinducere ved anvendelse av en ny teknikk for viruspropagering i cellekulturer og/eller virusinaktivering. Det er videre en ytterligere
5 hensikt ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe farmasøytiske sammensetninger for anvendelse som medikamenter basert på nevnte multipotente paramunitetsinducere.

Oppfinnelsen vedrører følgelig multipotente paramunitetsinducere basert på en kombinasjon av to eller flere poxviruskomponenter avledet fra forskjellige
10 poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper. Oppfinnelsen er videre relatert til multipotente paramunitetsinducere basert på en kombinasjon av forskjellige arter av inaktiverte, attenuerte poxviruser med paramuniserende egenskaper. Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av paramunitetsinducere hvor to eller flere poxviruskomponenter avledet fra forskjellige poxvirusstammer med
15 paramuniserende egenskaper blir kombinert. Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåter for fremstilling av multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen, og farmasøytiske sammensetninger som omfatter nevnte multipotente paramunitetsinducere, for anvendelse som medikamenter. Det ble uventet oppdaget at kombinerings av poxviruskomponenter i multipotente paramunitetsinducere ifølge
20 oppfinnelsen ikke resulterer i en reduksjon i, eller alene tap av, respektive paramuniserende aktiviteter av individuelle poxviruskomponenter. Det ble derimot oppdaget at kombinerings av poxviruskomponenter avledet fra forskjellige poxvirusstammer i multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen ikke bare tilveiebringer en additiv eller supplementær effekt, men en potensiering av den
25 respektive paramuniserende virkningen. Eksperimenter har vist at virkningen av multipotente paramunitetsinducere kombinert fra poxviruskomponenter overskrider deres respektive individuelle virkninger. Dette fenomenet kunne ikke ha blitt forutsett, og med hensyn på deres potens og deres paramuniseringsrelaterte aktiviteter forsterker dette disse paramunitetsinducere sammenlignet med konvensjonelle preparater fra en
30 enkelt poxvirus komponent. Et annet uventet funn er at multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen omtrent ikke har immunogene egenskaper, men har meget sterke paramuniserende egenskaper, og som et resultat av dette kan de trygt bli administrert på et gjentatt eller kontinuerlig grunnlag.

35 Oppfinnelsen er også basert på det uventede funnet at en konkurrerende situasjon eksisterer mellom epitopene til de strukturelle proteinene til poxvirusene ansvarlig for paramunisering og de som er ansvarlige for immunisering. Desto brattere reduksjon i

aktivitet på den delen av epitopene som er ansvarlige for antigen-spesifikk immunisering, desto større er økningen i paraspesifikk aktivitet. Dette fremkommer ut fra følgende to observasjoner:

- 5 a) attenuering over flere hundre føringer i cellekulturer forårsaker at de immuniserende egenskapene til poxvirusene reduseres, mens de paraspesifikke aktivitetene ikke bare øker, men når det gjelder visse poxstammer bare fremkommer etter attenuering;
- 10 b) inaktivering av poxvirusene egnet til å preparere paraimmunitetsinducere, fortrinnsvis ved bestråling, varme eller pH virkning, er fortrinnsvis ved kjemisk behandling med β -propiolakton og spesifikke tilstander, forårsaker at poxvirusene mister deres immuniserende egenskaper, mens deres paramuniserende aktiviteter øker.
- 15 De oppfinneriske kombinasjonene av poxviruskomponentene er egnet for anvendelse som multipotent paramunitetsinducere i både human- og veterinærmedisin.

Betegnelsen "poxvirus komponent", som anvendt i foreliggende oppfinnelse, dekker et stort antall virale strukturer avledet fra poxviruser med paramuniserende egenskaper, for eksempel levedyktige (dvs. som kan formeres) eller inaktiverte friskt isolerte poxviruser, levedyktige eller inaktiverte rekombinerte poxviruser avledet fra friskt isolerte poxviruser, levedyktige eller inaktiverte attenuerte poxviruser, levedyktige eller inaktiverte rekombinerte poxviruser avledet fra attenuerte poxviruser, frakoblet kappe og spaltningsprodukter og andre former til nevnte kapper av poxvirusene angitt ovenfor, individuelle virale polypeptider oppnådd ifølge biokjemiske eller immunokjemiske metoder fra kulturer som er blitt infisert med poxvirusene angitt ovenfor, og rekombinante virale polypeptider oppnådd ved hjelp av prokaryot eller eukaryot ekspresjon og i det minste deler som er avledet fra en eller flere av virale polypeptider til poxvirusene angitt ovenfor.

30

Betegnelsen "kombinasjon", som anvendt i oppfinnelsen, omfatter både blanding av to eller flere individuelle poxviruskomponenter avledet fra forskjellige stammer av poxvirus, og også det faktumet som omfatter kombinerings av en mengde slike individuelle poxviruskomponenter i et polypeptid eller polypeptidkompleks.

35 Komponenter avledet fra poxviruser, for eksempel rekombinerte poxviruser, individuelle virale polypeptider eller rekombinante virale polypeptider, som er et resultat av mutasjon eller genetisk manipulasjon omfatter to eller flere

polypeptidsekvenser avledet fra to eller flere poxvirusstammer, vil bli behandlet som om de var to eller flere diskrete poxviruskomponenter, uansett det faktumet at nevnte polypeptidsekvenser utgjør deler av en enkelt aminosyrekjede. Det samme gjelder også for individuelle poxviruskomponenter som er koblet sammen fysisk eller kjemisk.

5

Betegnelsen "multipotent" som anvendt i oppfinnelsen angir mange og forskjellige potensielle applikasjoner av paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen med hensyn på profylakse og terapi, for eksempel følgende indikasjoner:

- 10 1) infeksjøs faktorsykdommer og blandede infeksjoner, kroniske manifestasjoner av infeksjøs prosesser, vedvarende tilbakevendende infeksjoner og bakterielle og virale infeksjoner som er motstandsdyktige overfor kjemoterapi,
- 2) svakheter ved, eller unormale tilstander i immunsystemet til en organisme,
- 15 3) behandling av neonatale infeksjoner,
- 4) adjuvantterapi i visse former for cancer og/eller forhindring av metastasering,
- 20 5) regulering av homeostasen mellom hormonelle, sirkulatoriske, metabolske og nervesystemer.

Paramunitetsinducere er spesielt egnede for profylaktisk anvendelse i følgende tilfeller:

- 25 - hurtig aktivering av neonat immunitet
- før ventede stressituasjoner (husbyting, mentalt stress, perioder med høy ytelse osv.)
- før hospitalisering
- hvor det er akutt fare for infeksjon
- 30 - forhindring av komplikasjoner ved vaksinasjon
- redusering av farene ved tumorer og/eller metastaser
- til støtte for bioregulering
- økning av ytelsesnivåene
- økning av livsforventningene
- 35 - regulering av homeostasen i samspill med hormonelle, sirkulatoriske, metabolskesystemer og nervesystemer.

Paramunitetsinducere er spesielt egnede for terapeutisk anvendelse i følgende tilfeller:

- immune svakheter
- virussykdommer, terapiresistente bakterielle sykdommer, infeksiøse
- 5 faktorsykdommer
- kroniske og tilbakevendende infeksjoner
- tumorer
- konvalesens
- kjemoterapi og antibiotisk behandling
- 10 - leversykdommer med forskjellig etiologi
- kroniske hudsykdommer
- immunopatogene sekundære sykdommer.

Tabell 1 viser paramuniserende effekter av forskjellige poxvirus komponenter og
15 paramunitetsinducere i VSV babymustesten. Figurene som er vist representerer
effektivitetsindikasjoner. Prosedyren anvendt er beskrevet i DE-A-27 14 665.

Tabell 2 viser potensiering av paramuniserende effektivitet til forskjellige
poxvirusstammer i VSV testen som en funksjon av attenueringsgraden som er involvert.
20 Inaktiverede virussuspensjoner ble anvendt.

Tabell 3 viser hvilken effekt attenuering har på induksjon av interferonsystemet til
mononukleære leukocytter i perifert blod i forskjellige arter.

25 Tabell 4 viser hvordan paramuniserende effekt til multipotent paramunitetsinducer
basert på et rekombinant poxvirus intensiveres sammenlignet med effekten av
individuelle komponenter.

Figur 1 viser en sammenligning av effektivitetsindikasjonene oppnådd fra to VSV tester
30 ved anvendelse av attenuert avipox virus HP1, parapox virus ORF D1701 og et
kombinert preparat av HP1 og D1701.

Figur 2 viser den potensierende effekten av en oppfinnerisk kombinasjon av poxvirus
komponentene ORF protein 4D9 og PIND-AVI sammenlignet med effekten av de to
35 individuelle komponentene på NK celle (natural killer cell) aktiviteten i kromium-51
frigjørings testen. Indikerte verdier tilsvarer gjennomsnittet av to forskjellige analyser.
Testprosedyren anvendt er beskrevet i litteraturreferansen til Mayr 1986 sitert ovenfor.

For anvendelse som poxvirus komponenter for multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen kan poxvirus arter bli anvendt som friskt isolerte, såkalte virulent feltstammer, eller ellers i attenuert, aviruelent form. På grunn av at paramuniserende egenskaper øker i løpet av attenueringen sammenlignet med ikke-attenuerte stammer, og også på grunn av trygghetsbetraktninger, er anvendelse av attenuerte stammer foretrukket. Dette involverer propagering av relevante virusstammer i serieføringer i cellekulturer. Ved regulær interpolering av kromal seleksjon ved anvendelse av plakkteknologi blir genetisk like virusmaterialer oppnådd som har tilpasset seg spesielt godt til dyrkningsbetingelsene takket være mutasjon og seleksjon. Attenueringsgraden blir bekreftet i løpet av føringene ved inokulering i reseptive verter (for eksempel ved anvendelse av kutanmetoden når det gjelder kyllinger, kanarifugler, osv. ofring av kaninhud osv.). De forskjellige identifikasjonsmetodene hører til teknikkens stand, se A. Mayr and E. Munz, 1964: 'Veränderungen von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen', Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 195, s. 24 til 35; A. Mayr, F. Hartig and I. Bayr, 1964: 'Entwicklung eines Impstoffes gegen die Kanarienvpocken auf der Basis eines attenuierten Kanarienvpocken-Kulturvirus', Zbl. Vet. Med. B 12, s. 41-49; A. Mayr and K. Malicki, 1966: 'Attenuierung von virulentem Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus', Zbl. Vet. Med. B 13, s. 1 til 13; A. Mayr, M. Herlyn, H. Mahnel, A. Danco, A. Zach und H. Bostedt, 1981; 'Bekämpfung des Ecthyma contagiosum (Pustular dermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpstoff', Zbl. Vet. Med. B 28, s. 535-525. Det er standardpraksis å anvende flere forskjellige metoder for å bestemme attenueringsgraden til poxvirusartene involvert.

Serieføringer anvendt for attenuering avsluttes vanligvis med trippelklonal seleksjon ved anvendelse av plaque final dilution teknologi. Dette forsikrer at virusmaterialet som blir anvendt er genetisk likt. Alle poxvirusstammene sitert nedenfor ble oppnådd ifølge dette prinsippet.

Attenuering av avipoxvirus krever 200 til 500 kulturføringer, fortrinnsvis minst 440 føringer. Attenuering av parapoxvirus krever 100 til 200 kulturføringer, fortrinnsvis minst 170 føringer, opprinnelig i embryonale lammenyrekulturer og etterfulgt av føringer i embryonale kalvelungekulturer og i cellelinjene til apenyrene (for eksempel MA, Vero). MVA vacciniavirus krever attenuering over 400 til 600 kulturføringer, fortrinnsvis minst 575 føringer. Attenuering av canarypoxvirus tar fra 200 til 500 kulturføringer, fortrinnsvis minst 390 føringer. Det tar fra 3 til 5 år for å utføre hver 100

føring, avhengig av arten av poxviruset. Attenuering omfatter følgelig en periode som varer fra 10 til 20 år.

Attenuerte poxviruser fortrinnsvis anvendt som poxviruskomponent for

5 paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen er avipoxvirus, stamme HP-1, 444 føring i CEF kulturer, parapoxvirus, stamme ORF D1701, 135 føring i embryonale lammenyrekulturer, 37 føring i bovine embryonale lungecellekulturer (BEL), 49 føring i MA celler (apenyrecellelinje), vacciniavirus, stamme MVA (modifisert vacciniavirus Ankara), 572 føring i CEF kulturer, og canarypoxvirus, stamme KP-1, 535 føring i CEF

10 kulturer. Prøver av disse virusene er deponert i form av lyofilisater til European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), PHLS Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, England. De resepektive serienr. til deponeringene er V94012709, V94012706, V94012707 og V94012708; se også indikasjonene til deponerte mikroorganismer nedenfor. Ytterligere indikasjoner

15 vedrørende deponerte virus er kan tas fra vedlagte kopier av aksjesjonskjemaene for virusdeponeringene.

Det er alternativt mulig å anvende andre attenuerte poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper for å danne multipotente paramunitetsinducere ifølge

20 oppfinnelsen.

Forskjellige fremgangsmåter er egnede for fremstilling av rekombinante poxviruser innenfor betydningen av foreliggende oppfinnelse. En foretrukket fremgangsmåte innbefatter samtidig infeksjon ved anvendelse av to forskjellige poxvirusstammer med

25 paramuniserende egenskaper for å vekke rekombineringsfenomener hvor deler av områdene som koder for paramuniseringsegenskapene til et virus blir innført i genomet til forskjellige poxviruser. Deretter blir rekombinerte poxviruser som forener paramuniserende egenskaper til to forskjellige poxvirusstammer identifisert ved anvendelse av plaque final fortynningsføringer og hensiktsmessige screeningsprosesser.

30 Forskjellige kombinasjoner av avipoxvirus, vaccinia MVA virus, canarypoxvirus eller parapoxvirus er for eksempel egnet for samtidig infeksjon.

En annen fremgangsmåte for preparering av rekombinante viruser gjør i tillegg bruk av genetiske ingeniørteknikker og homolog rekombinasjon. For dette er det først nødvendig

35 å identifisere områdene som koder for paramuniserende egenskaper til poxvirusene. Dette utføres ved hjelp av i seg selv kjente teknikker.

For eksempel kan paramuniserende strukturelle proteiner bli separert ved anvendelse av biokjemiske eller immunokjemiske metoder og deres paramuniserende egenskaper kan bli undersøkt. Dette kan blant annet bli utført ved anvendelse av in vitro og in vivo tester angitt nedenfor. Når paramuniserende strukturelle proteiner er blitt identifisert, kan N-terminale sekvenser til hele proteinet eller dets proteolytiske eller kjemiske spaltningprodukt bli sekvensert for å oppnå aminosyresekvensinformasjon som muliggjør screening for tilsvarende DNA seksjoner i hensiktsmessige genbanker ved anvendelse av riktig konstruerte oligonukleotidprober ved anvendelse av enten tradisjonelle hybridiseringsteknikker eller polymerasekjedereaksjon (PCR). En annen mulig identifikasjonsmetode er ved hybridisering under betingelser med redusert stringens ved anvendelse av kjente DNA prøver av en poxvirusart som er spesifikk for proteiner med paramuniserende egenskaper, og isolering av de tilsvarende homologe DNA delene til andre poxvirusarter som likeledes koder for proteiner med paramuniserende effekt. I denne prosessen er det også mulig å erstatte den konvensjonelle screeningsmetoden med PCR med tilsvarende primere som er homologe med de kjente sekvensene.

DNA deler av andre poxvirusarter som er homologe med kjente DNA seksjoner til visse poxvirusarter og som koder for paramuniserende fortynter kan også bli identifisert ved hjelp av restriksjonsenzymkartlegging av genomet til forskjellige beslektede poxvirusarter og sammenligning av områdene med lignende restriksjonsenzymspaltningsmønstre. Denne typen av komparativ restriksjonsenzymkartlegging er for eksempel beskrevet i F. Ruff and D. Burger: 'Comparison of contagious Ecthyma virus genomes by restriction endonucleases', Arch. Virol. 84, s. 283-289 (1985).

En annen måte for å identifisere DNA delene kodende for paramuniserende egenskaper er å anvende monoklonale eller polyklonale antistoffer som gjenkjenner virale proteiner med paramuniserende egenskaper for å screene genbanker. En slik metode er for eksempel blitt anvendt for å identifisere kanin poxvirusgenet som koder for 14 kD proteinet (fusjonsprotein) med paramuniserende egenskaper til stede i poxvirusarter.

Etter identifikasjon og kloning av DNA delene som koder for paramuniserende virale proteiner er det mulig å spesifikt danne rekombinerte poxvirusarter ifølge oppfinnelsen ved hjelp av homolog rekombinasjon ved anvendelse av egnede vektorer. Et egnet innskuddssete for fremmed DNA vil for eksempel være lokuset for tymidinkinasegenet fordi det ikke er essensielt for poxvirusarter. Fremgangsmåten innbefatter transfeksjon av en transfervektor som bærer den heterologe genseksjonen som skal bli innført i

poxviruset via homolog rekombinasjon og som er blitt oppnådd fra et annet poxvirus med paramuniserende egenskaper, inn i celler som er blitt infisert med poxviruset som skal bli rekombinert. Transfervektorene vil fortrinnsvis bære et seleksjonsmarkørgen, samt homologe, flankerende sekvenser avledet fra poxviruset som skal bli rekombinert, for å muliggjøre homologe rekombinasjonsfenomener i tilfredsstillende rate. Dette blir deretter etterfulgt av identifikasjon av rekombinerte poxviruser som kombinerer de paramuniserende aktivitetene til to forskjellige poxvirusstammer, igjen ved anvendelse av plaque final fortynningsføringer og egnede screeningsprosesser så som immunokjemisk individuell plaque deteksjon ved hjelp av monoklonale eller polyklonale antistoffer. Innskutte DNA konstruksjoner kan også bli detektert ved anvendelse av hybridiseringsteknikker, for eksempel ved hjelp av "dot blot" hybridisering. Ekspresjon av innskuddet blir enten detektert direkte ved deteksjon av relevant strukturelt protein med monoklonale eller polyklonale antistoffer, eller ellers indirekte via immun-paramunrespons til laboratoriedyrene (VSV eksponeringstesten), i cellekultureksponeringstesten) eller ved in vitro parametere (interferon induksjon, dannelse av visse interleukiner, CSF, TNF osv.). Resultatet er et rekombinant poxvirus som kan bli anvendt som en poxviruskomponent eller som en multipotent paramunitetsinducer innenfor betydningen av foreliggende oppfinnelse.

Attenuerte poxviruser er spesielt egnede for fremstilling av rekombinerte poxviruser ifølge oppfinnelsen på grunn av at de er kjente, ikke bare for å være trygge for omgivelsene, men har også meget god paramuniserende effektivitet.

Attenuerte rekombinerte poxviruser kan også bli anvendt både i levedyktig form og i inaktivert form for å produsere multipotente paramunitetsinducere og farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen. Anvendelse av inaktiverede rekombinante poxviruser er foretrukket.

Eksempler på levedyktige og inaktiverede rekombinante attenuerte poxviruser med paramuniserende effekt som er egnede for anvendelse som poxviruskomponenter er MVA virus bærende avipoxvirus og parapoxvirus gener som koder for paramuniserende proteiner, attenuert canarypoxvirus som bærer MVA virus, avipox og parapox virusgener som koder for paramuniserende proteiner, og "vice versa" kombinasjoner av de mest forskjellige, attenuerte poxvirusstammene.

Propagering av ovennevnte poxviruser anvendt som poxviruskomponenter for multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen kan foregå i både primære og

sekundære cellekulturer, samt i permanente cellelinjer. Propagering og dyrking av poxvirus er anvendt i henhold til oppfinnelsen utføres ifølge i seg selv kjente teknikker. For eksempel kan attenuerte avipoxvirus bli propagert i primære eller sekundære fibroblaster fra kyllingembryoer (CEF kulturer) og kulturer til permanente CEF celler (kyllingembryo fibroblaster; cellelinje). Propagering i primære CEF kulturer er foretrukket. Attenuerte parapoxvirus kan for eksempel bli propagert i lammenyrekulturer eller bovine embryo lunger (BEL) kulturer (primære eller sekundære kulturer; blant annet ifølge metoden til S.H. Madin, P.C. Andriese, N.B. Darby, 1957: 'The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals', Am. J. Vet. Res. 18, s. 932 til 941), vero og MA celler (nyrecellelinjer til afrikansk grønn ape med lang hale; ATCC CCL 81 og Microbiology Associated 104). Propagering i verocellene er foretrukket. MVA vacciniavirus kan for eksempel bli propagert i primære CEF kulturer eller CEF cellestammer (cellelinje). Propagering i CEF kulturer er foretrukket. Canarypox virus kan bli propagert i CEF kulturer og i permanente CEF celler. Propagering i primære CEF kulturer er foretrukket.

Når det gjelder attenuert avipoxvirus, MVA vacciniavirus og attenuert canarypoxvirus er propageringen fortrinnsvis i primære eller sekundære cellekulturer fra pattedyr eller fugler som kan motta nevnte virus. I primære eller sekundære CEF kulturer foregår propagering fortrinnsvis ved 33°C til 39°C, fortrinnsvis ved 37°C. CEF cellekulturer blir dannet ved konvensjonelle trypsineringsmetoder av kropp og ben til kyllingembryor inkubert i 10 til 12 dager, etter fjerning av innvoller og hode (fibroblastdyrking), i tilsvarende glass eller plastbeholdere egnede for cellekulturer, for eksempel penicillinflasker, ved anvendelse av stasjonær inkubasjon eller roterende inkubasjon (rullekulturer). Det er mest foretrukket å modifisere standardteknikken og anvende hele embryoer, inkludert hode og innvoller (blandet cellesuspensjon, bedre virushøstinger med mere stabil kvalitet og kvantitet av paramuniserende egenskaper). Primære kulturer blir fortrinnsvis oppnådd ifølge en pretrypsinering (10-15 minutter, fjerning av supernatanten) og en hovedtrypsinering i løpet av 45-60 minutter. Mediet som tas i kultur består fortrinnsvis av minimalt essensielt medium pluss 10% laktalbumin hydrolysat + 10% BMS (serumsubstitutt); medium for opprettholdelse består bare av MEM. Cellekulturene blir infisert med virus rett før "densifikasjon" (80 til 100% konfluente cellelag), dvs. 1 til 3 dager etter utsåing, fortrinnsvis 20 timer etter utsåing, og inkubert ved 33°C til 39°C, fortrinnsvis ved 37°C.

Foretrukket virus for inokulering på CEF kulturer er plakk-renset virusmateriale av relevant attenuert poxvirusstamme. Foretrukket inokuleringsdose er $10^{7,0} \text{TCID}_{50}/100$ ml medium (TCID_{50} = 50% vevskultur infeksjons dose).

- 5 Infiserte cellekulturer blir inkubert ved 33°C til 39°C, fortrinnsvis 37°C, for å oppnå suspensjoner av attenuerte poxvirus fra cellekulturer for anvendelse for multipotente paramunitetsinducere. Det virale materialet høstes etter en til to dager, fortrinnsvis etter 3 til 4 dager, og fortrinnsvis når 5 til 100% av cellelaget er blitt ødelagt, fortrinnsvis med en 5 til 60% status av sfæriske, rundede celler og 40 til 95% lysing. En
- 10 tilstrekkelig mengde av virussuspensjonen blir fjernet for å utføre vanlige bakteriologiske, virologiske og mykologiske undersøkelser ifølge internasjonale reguleringer angående kontroll av kontaminasjoner. Deretter blir cellene i sin helhet lagret ved +4°C, -20°C til -80°C eller lavere temperaturer, fortrinnsvis ved -80°C. Kulturene forblir ved denne temperaturen helt til bakteriologiske, virologiske og
- 15 mykologiske undersøkelser er blitt fullført. Dersom alle undersøkelsene tilfredsstillende sikkerhetsreguleringene blir høstet virus tint. Dette ødelegger cellene som fortsatt er intakt og frigjør følgelig cellebundet virus for derved å muliggjøre at virustitre øker. Cellene blir fortrinnsvis nedbrutt ved gjentatt frysing og tining, mest foretrukket er ved behandling med ultralyd. Dette ble etterfulgt av en annen undersøkelse av steriliteten og
- 20 en undersøkelse av infeksjonstiteren.

Fremgangsmåten anvendt for å dyrke og propagere attenuert parapoxvirus er den samme som allerede beskrevet med hensyn på attenuert avipoxvirus, vaccinia virus og canarypox virus. Den eneste forskjellen ligger i anvendelse av primære eller sekundære

25 lammenyrekulturer, bovine embryo lungecellekulturer eller forskjellige cellelinjer så som veroceller eller MA celler (i begge tilfeller cellestammer tatt fra embryoopenyre) som cellekulturer. Veroceller er foretrukket for fremstilling av parapoxvirus-suspensjoner.

30 Det er også mulig å danne multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av frakoblede kapper av urekombinerte eller rekombinerte poxvirus som poxviruskomponenter, samt andre former av nevnte kapper som er et resultat av ufullstendig syntese av viruspartikler.

35 Viruskapper blir fortrinnsvis dannet ved å splitte viruskappen bort fra viruskjernen (nukleokapsidet), på en slik måte at suspensjonene av poxvirusene oppnådd på foregående måte blir inkubert med en detergent under reduserende betingelser og

viruspartiklene splittet på denne måten blir separert til viruskjerner og viruskapper ved hjelp av tetthetsgradient sentrifugering.

En foretrukket fremgangsmåte for isolering av paramuniserende viruskapper av
5 poxvirusser eller andre former av disse kappene er å infisere cellekulturer som ikke er
permissive for forskjellige poxvirusarter. Et eksempel på en slik konstellasjon er
dyrking av attenuert ORF virus i kyllingembryo fibroblaster. De respektive
poxvirusartene går gjennom en aborterende proliferasjonssyklus i ikke-permissive
cellekulturer. Det er følgelig ingen assembly av ferdige, infeksiose viruspartikler i
10 viroplasmasonene til de infiserte cellene. Syntetisert, aborterende forløpere av virus
("tomme kapper", ufullstendige former, andre former, osv.) inneholder allerede de
strukturelle proteinene ansvarlige for paramunisering. De blir også skilt ut i
kulturmediet eller kan bli frigjort ved lysering av infiserte celler. De blir isolert, rensset
og konsentrert ifølge fremgangsmåtene beskrevet ovenfor.

15

Det er foretrukket å anvende foregående poxvirusser i attenuert form for å danne
foregående viruskapper og variantformene til viruskappene. En foretrukket
fremgangsmåte for fremstilling av viruskapper er beskrevet nedenfor i eksempel 6.

20 Det er også mulig å anvende virale polypeptider som poxvirus komponenten innenfor
betydningen av oppfinnelsen. Slike virale polypeptider er normalt virale, strukturelle
proteiner med paramuniserende egenskaper som kan bli dannet ifølge forskjellige
metoder, vanligvis ved rensing fra cellekulturer som er blitt infisert med poxvirusser.
Disse cellekulturene er fortrinnsvis de som er beskrevet ovenfor, hvor det er mulig å
25 anvende begge de hvor vertscellene er permissive med hensyn på infisering av
poxvirusser og de som ikke er permissive med hensyn på poxvirusene. De virale
polypeptidene blir rensset ved anvendelse av konvensjonelle biokjemiske eller
immunokjemiske metoder, blant annet ved anvendelse av monoklonale antistoffer for
immunoaffinitetskromatografi. Foretrukne proteiner rensset ifølge disse
30 fremgangsmåtene innbefatter for eksempel strukturelle proteinfraksjoner av poxvirusene
med en molekylvekt på 14 kDa (fusjonsprotein) eller 30 kDa (adsorpsjonsprotein).
Fusjonsproteinet stimulerer fagocytose, interferonsyntese og dannelsen av interleukiner.
Adsorpsjonsproteinet, som er felles for alle ortopox arter, stimulerer NK cellene,
granulocytter og makrofager og anvender effektorceller for å oppnå dannelse av
35 interferoner og visse interleukiner.

Paramunisering av virale polypeptider kan også bli isolert direkte ved spaltning av poxviruspartiklene, etterfulgt av isolering, fraksjonering (for eksempel ved molekylvekt), rensing og konsentrering (for eksempel ved anvendelse av tetthetsgradienter, ultrasentrifugering, kromatografi, preparativ SDS polyakrylamid gelelektroforese eller andre konvensjonelle prosesser). Eksempel 8 angir en fremgangsmåte for rensing av virale polypeptider oppnådd fra preparative SDS polyakrylamidgeler.

Etter identifikasjon av gendelene som koder for proteiner med paramunerende egenskaper, allerede nevnt i sammenheng med preparering av rekombinante virus kan DNA delene klonet og karakterisert på denne måten også bli anvendt for å danne rekombinante virale polypeptider. Egnede ekspresjonssystemer for preparering innbefatter prokaryote eller eukaryote ekspresjonsvektorer basert på plasmider, fag eller virus, for eksempel de som egnede for ekspresjon i *E. coli*, gjær eller pattedyrceller. De som er egnede for ekspresjon i pattedyrceller er spesielt egnede.

Konvensjonelle genetiske ingeniørmetoder (A. Mayr: 'Virologische Arbeitsmethoden', vol. 3, published in 1989 by Fischer Verlag, Jena) blir anvendt for å overføre DNA delene ved hjelp av kjente metoder inn i fag eller plasmidvektorer eller inn i vektorer basert på virus og uttrykking av disse i hensiktsmessige vertsceller. De uttrykte proteinene blir deretter rensset ved konvensjonelle metoder og utgjør utgangsmateriale for tilsvarende kombinasjoner av poxviruskomponentene. Rekombinant ekspresjon ikke bare muliggjør en DNA del kodende for et viralt polypeptid med paramunerende egenskaper å bli uttrykt, men slike DNA deler kan også bli klonet inn i ekspresjonsvektoren på en måte som fører til ekspresjon av det resulterende virale polypeptidet som et fusjonsprotein. Et antall polypeptidsekvenser vil utgjøre egnede fusjonsproteinkomponenter for fusjon med virale polypeptiddeler, for eksempel sekvenser avledet fra bakteriell β -galaktosidase (*lacZ*); DNA deler som koder for disse komponentene er vanligvis allerede til stede i vektorsystemene anvendt for ekspresjon. Fusjonsproteiner egnede som poxviruskomponenter innenfor betydningen i foreliggende oppfinnelse kan også være fusjoner av to eller flere forskjellige virale polypeptider avledet fra forskjellige paramunerende poxvirus stammer. Disse sistnevnte fusjonsproteinene forener paramuneringspolypeptidarealer til forskjellige poxvirus i ett polypeptid og blir oppnådd ved å kombinere sammen to eller flere av DNA delene kodende for nevnte polypeptidareale i hensiktsmessig rekkefølge og i korrekt leseramme.

Det kan være nødvendig å anvende ytterligere rensningsmetoder for å anvende poxviruskomponentene som multipotente paramunitetinducere innen humanmedisin. For eksempel kan preparatet i tillegg bli rensset ved anvendelse av ytterligere rensningsmetoder som i seg selv er kjente, inkludert ultrasentrifugering, tetthetsgradient sentrifugering osv.

Poxvirusstammene eller rekombinante virusstammer kan bli inaktivert med forskjellige behandlingsprosedyrer, for eksempel varmebehandling, anvendelse av fysiske eller kjemiske midler eller ved pH innvirkning. Inaktivering er fortrinnsvis ved gammabestråling eller behandling med β -propiolakton og behandlingene må bli utført under betingelser som ikke ødelegger de paramuniserende egenskapene.

Den mest foretrukne utførelsesformen innbefatter inaktivering av attenuert poxvirus med β -propiolakton i et pH område på mellom 8 og 9. Behandling med β -propiolakton blir fortrinnsvis utført under følgende betingelser: pH til virussuspensjon blir justert til 8,6 ved anvendelse av NaHCO_3 (8,8% i destillert vann). β -propiolakton blir innledningsvis fortynnet 1:10 med destillert vann og, med egnede forsikringsforanstaltninger, tilsatt til virussuspensjonen i et forhold på 0,5 til 100. Dette tilsvarer en 0,05% fortynning av β -propiolakton. Denne suspensjonen blir omrørt i 1 time ved kjøletemperatur (+4 til +8°C) og i 4 timer ved 37°C og deretter lagret i et kjøleskap i omtrent 12-18 timer (over natt). Den inaktiverede suspensjonen blir rensset ved sentrifugering i 10 minutter ved 2600 rpm. pH blir deretter undersøkt og om nødvendig justert på nytt.

Bevis for inaktivering er ved inkulering av CEF kulturene med testprøver med tilstrekkelig volum av behandlet materiale. Hvis ingen typiske cytopatiske forandringer er blitt utviklet senere enn 9 dager etter inkulering er dette en indikasjon på at inaktiveringen er fullført. Hvis det skulle være antydninger til ikke-inaktivert gjenværende virus blir tre subføringer utført. I tillegg blir det utført en annen undersøkelse for kontaminasjon med virus, bakterier eller sopp i egnede kulturer eller på egnet kulturmedium, samt ved undersøkelse ved anvendelse av et elektronmikroskop.

Oppløsninger eller suspensjoner av poxviruskomponentene blir fortrinnsvis lyofilisert etter rensing. Egnede stabiliseringsmidler blir fortrinnsvis tilsatt til poxviruskomponentene før lyofilisering. I tilfeller som innbefatter suspensjoner av attenuerte poxviruser blir et stabiliseringsmiddel så som Kollidon^R, Molico^R, (melkepulver med lavt fettinnhold) eller gelatin tilsatt til poxvirussuspensjonen. Den

mest foretrukne utførelsesformen involverer tilsetning av suksinylert gelatin (fremstilt av Hausman of St. Gallen, Switzerland) i en sluttkonsentrasjon på 2,5%. Før gelatin blir tilsatt (50% konsentrasjon) må pH bli justert til 8,0. Dette gjelder også for andre stabiliseringsmidler.

5

Det ferdige preparatet blir delt inn i porsjoner, for eksempel i mengder på 2 ml og lyofilisert. Lyofilisert multipotent paramunitetsinducer vil forbli stabil i minst 10 år når lagret ved temperaturer mellom +4°C og +8°C eller under. Effektivitetsenheter til lyofilisatet bestemt ved VSV utsettingstesten eller cellekulturutsettingstesten forandres ikke over en periode på minst 10 år under disse betingelsene (betegnelsen "effektivitetsenhet" er definert nedenfor). Før plassert i endelig lagring blir enheten til lyofilisatet på ny undersøkt bakteriologisk, virologisk og toksikologisk.

Poxviruskomponentene produsert på den måten som er beskrevet ovenfor for fremstilling av paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen blir kombinert med en annen i forskjellige blandingsforhold for å potensiere effektiviteten. Når det gjelder attenuerte poxvirus er blandingsforholdet fortrinnsvis 1:1. Kombinasjoner er også mulige i for eksempel følgende blandingsforhold:

- 20 1. avipox virus og parapox virus 5:1 til 1:5, fortrinnsvis 2:1 til 1:2,
2. avipox virus, parapox virus og MVA vaccinia virus 6:3:1 til 1:3:6, fortrinnsvis 6:3:1, mest foretrukket 1:1:1,
3. avipox virus, parapox virus, MVA og canarypox virus inducere i et forhold på 1:1:1:1.

25

Tilsvarende blandingsforhold kan også bli anvendt for andre poxvirus komponenter ifølge oppfinnelsen. Andre blandingsforhold er derimot likeledes egnet for fremstilling av multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen.

30 Kombinasjonen av poxvirus komponenter for preparering av multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen kan foregå ved forskjellige tider i fremstillingsprosessen, fortrinnsvis før de blir behandlet for å inaktivere dem, før lyofilisering eller etter lyofilisering. Dersom poxvirusene blir anvendt som poxviruskomponenter er det foretrukket å kombinere komponentene før de gjennomgår
35 inaktiveringsbehandlingen.

Effektiviteten både til multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen og individuelle poxvirus komponenter kan bli demonstrert ved hjelp av forskjellige metoder: VSV infeksjonsmetoden i babymus blir anvendt som in vivo bevis, se Mayr et al. (1986), *ibid.*. Denne modellen kan bli anvendt samtidig for analysering av effektivitetsenheter (UE/ml). Tabell 1 representerer effektiviteten til forskjellige fortynninger av PIND-AVI og PIND-ORF i VSV modellen. Effektivitetsindeksen til et preparat, eller av et fortynningsstadium, blir beregnet ifølge følgende formel:

$$\text{Effektivitetsindeks (EI)} = \frac{b-a}{b} \times 100$$

a = % dødelighet i testgruppen

b = % dødelighet i kontrollgruppen

15

Fortynningsstadiet hvor en effektivitetsindeks på minst 20 fortsatt blir oppnådd inneholder 1 UE pr 0,1 ml (infeksjonsdose pr babymus), eller 10 UE/ml. I eksempelet med PIND-AVI er det endelige titeret 1:16; og batchen inneholder følgelig 160 UE/ml). Forskjellige testmetoder kan bli anvendt som in vitro bevis for effektivitet både for multipotent paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen og for individuelle poxvirus komponenter:

- a) aktiviteten til peritoneal NK celler 24 timer etter behandling med PIND-AVI i 4-timer kromium-51 frigjøringsstest; Mayr et al. 1986, *ibid.*,
- 25 b) koloni-stimulerende aktivitet i museserum 8 timer etter behandling; se G. Wolf, 1986: 'Kolonistimulierende Aktivität in Mäuseseren nach Vorbehandlung mit Inducern aus Pockenviren und anderen Mikroorganismen': Czerny 1990, *ibid.*, og
- c) interferonsyntese i mononukleære leukocytter i ferifert blod; se M. Steinmassl and G. Wolf, 1990: 'Bildung von Interleukin-2 und Interferon_a durch mononukleäre
- 30 Leukozyten des Schweines nach in vitro-Stimulation mit verschiedenen Viruspräparaten', J. Vet. Med. B 37, s. 321 til 331.

Alternative deteksjonsmetoder kan derimot også bli anvendt, blant annet måling av aktiviteten til tumornekrosefaktor (TNF) i forbehandlede kaniner eller mus i L929 cytotoxisk test, utsetningstest ("challenge test") i voksne mus med Aujeszky virus, bestemmelse av koloni-stimulerende aktivitet (CSA) i serum til forskjellige dyr og

35

måling av granulocytaktiviteten i mennesker og dyr i "FACS analysator" (partikkelopptak, "respiratorisk utbrudd").

5 Multipotent paramunitetsinducere oppnådd ifølge den foregående fremgangsmåten kan bli anvendt som utgangsprodukt for fremstilling av farmasøytiske sammensetninger for anvendelse som medikamenter. Frem til nå kan standard farmasøytiske bærere bli tilsatt til lyofilisatet ifølge utgangsvolumet, fortrinnsvis sterilt, pyrogen-fritt destillert vann. I denne formuleringen er det egnet for både parenteral (for eksempel intramuskulær eller subkutan) og lokal administrering. Multipotente paramunitetsinducere ifølge
10 oppfinnelsen er ikke-toksiske, pyrogen-frie og forårsaker ikke unormale postvaccinal reaksjoner når injisert intramuskulært.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter også andre formuleringer. Eksempler på formuleringer for lokal applikasjon innbefatter sugetabletter, salver,
15 suppositorier, nesedråper, nasal sprayer osv. Eksempler på formuleringer for parenteral applikasjon innbefatter injeksjonspreparater. De blir produsert ved hjelp av fremgangsmåter som i seg selv er kjente.

Ytterligere eksempler på egnede formuleringer av farmasøytiske sammensetninger
20 innenfor betydningen av foreliggende oppfinnelse innbefatter rektale eller vaginale suppositorier. I en hvilken som helst form kan de bli anvendt for å behandle hemorroider og vaginal betennelse eller andre vaginale lesjoner. Man må være forsiktig ved fremstilling derav for å forsikre at bestanddelene av bæreren, blant annet de med proteolytisk aktivitet, ikke på negativ måte påvirker steriliteten og stabiliteten.

25 For profylaktisk anvendelse blir de multipotente paramunitetsinducere fortrinnsvis administrert 1 til 3 ganger i 24 timers intervaller. For terapeutisk anvendelse er det foretrukket, avhengig av alvorligheten til den bestemte tilstanden, å utføre 1 til 3 behandlinger daglig i en periode på 3 til 5 dager, eller frem til de kliniske symptomene forsvinner. Dosen avhengig av symptomene som blir behandlet og på
30 administreringsformen som blir valgt. I parenterale applikasjoner er standarddosen vanligvis 2 ml, hvor en dose fortrinnsvis inneholder minst 360 effektivitetsenheter. Det er derimot mulig å variere dose og applikasjonsmetode for å tilfredsstille individuelle omstendigheter.

35 Foreliggende oppfinnelse omfatter en paramunitetsinducer basert på poxvirus-komponenter, kjennetegnet ved at paramunitetsinduceren omfatter en kombinasjon av to

eller flere poxviruskomponenter avledet fra forskjellige poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper.

5 Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for fremstilling av paramunitetsinducere, kjennetegnet ved å kombinere to eller flere poxvirus komponenter som er avledet fra forskjellige poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper.

10 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av paramunitetsinducere basert på kombinasjoner av poxviruskomponenter som er avledet fra forskjellige poxvirusstammer for å danne farmasøytiske sammensetninger.

Eksemplene vil ytterligere forklare oppfinnelsen.

15

Eksempel 1

Utgangsmateriale anvendt for å danne en poxvirus komponent ifølge oppfinnelsen var avipox stamme HP1 som er blitt isolert fra en generalisert kylling og attenuert i 440 kulturføringer i kyllingembryo fibroblast (CEF) kulturer. Klonal seleksjon ved 20 anvendelse av plaque final fortynningsteknikk og kontrolltester for immunogenisiteten og paramuniserings effektiviteten ble utført i jevne intervaller i løpet av attenueringsføringene. Den 440. CEF føringen var for preparering av poxviruskomponenten ifølge oppfinnelsen som igjen hadde gjennomgått klonale 25 seleksjon ifølge plakk teknikken i de endelige tre føringene for å muliggjøre arbeid med det genetiske ensartede materialet. Tabell 2 viser forskjellene mellom virusmaterialet fra tidlige og sene cellekulturføringer i relasjon i paramuniserende effektivitet.

30 CEF kulturene ble dannet ifølge en modifisert metode basert på standardteknikk som involverer dyrking av kyllingembryo i sin helhet (som inkluderer hode og innvoller); se A. Mayr, P. A. Pachmann, B. Bibrack and G. Wittmann, 1974: 'Virologische Arbeitsmethoden', vol. 1, publisert av VEB Gustav Fischer Verlag of Jena. Standardteknikken ble modifisert ved anvendelse av et totalt syntetisk medium omfattende 10% BMS (serum substiutt medium), 10% laktalbuminhydrolysat og MEM 35 (minimal essensielt medium). Monolagcellekultur, med omtrent 90% tetthet, ble inokulert med virusstamme HP1, 440. føring, infeksiositetstiter $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml. En infeksjonsdose på 10^7 TCID₅₀/100 ml ble anvendt. MEM (uten antibiotika) ble anvendt

som medium for opprettholdelse. Virus ble høstet når cellelaget var blitt transformert til en grad som er 5 til 100% virusspesifikk. Eventuelt gjenværende cellelag ble løsnet ved risting av kulturflaskene. Det virale mediet som inneholder celler ble behandlet med ultralyd for å muliggjøre at cellene som fortsatt var intakt ble brutt opp (i 3 minutter med en 40-50 watt Branson sonifier).

Prøvene ble tatt fra viruset høstet for å undersøke steriliteten og ineffektiviteten. Bare virushøstinger som var fri for kontaminasjon (for eksempel bakterier, viruser, sopp, mykoplasma) og som har et infeksionstiter som ikke er mindre enn $10^{7,25}$ /ml ble bearbeidet videre. Virushøstingene kan bli lagret ved +4 eller -80°C før de blir videre bearbeidet.

pH til viralt materiale ble justert til 8,6 før fortsatt inaktivering med β -propiolakton. β -propiolakton ble tilsatt i en konsentrasjon på 0,05%. Deretter ble reaksjonsblandingen inaktivert ved omrøring av denne i 1 time i kjøleskap, etterfulgt av 4 timer i inkubator (ved 37°C). Inaktiveringsprosessen ble avsluttet ved å sette virussuspensjonen til hvile i kjøleskap over natt. Inaktivert virussuspensjon ble rensset ved sentrifugering ved 2600 rpm. Isolert inducer ble betegnet PIND-AVI og lagret ved temperaturer på +4°C eller -6°C og lyofilisert når kontrollundersøkelsene var fullført.

Testing av resulterende attenuerte poxvirussuspensjoner for spesifisitet, renhet og sikkerhet tilfredsstilte kravene til European Pharmacopoeia med hensyn på følgende kriterier.

1. Elektronmikroskopundersøkelser ved standardmetoder viste typiske poxviruspartikler i preparatet og noen av disse var tomme. Preparatet var fritt for andre mikrobielle strukturer.
2. Standardundersøkelser for mikrobiell kontaminasjon viste at preparatet var fritt for andre viruser, bakterier, sopp og mykoplasmaer.
3. Toksisitet, teratogenitet og pyrogenitet ble testet i henhold til retningslinjene til European Pharmacopoeia og ingen positive resultater ble oppnådd.
4. Undersøkelse av ikke-inaktivert gjenværende viralt innhold: dette ble utført ved titrering av ferdig poxviruspreparat i CEF kulturer på standard måte. I de påfølgende tre føringene var det ikke noe gjenværende viralt innhold.

Paramuniseringsvirkningen av PIND-AVI poxvirus komponenten ble demonstrert ved anvendelse av VSV infeksjonsmodellen. Tabell 1 har ført opp oppnådde resultater.

5

Eksempel 2

En poxvirus komponent ifølge oppfinnelsen ble dannet fra attenuert MVA vacciniavirus i FCE kulturer som i eksempel 1. Som det fremgår av tabell 2 ble

10 paramuniseringsaktiviteten til virusstammen forsterket ved attenuering over minst 500 kulturføringer. Tester for renhet, sikkerhet, spesifisitet og effektivitet ble utført som beskrevet i eksempel 1. De samme resultatene som i eksempel 1 ble oppnådd, og disse resultatene er oppsummert i tabell 2.

15

Eksempel 3

En poxviruskomponent oppnådd fra attenuert canarypox virus, stamme KP1, ble dannet i CEF kulturer som beskrevet i eksempel 1. Det fremgår av tabell 2 at

20 paramuniseringsaktiviteten til virusstammen var forsterket ved attenuering over ikke mindre enn 390 kulturføringer. Testene for renhet, sikkerhet, spesifisitet og effektivitet ble utført som beskrevet under eksempel 1. De samme resultatene ble oppnådd som i eksempel 1, og disse resultatene er eksemplifisert i tabell 2.

25

Eksempel 4

En poxvirus komponent ifølge oppfinnelsen ble dannet fra attenuert parapoxvirus, stamme D 1701, i MA eller veroceller (permanent apenyrecellelinje) på en måte som er

30 beskrevet i eksempel 1. Det fremgår av tabell 2 at paramuniserende aktivitet til virusstammen ble forsterket ved attenuering over ikke mindre enn 170 kulturføringer. Tester for renhet, sikkerhet, spesifisitet og effektivitet ble utført som beskrevet i eksempel 1. De samme resultatene ble oppnådd som i eksempel 1.

35 Tabellene 1 og 2 oppsummerer resultatene oppnådd for individuelle komponenter (produktene ifølge eksemplene 1 til 4).

Eksempel 5

Preparering av en multipotent paramunitetsinducer innenfor betydningen av oppfinnelsen ble oppnådd i hvert tilfelle ved blanding av to av de attenuerte, inaktiverte poxvirussuspensjonene beskrevet i eksemplene 1 til 4 i et 1:1 forhold i et preparat. En blanding av poxviruskomponentene PIND-AVI og PIND-ORF, samt poxvirus komponentene avipox virus HP1 og parapox virus ORF D 1701, ble dannet. Som det fremgår av tabell 1 og figur 1 potensierer kombineringsinducerende paramuniserende effektivitet. (Dersom effekten var additiv, vil både effektivitetsindeksene til individuelle fortyninger og deres UE/ml være utforandrede). Dette vises klart ved økning i de to parametrene i det angitte tilfellet, respektivt med så mye som 20-40% (effektivitetsindeksen til kombinasjonen sammenlignet med 1:8 fortyning av henholdsvis D 1701 og HP1) og med 200-400% (UE/ml av kombinasjonen sammenlignet med henholdsvis D 1701 og HP1). Testene med hensyn på renhet, sikkerhet, spesifisitet og effektivitet ble utført som beskrevet i eksempel 1. De samme resultatene ble oppnådd som i eksempel 1 bortsett fra en øket paraspesifikk aktivitet.

Eksempel 6

Vaccinia virus, avipox virus HP1 og parapox virus ORF D1701 ble attenuert som i eksempel 1 og virkningen av attenueringen på paramuniseringsvirkningen ble sammenlignet i en test som innbefattet måling av induksjon av interferonsyntesen i mononukleære leukocytter fra perifert blod. Tabell 3 oppsummerer resultatene.

Eksempel 7

For å danne en poxvirus komponent ifølge oppfinnelsen ble suspensjoner av MVA vacciniavirus og parapox virus ORF D1701 justert til et proteininnhold på 2 mg/ml med PBS og inkubert med 1% Nonidet P-40 (NP-40; Sigma) og 50 µl 2-merkaptoetanol i 60 minutter ved 37°C. Etter underlegging av substratum med 3,5 ml av en 36% sukrosepute (w/v, i PBS) og sentrifugering i 45 minutter i en ultrasentrifuge i en Beckmann SW-60 Tr-rotor ved 40.000 rpm (230.000 g) ved 4°C ble en pellet som representerer viruskjernen oppnådd. Frakoblede viruskapper var i supernatanten.

Supernatanten ble omfattende dialysert mot PBS og deretter anvendt for å danne multipotente paramunitetsinducere ifølge oppfinnelsen.

5 Eksempel 8

For å isolere individuelle bånd av viralt protein ble 12% SDS polyakrylamidgeler dannet. Bufferene og oppløsningene som ble anvendt er beskrevet av U. K. Laemmli (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', Nature 227, s. 680 til 685 og A. Mayr, P.A. Bachmann, B. Bibrack, G., Wittmann, 1989, 'Virologische Arbeitsmethoden, Teil III: Biochemische und biophysikalische Methoden', publisert av Gustav Fischer Verlag, Jena. Suspensjoner av MVA vacciniavirus og parapoxvirus ORF D1701 ble kokt i 50 µl prøvebuffer. 50 µl porsjoner av prøvene ble applisert i hver gelkolonne og representerer en viral mengde på 10 µg pr kolonne. Deretter ble de virale proteinene separert elektroforetisk ved 50 V og 20-30 mA i omtrent 16 timer. To molekylvektsstandarder (MW SDS-70L kit og MW SDS-200 kit; fremstilt av Sigma) ble utført samtidig for å identifisere proteinene, og disse dekket et område fra 14.300 til 205.000 dalton. Etter separering ble kolonner med markørproteiner og en kolonne, hvor virale proteiner var blitt separert, spaltet ut og sølvfarget for å lokalisere markørbåndene. Gjenværende proteingel ble i mellomtiden oppbevart i elektrodebuffer ved 4°C. Ved anvendelse av sølvfarget gelstrimmel som en rettleider ble alle proteinbåndene tatt ut med skalpell fra molekylvektsområdet rundt 14 kD. I hvert tilfelle ble 6 slike gelbiter (omtrent 0,5 ml i volum) anbragt i brønnene i en Extraphor elektroforetisk konsentrator (dannet av Pharmacia LKB). De forskjellige proteinbåndene ble eluert fra gelbiter i 30 minutter ved romtemperatur og 100 V, og på samme tid presipitert i "høy-saltbuffer". Presipiterte proteiner ble fjernet, kombinert og sentrifugert i 30 minutter ved 10.000 rpm. Etter resuspending av sedimentet i 1 ml PBS og dialysering over natt ved 4°C i dialyserør med en eksklusjonsmolekylvekt på 8 kD ble preparatene sentrifugert i 30 minutter ved 10.000 rpm under sterile betingelser og deretter bearbeidet som beskrevet ovenfor for å danne multipotente paramunitetsinducere.

Eksempel 9

Forskjellige poxvirus komponenter ble utsatt for en VSV test for å sammenligne deres paramunitetsegenskaper. Poxviruskomponentene PIND-AVI og PIND-ORF, og ORF

proteinet 4D9 rensert fra cellekulturer ved anvendelse av immunitetsaffinitetskromatografi ble sammenlignet med rekombinert poxvirus PIND-AVI+ORF 4D9, hvori DNA delen kodende for ORF 4D9 polypeptidet var blitt introdusert ved homolog rekombinasjon. Som det fremgår fra tabell 4 var virkningen av multipotent paramunitetsinducer betydelig forsterket i forhold til effekten av individuelle komponenter.

Eksempel 10

Den potensierende virkningen til kombinerte multipotente paramunitetsinducere sammenlignet med effekten av individuelle komponenter ble demonstrert i kromium-51 frigjørings testen, se Mayr et al., 1986, ibid.. Sammenligningen var relatert til poxviruskomponentene PIND-AVI og ORF protein 4D9 (sistnevnte er blitt rensert fra cellesupernatanter til cellene på forhånd infisert med parapoxvirus ORF D1701) med en kombinasjon av PIND-AVI og ORF protein 4D9. Figur 2 viser oppnådde resultater.

TABELL 1

Prepareringsfortynning	Effektivitetsindeks (gjennomsnittet av minst 2 tester)					
	PIND-AVI	PIND-ORF	Kombinasjon av AVI/ORF	BCG	levamisol	C.parvum
1:4	77	93	90	21	toksisk	
1:8	47	78,5	96	0	0	toksisk
1:16	40,5	76,5	86	0	0	22
1:32	8,5	63	70	-	0	21
1:64	0	27	56	-	0	0
1:128	0	1,5	27,5	-	0	0
1:256	0	0	4	-	-	0

TABELL 2

Virus stamme	UE/ml i VSV test		
	Vill type	tidlig attenuerings- føring	sen attenuerings- føring
Vaccinia virus MVA	<20	≤40	160-320
avipox virus HPI	<20	≤40	80-160
canarypox virus KP-1	<20	≤40	160-320
parapox virus ORF D1701	<20	≤40	320-640

5

TABELL 3

Virus arter	Stamme	Inf.titer -log10 (MOI=1)	Antiviral aktivitet av mononukleære leukocytter i E.U./ml		
			menneske	sau	gris
Vacciniavirus vill-type	København	8,75	<40	<40	<40
Tidlig føring	Elstree	7,4	<40	<40	<40
	Bern	7,05	<40	<40	<40
Attenuert	MVA	8,05	160-320	80	320
Avipox virus					
Tidlig føring attenuert	HP1	7,0 6,3	<40 1280	<40 320	<40 80
Parapox virus					
Vill-type Attenuert	D1701	6,5 7,3	<40 320-640	<40 160	<40 160

TABELL 4

Inducertype	EU/ml (1:8 forfortynning)
PIND-AVI	160-320
PIND-ORF	320-640
ORF-protein 4D9	40-80
Rekombiner paramunitetsinducer PIND-AVI + ORF 4D9	1280-2560

P a t e n t k r a v

1.

Paramunitetsinducer basert på poxvirus komponenter, k a r a k t e r i -
5 s e r t v e d at paramunitetsinduceren omfatter en kombinasjon av to eller
flere poxviruskomponenter avledet fra forskjellige poxvirusstammer med
paramuniserende egenskaper.

2.

10 Paramunitetsinducer ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at poxvirus komponentene er poxviruser.

3.

15 Paramunitetsinducer ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at en eller flere av poxviruskomponentene er avipox virus HP-1, parapox virus ORF
D1701, vaccinia virus MVA eller canarypox virus KP-1, henholdsvis identifisert ved
ECACC deponeringsnummerene V94012709, V94012706, V94012707 og V94012708.

4.

20 Paramunitetsinducer ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at poxviruskomponentene er viruskapper eller variantformer av viruskapper som er blitt
oppnådd fra poxviruser.

5.

25 Paramunitetsinducer ifølge krav 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at poxvirusene er blitt inaktiverte.

6.

30 Paramunitetsinducer ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d
at poxvirusene er inaktivert ved behandling med β -propiolakton i et pH område på 8 til
9.

7.

35 Paramunitetsinducer ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at poxviruskomponentene er individuelle virale proteiner oppnådd ifølge biokjemiske
eller immunokjemiske metoder fra kulturer som er blitt infisert med poxvirusene.

8.
Paramunitetsinducer ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at poxviruskomponentene er rekombinante virale polypeptider isolert ved prokaryotisk
eller eukaryotisk ekspresjon, hvor i det minste deler derav er avledet fra en eller flere
5 virale polypeptider fra poxviruser.
9.
Paramunitetsinducer ifølge et hvilket som helst av kravene 2, 4, 5, 6, 7 eller 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at poxvirusene er friskt isolerte.
10
10.
Paramunitetsinducer ifølge et hvilket som helst av kravene 2, 4, 5, 6, 7 eller 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at poxvirusene er attenuerte.
- 15 11.
Paramunitetsinducer ifølge krav 9 eller 10, k a r a k t e r i s e r t
v e d at poxvirusene er rekombinerte.
12.
20 Fremgangsmåte for fremstilling av paramunitetsinducere, k a r a k -
t e r i s e r t v e d å kombinere to eller flere poxvirus komponenter som
er avledet fra forskjellige poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper.
13.
25 Anvendelse av paramunitetsinducere basert på kombinasjoner av poxviruskomponenter
som er avledet fra forskjellige poxvirusstammer for å danne farmasøytiske
sammensetninger.

Figure 1

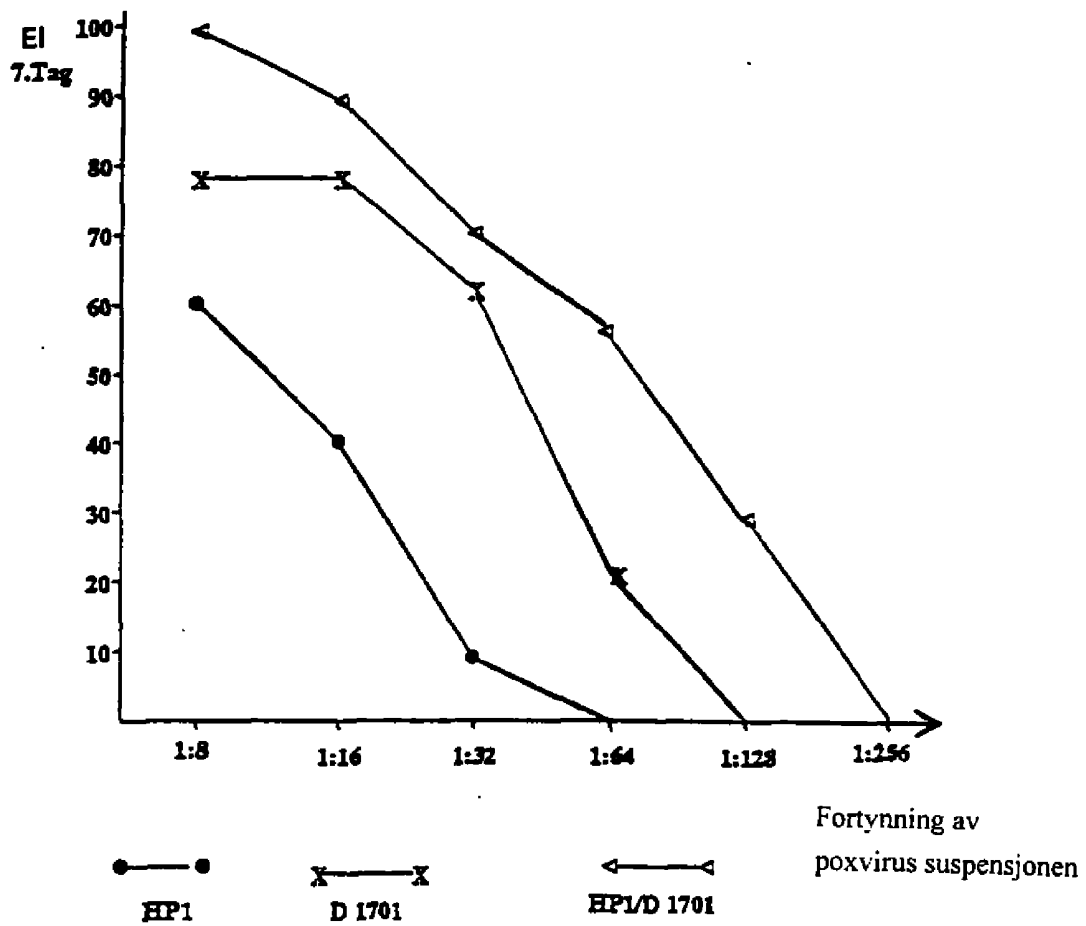


Figure 2 :

