



(12) PATENT

(19) NO

(11) 339056

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/275 (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040158	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.07.02 PCT/EP2002/07280
(22)	Inng.dag	2004.01.13	(85)	Videreføringsdag	2004.01.13
(24)	Løpedag	2002.07.02	(30)	Prioritet	2001.07.18, DK, 1122/01
(41)	Alm.tilgj	2004.01.13			
(45)	Meddelt	2016.11.07			

(73)	Innehaver	Bavarian Nordic A/S, Bøgeskovvej 9, DK-3490 KVISTGAARD, Danmark
(72)	Oppfinner	Paul Howley, Kopernikusweg 9, D-82152 Martinsried, DE-, Tyskland Karl Heller, Dorfangerweg 125, DE-85774 UNTERFÖHRING, Tyskland Ingmar Rätthe, Juttastrasse 22, DE-80636 MÜNCHEN, Tyskland
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte til å amplifisere et Chordopoxvirus.
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9522978 A1 TAN W et al. "Study of the Properties of Plaques of Recombinant Vaccinia Virus with Hepatitis B Surface Antigen Gene Inserted at TK Site". Chinese Journal of Virology, March 1990, side 12-18. DE 2734660 A1 SLONIM D et al. "Influence of the incubation temperature on the dynamics of reproduction and plaque formation of three strains of Vaccinia virus in cell cultures." JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY. CZECHOSLOVAKIA 1972, vol. 16, no. 4, 1972, pages 473-479. Drexler et al. "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells". Journal of General Virology (1998), 79, 347-352.
(57)	Sammendrag	

Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte til å produsere poxvirus, særlig Chordopoxvirus, hvori poxvirus er dyrket ved en temperatur under 37°C. Fremgangsmåten fører til en øket virusformering ved redusert temperatur.

Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte til å amplifisere Chordopoxvirus, kjennetegnet ved at viruset blir formert i kyllingembryofibroblastceller ved en dyrkingstemperatur på omtrent 26°C til 32°C, der Chordopoxviruset er et vacciniavirus valgt fra stammen Elstree og modifisert vacciniavirus Ankara (MVA), fortrinnsvis MVA-BN som deponert ved ECACC under nr. V00083008 eller et derivat derav. Fremgangsmåten fører til øket virusformering ved en redusert temperatur.

Poxvirida omfatter en stor familie av komplekse DNA-virus som replikerer i cytoplasma til vertebrat- og invertebratceller. Familien av poxvirida kan oppdeles i underfamilien chordopoxvirina (vertebrat poxvirus) og entomopoxvirina (innsektpoxvirus) (Fields Virology/red.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.; 3. utgave/ISBN 0-7817-0253-4/ se spesielt kapittel 83).

Chordopoxvirina omfatter tallrike dyrepoxvirus (klassifisert i forskjellige slekter), så som kamelpoxvirus, sauepoxvirus, geitepoxvirus eller avipoxvirus, spesielt hønsepoxvirus og også poxvirus som er av relevans for mennesker så som variolavirus og vacciniavirus.

Poxvirus, særlig chordopoxvirina, er viktige patogener hos mennesker og dyr. Det er også en lang historie med vaksinasjon mot poxvirusinfeksjoner. For nesten to århundrer siden ble mennesker profylaktisk inokulert med kukopper for å immunisere dem mot kopper. Senere immunisering ble utført med Vacciniavirus. Koppevaksinasjon med dette Vacciniavirus resulterte en gang imellom i alvorlige komplikasjoner, så som post-vaksine encefalitt, generalisert Vaccinia eller kontaktinfeksjon. Deretter ble en ny vaksine som ikke viste disse komplikasjoner utviklet av Anton Mayr. Koppevaksinen består av poxvirusmodifisert Vaccinia Virus Ankara (MVA) og ble brukt for vaksinasjon mot kopper i ca. 150000 vaksinasjoner uten å forårsake noen komplikasjoner beslektet med vaksinasjonen. Til og med barn med immunsvikter viste ingen alvorlige bivirkninger. MVA ble oppnådd ved mutasjon og seleksjon av det originale vacciniavirus Ankara etter 575 passasjer i kyllingembryofibroblastkulturer. Sikkerheten til denne MVA er reflektert i biologiske, kjemiske og fysikalske egenskaper. MVA har en redusert molekylvekt, seks delesjoner i genomet og er i stor grad dempet for pattedyrceller, dvs. DNA og protein blir syntetisert men praktisk talt ingen viruspartikler blir produsert.

Vaksinasjon mot kopper var meget vellykket. I 1979 erklærte Verdens Helseorganisasjon utryddelse av kopper. Følgelig ble massevaksinasjon av barn avbrutt og bare laboratoriearbeidere og medlemmer av de væpnede styrker i noen land blir vaksinert.

Med utryddelsen av kopper ble den viktigste årsak til koppevirusinfeksjon hos mennesker fjernet. Noen ikke-humane poxvirus har imidlertid redusert vertsspesifisitet, dvs. de forårsaker infeksjoner ikke bare i sine typiske verter (f.eks.

- for kukopper i ku), men også i andre dyr (f.eks. rotter og katter). Mennesker kan også bli infisert av denne ruten. Siden deler av populasjonen ikke lenger er immune mot koppper, kan koppevirusinfeksjoner hos dyrearter være farlige for dem. Husdyr er den viktigste infeksjonskilden for mennesker. Følgelig er vaksinasjon av husdyr
- 5 mot poxvirus av økende viktighet. I tillegg er poxvirus viktige vektorer for ekspresjon av fremmede gener, f.eks. for anvendelse som en vaksine eller for genterapi, dvs. å overføre nukleinsyresekvenser inn i en målcelle hvor de blir uttrykt. Følgelig er en effektiv og kosteffektiv produksjonsmetode for poxvirus nødvendig.
- 10 Poxvirus kan amplifiseres i forskjellige celletyper. F.eks. chordopoxvirina, særlig MVA blir amplifisert i cellekulturer av primære eller sekundære kyllingembryofibroblaster (CEF). Cellene oppnås fra embryoer av kyllingegg som er inkubert i 10-12 dager. Cellene i embryoene blir deretter dissosiert og rensset. Disse primære CEF-celler kan enten anvendes direkte eller etter én ytterligere
- 15 cellepassasje som sekundære CEF-celler. Deretter blir de primære eller sekundære CEF-celler infisert med MVA. For amplifikasjonen av MVA blir de infiserte celler inkubert i 2-3 dager ved 37°C (se f.eks. Meyer, H. et al., 1991; J. of General Virology 72, 1031 1038; Sutter et al., 1994, vaksine, vol. 12, nr. 11, 1032 1040). Skjønt andre chordopoxvirus er amplifisert i forskjellige celletyper er den samme
- 20 temperaturen på 37°C valgt i de tilfellene. F.eks. blir Vaccinia-virus som kan oppnås fra ATCC (nr. VR1354), som blir dyrket i HeLa S3 celler (humane livmorhalskarsinomceller) også inkubert i 3 dager ved 37°C (Current protocols in molecular biology 1998, kap. 16, enhet 16.16, John Wiley & Sons, Inc.). Videre blir MVA tilpasset for dyrking i Vero-celler (apenyreceller) også amplifisert ved 37°C
- 25 (PCT/EP01/02703). Selvfølgelig blir, uavhengig av celler brukt for amplifikasjon og uavhengig av arter eller stammer av chordopoxvirus, amplifikasjon av virus utført ved 37°C. Denne utvalgte temperaturen korresponderer godt med den generelle kunnskapen til en dyktig praktiker: Poxvirus nesten eksklusivt amplifisert i laboratoriene blir oppnådd fra varmblodige dyr med en kroppstemperatur på ca.
- 30 37°C. Siden chordopoxvirus er tilpasset for å vokse i nevnte dyr, blir de tilpasset for dyrking ved 37°C, dvs. de bør oppformeres mest effektivt ved 37°C.
- Av lignende årsaker blir Entomopoxvirus dyrket ved temperaturer lavere enn 37°C: kroppstemperaturen til insekter er signifikant lavere enn 37°C og avhenger i stor grad av omgivelsestemperaturen. Således i kontrast til Chrodopoxvirus blir
- 35 Entomopoxvirus adaptert til dyrking ved lavere temperaturer. US 5 721 352 og US 5 174 993 beskriver en optimal temperatur for dyrking av Entomopoxvirusartene *Amsacta moorei* Entomopoxvirus (EmEPV) på 28°C i laboratoriet. Disse patenter beskriver imidlertid ikke dyrking av Chordopoxvirus under disse temperaturbetingelser.
- 40 Videre blir produksjon av vaksiner mot andre virusinfeksjoner generelt utført ved 37°C. Bare noen meslingvaksiner blir produsert ved en lavere temperatur. I dette

- tilfellet ble en meslingvaksine, som opprinnelig ble produsert ved 37°C og som ofte forårsaker alvorlige bivirkninger, dempet ved kontinuerlig passasje av virus ved 32°C. Etter 85 passasjer av stammen ved 32°C var stammen dempet, dvs. den sykdomsforårsakende kapasitet til virus var betydelig redusert (Plotkin, Orenstein: Vaccines, 3. utgave, 230-232). I konklusjon er virus for varmblodige dyr og spesielt Vacciniavirus forventet å formeres mest effektivt ved 37°C siden de er funnet i dyr med nevnte kroppstemperatur og tilpasning til en lavere temperatur blir bare utført etter et flertall passasjer ved nevnte lavere temperatur. Videre blir tilpasning til en lavere temperatur assosiert med demping og derfor ofte med redusert reproduksjonskapasitet hos virus.
- US 5 616 487 beskriver en fremgangsmåte til å produsere et stabilisert virus, særlig et stabilisert retrovirus, ved å dyrke virusproduserende celler med et stabiliserende middel på en temperatur under 37°C. De stabiliserende midlene er lipider eller surfaktanter. Patentet beskriver spesifikt Pluronic F 68 og Lipid Konsentrat som stabiliserende midler. Lipidkonsentrat er sagt å inneholde kolesterol, torskeleverolje, Pluronic F-68, d-alfa-tokoferolacetat og Tween 80. I en alternativ utforming beskriver US 5 616 487 en fremgangsmåte til å dyrke spesifikke retrovirusproduserende celler ved en temperatur lavere enn 37°C, hvori den produserte retrovirus blir stabilisert ved å bruke en stabilisator som definert ovenfor.
- WO 95/22978 A1 angår paramunitetinducere som omfatter en kombinasjon av to eller flere poxviruskomponenter som er avledet fra forskjellige poxvirusstammer med paramuniserende egenskaper. Det er angitt en fremgangsmåte for å fremstille MVA ved temperaturer under 37°C.
- TAN W et al. "Study of the Properties of Plaques of Recombinant Vaccinia Virus with Hepatitis B Surface Antigen Gene Inserted at TK Site". Chinese Journal of Virology, March 1990, side 12-18, omhandler en studie av forholdet mellom størrelsen på plakk og virulensen til rekombinante og ikke-rekombinante vaccinia virus. Det er angitt kultivering av Tiantan stammen og WR stammen av Hepatitt B-vaccinia virus ved 32, 37 og 40°C.
- DE 27 34 660 A1 omhandler en ny virusstamme som forårsaker myxcomatose, metode for å tilveiebringe viruset og anvendelser av det. Det er omtalt kultivering av viruset ved lave temperaturer, fortrinnsvis mellom 30-35°C.
- SLONIM D et al. "Influence of the incubation temperature on the dynamics of reproduction and plaque formation of three strains of Vaccinia virus in cell cultures." Journal of hygiene, epidemiology, microbiology and immunology. Czechoslovakia 1972, vol. 16, no. 4, 1972, side 473-479 beskriver hvordan inkubasjonstemperaturen påvirker reproduksjon og plakkformasjon av tre

forskjellige vacciniavirus i cellekultur. Studien viser at replikasjonen ved temperaturer på 35,5°C, 37°C og 40°C.

- 5 Drexler et al. "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells". Journal of General Virology (1998), 79, side 347-352 omhandler kultivering av MVA ved 37°C i ulike vertsceller.

Det var en hensikt med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte til å amplifisere Chordopoxvirus som fører til et høyere utbytte av viruspartikler pr. infiserte celle.

- 10 Nevnte hensikt blir oppnådd ved en fremgangsmåte for å amplifisere et Chordopoxvirus der viruset blir formert i kyllingembryofibroblastceller ved en dyrkingstemperatur på omtrent 26°C til 32°C, der Chordopoxviruset er et vacciniavirus valgt fra stammen Elstree og modifisert vacciniavirus Ankara (MVA), fortrinnsvis MVA-BN som deponert ved ECACC under nr. V00083008 eller et
15 derivat derav.

- Det ble overraskende funnet at fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fører til svært mer effektiv amplifikasjon av virus ved en lavere temperatur (ved omtrent 26°C til 32°C) som i sin tur resulterer i et høyere virusutbytte i forhold til antall infiserte celler. Følgelig er færre celler nødvendig for å produsere samme mengde
20 virus. Dette er spesielt fordelaktig for modifisert Vaccinia Virus Ankara (MVA) siden produksjonen av CEF-celler nødvendig for MVA-amplifikasjon er arbeidskrevende og kostbar. Videre tillater reduksjon av inkubasjonstemperaturen at det spares energi under formeringsprosessen for poxvirus og følgelig sparer kostnader ved produksjonen av virus.

- 25 Betegnelsen "poxvirus" som brukt i foreliggende søknad refererer seg fortrinnsvis til poxvira fra underfamilien Chordopoxvirina (vertebrat poxvira) (Fields Virology/red.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.; 3. utgave/(ISBN 0 7817-0253-4/ se særlig kapittel 83). Betegnelsene "Chordopoxvira", "Chordopoxvirina" og "vertebrat poxvira" blir brukt om hverandre i foreliggende oppfinnelse.

- 30 Som nevnt ovenfor er Chordopoxviraene som produseres i henhold til foreliggende metode vaccinia virus stamme Elstree, og de forskjellige MVA-stammer og mest fortrinnsvis MVA-BN, deponert i ECACC under V00083008 eller derivater derav. MVA-BN og dens derivater er blitt beskrevet i detalj i PCT-søknad PCT/EP01/13628, med tittel "Modifisert Vaccinia Ankara Virus Variant".

- 35 Et "derivat" av det deponerte virus er et virus som viser essensielt de samme vekstegenskaper, spesielt den samme temperaturavhengighet som den deponerte stamme men kan være forskjellig i minst en del av sitt genom.

Fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse kan utføres med henholdsvis svekket vira og rekombinant vira.

En "svekket virus" er et virus som har opprinnelse fra en patogen virus men som ved infeksjon i vertsorganismen fører til en lavere mortalitet og/eller morbiditet sammenlignet med det ikke-svekkede foreldrevirus. Eksempler på svekkede poxvira er kjent for en person med kunnskap på området. Det svekkede Vaccinia viruset er
 5 stammen MVA, særlig stammen som er blitt deponert ved ECACC med deponeringsnummer V00083003 (se ovenfor).

Betegnelsen "rekombinant virus" refererer seg til ethvert virus som har innskutt i det virale genom et heterologt gen som ikke naturlig er en del av det virale genomet. Et heterologt gen kan være et terapeutisk gen, et gen som koder for et peptid som
 10 omfatter minst én epitop for å indusere en immunrespons, en antisens ekspresjonskassetten eller et ribosymgen. Fremgangsmåter til å konstruere rekombinante vira er kjent for en person med kunnskap på området. Poxvirusreseptoren er MVA, spesielt MVA 575 og MVA-BN (se ovenfor).

I motsetning til all tidligere lære i den kjente teknikk fant oppfinnerne av
 15 foreliggende oppfinnelse ut at av seks temperaturer mellom 26°C og 37°C amplifiserte poxvira MVA og vaccinia stamme Elstree minst effektivt ved en inkubasjons (dyrkings) temperatur på 37°C. Det ble overraskende funnet at en fremgangsmåte for amplifikasjon av MVA, fører til høyere utbytte av virus hvis de virusproduserende cellene blir dyrket ved en temperatur på omtrent 26°C til 32 °C,
 20 mest fortrinnsvis ved 30°C.

Betegnelsen "ca." i sammenheng med temperaturverdier betyr fortrinnsvis de spesifikt nevnte temperaturer og temperaturer som er opptil 0,5°C høyere eller lavere enn de spesifikt nevnte temperaturer. Ved hjelp av eksempel skal en temperatur på "ca. 30°C" tolkes som en temperatur i området fra 29,5°C til 30,5°C.
 25 Dyrking av virusproduserende celler blir fortrinnsvis utført over minst 24 timer, mer fortrinnsvis i minst to dager eller i minst tre dager. Normalt blir virusfrie celler dyrket ved 37°C inntil en tilstrekkelig cellemengde er oppnådd. Deretter blir cellekulturen inokulert med virus og temperaturen blir deretter redusert til den ovenfor angitte temperatur. I en alternativ utforming blir cellekulturen bragt til
 30 ovenstående temperatur før den er inokulert med virus.

Media brukt for dyrking av cellene før infeksjon og for produksjon av virus ved å bruke fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse kan være de samme eller forskjellige. Alle media er konvensjonelle standardmedia kjent for en person med kunnskap på området. Hvis nødvendig er det mulig å tilsette ytterligere
 35 tilsetninger så som antibiotika, ytterligere aminosyrer og/eller føtalt kalveserum.

I henhold til en foretrukket utforming inneholder media brukt i fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse ikke lipider eller surfaktanter for å stabilisere den virale lipidkappen. Mer fortrinnsvis inneholder media brukt i fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse ikke noen av de følgende stabiliserende midler:

Pluronic F-68, kombinasjon av Pluronic F-68 og Tween 80TM eller lipidkonsentrat (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, katalog nr.: 21900-014) som inneholder kolesterol, torskelleverolje, Pluronic F-68, d-alfa-tokoferolacetat og Tween 80.

- 5 Det vil være kjent for en person med kunnskap på området at Chordopoxvirusceller kan anvendes i fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse. I henhold til oppfinnelsen er typen og egenskaper til cellene ikke kritisk så lenge cellene kan infiseres med det respektive virus og så lenge som virusetterkommere blir produsert av de infiserte celler. Fortrinnsvis bør infeksjonsmultiplisiteten være lavere enn 1.

Særlig foretrukne celler er vertebratceller, f.eks. pattedyr eller fugleceller.

- 10 I henhold til en foretrukket utforming er vertebratcellene som kan anvendes i fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse for Vacciniavirusstamme Elstree og MVA, kyllingembryofibroblaster (CEF). Det var spesielt uventet at fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse kan anvendes for CEF-celler siden kylling har en normal gjennomsnittlig kroppstemperatur på 41°C. Således er
15 temperaturen anvendt i henhold til foreliggende oppfinnelse, på omtrent 26°C til 32°C, mest foretrukket på 30°C, så forskjellig fra den normale kroppstemperaturen til kylling at man ville ha forventet at disse cellene ikke kan anvendes til formering av vacciniavira ved disse temperaturer. De samme betraktninger kan anvendes for temperaturer i området fra 30°C til 32°C og særlig for temperaturen 30°C.

- 20 Videre er fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse fortrinnsvis utført i stasjonære flasker.

- En ytterligere fordel er at fremgangsmåten fører til øket utbytte med "normale" virusstammer, som ikke krever en temperatursensitiv mutasjon eller en lang og komplisert svekking til den reduserte temperatur. Med andre ord er det ikke
25 nødvendig å bruke temperatursvekkede eller temperaturfølsomme mutanter for å oppnå høyere utbytte i viruspartikler ved den lavere temperatur sammenlignet med 37°C.

- Det er kjent for temperatursvekkede virus eller temperatursensitive mutanter at de amplifiseres bedre ved lavere temperaturer; slike stammer er imidlertid normalt
30 mindre reprodukbare enn ikke-svekkede eller ikke-temperatursensitive mutanter. Derfor ligger den store fordel i fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen i det faktum at den kan anvendes til enhver type normal, meget reproduktiv virusstamme.

- Virus fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse blir fortrinnsvis brukt som en vaksine eller for å fremstille en sammensetning brukt i en genterapiprotokoll. Slike
35 anvendelser av poxvirus er vel etablert på området.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1

I fig. 1 er enkeltverdier fra eksperiment 1 utført i duplikat (representert som prikker). Søylar representerer gjennomsnittsverdier. For enkeltverdier sammenlign tabell 1.

Fig. 2

I fig. 2 er enkeltverdi fra eksperiment 2 utført i duplikat (representert som prikker). Søylar representerer gjennomsnittsverdier. For enkeltverdier sammenlign tabell 2.

Fig. 3

I fig. 3 er prikker enkeltverdier fra eksperimenter med fire forskjellige temperaturer (eksperiment 3) utført i duplikat. Søylar representerer gjennomsnittverdier. For enkeltverdier sammenlign tabell 3.

Fig. 4

I fig. 4 er prikkene enkeltverdier fra eksperimenter med fire forskjellige temperaturer (eksperiment 4) utført i duplikat. Søylene representerer gjennomsnittsverdier. For enkeltverdier sammenlign tabell 4.

Fig. 5

I fig. 5 representerer søylar gjennomsnittsverdier av eksperimenter utført i triplikat ved 30°C og 37°C. For enkeltverdier sammenlign tabell 5.

Eksempler

De videre eksempler illustrerer oppfinnelsen ytterligere.

Eksempel 1: Virkning av temperaturen på formering av MVA

Cellekulturbetingelser

Primære CEF-celler ble sådd i stasjonære flasker med en såcelletetthet på 2×10^7 CEF-celler/185 cm². Celler ble sådd i VP-SFM +4mM L-glutamin og 1 % antibiotika/antimykotika. På dag fire etter såing ble en celletetthet på 5×10^7 CEF-celler/185 cm² antatt. Cellene ble infisert med 0,1 TCID₅₀/celle MVA-BN (deponert ved ECACC under deponeringsnr. V00083008) ved å bruke RPMI w/o FCS.

Infeksjonen, etterfulgt av inkubasjon i 72 timer, ble utført ved 30°C og 37°C (i eksperiment 1 og 2 med to forskjellige CEF-preparater), ved 30, 33, 35 og 37°C (eksperiment 3) og 26, 28, 30 og 33°C (eksperiment 4). Eksperimentene ble utført i duplikat for hver temperatur. Virusreplikasjon ble stoppet ved å skrape cellene inn i mediet og ved å fryse media og celler sammen ved -20°C. Denne blandingen ble frosset/tint ytterligere to ganger for mekanisk å frigjøre virus fra cellene. For eksperimentene med fire forskjellige infeksjonstemperaturer ble virusreplikasjon

stoppet ved å fryse stasjonære flasker ved -20°C . Denne blandingen ble fryst/tint ytterligere tre ganger for mekanisk å frigjøre virus fra cellene.

- Virustiter fra hver stasjonær flaske ble bestemt ved å bruke et immunohistokjemisk assay. Infiserte celler ble farget med et Vaccinavirus-spesifikt antistoff. Dernest ble et HRP-koblet antistoff rettet mot Vaccinavirusantistoffet tilsatt. Etter tilsetning av et substrat ble infiserte celler blå eller brunfarget. Evaluering av assayet ble gjort ved å bruke formelen til Spearman og Kaerber som bestemmer $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (vevskulturinfeksiøs dose). Eksperimenter blir utført i duplikat. Som et aksepteringskriterie for titreringsresultater ble MVA-BN standard med kjent titer brukt som internkontroll for hvert titreringseksperiment. Resultater fra eksperimentene ble bare tatt når verdiene fra MVA-BN-standardene ikke avviker mer enn $+0,5$ logg fra det totale gjennomsnitt.

Resultater

- For å inkludere mulige vekstvariasjoner av primære CEF-celler ble eksperimenter utført med to forskjellige cellepreparater når infeksjonstemperaturene 30°C og 37°C skulle sammenlignes. Resultatene fra de to uavhengige infeksjonseksperimentene er vist i tabell 1-2 og fig. 1-2.
- Resultatene fra eksperimentene 1 og 2 viser en klar økning i virusutbytte ved 30°C sammenlignet med 37°C . I eksperiment 1 ble det oppnådd en økning på $0,5$ logg og i eksperiment 2 en økning på ca. $0,7$ logg.

Tabell 1: I tabell 1 er verdier fra eksperiment 1 vist.

	Viral titer [$\text{TCID}_{50}/\text{ml}$] ved 30°C	Viral titer [$\text{TCID}_{50}/\text{ml}$] ved 37°C
Flaske a	$7,50\text{E}+07$	$3,20\text{E}+07$
Flaske b	$1,30\text{E}+08$	$3,20\text{E}+07$
Gjennomsnittlig verdi	$1,00\text{E}+08$	$3,20\text{E}+07$

Tabell 2: I tabell 2 er verdier fra eksperiment 2 vist.

	Viral titer [$\text{TCID}_{50}/\text{ml}$] ved 30°C	Viral titer [$\text{TCID}_{50}/\text{ml}$] ved 37°C
Flaske a	$1,30\text{E}+08$	$3,20\text{E}+07$
Flaske b	$1,30\text{E}+08$	$2,40\text{E}+07$
Gjennomsnittlig verdi	$1,30\text{E}+08$	$2,70\text{E}+07$

Dataene fra de første to eksperimenter er meget lovende, idet en økning av utbyttet av MVA kan oppnås ved å senke inkubasjonstemperaturen etter infeksjon. Derfor ble det besluttet å fortsette å prøve også andre temperaturer for å finne en optimal infeksjonstemperatur. De anvendte temperaturer var 30, 33, 35 og 37°C. Resultatene fra dette eksperimentet er vist i tabell 3 og fig. 3.

Sammenligning av utbyttene ved 37°C og lavere infeksjonstemperaturer (35, 33, 30°C) viste en klar økning ved lavere temperaturer. Det beste virustiter [TCID₅₀/ml] ble oppnådd i dette eksperimentet med en infeksjonstemperatur på 30°C, som var 0,8 logg høyere sammenlignet med 37°C.

Tabell 3: I tabell 3 er det vist virustiter [TCID₅₀/ml] oppnådd ved 30, 33, 35 og 37°C.

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 33°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 35°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 37°C
Flaske a	1,30E+08	5,60E+07	3,20E+07	3,20E+08
Flaske b	1,30E+08	1,00E+08	7,50E+07	1,30E+07
Sammenlignings- verdi	1,30E+08	7,50+07	4,90E+07	2,10E+07

I det neste eksperiment i stasjonære flasker ble til og med lavere temperaturer enn 30°C testet for å se om 30°C virkelig er den optimale temperatur for mangfoldiggjørelse av MVA i CEF-celler. Derfor ble 26, 28, 30 og 33°C anvendt. Resultatene fra dette eksperimentet er vist i tabell 4 og fig. 4.

Tabell 4: I tabell 4 er det virustiter [TCID₅₀/ml] oppnådd ved 26, 28, 30 og 33°C.

	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 26°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 28°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 30°C	Virustiter [TCID ₅₀ /ml] ved 33°C
Flaske a	3,20E+07	1,00E+08	4,20E+08	1,80E+08
Flaske b	1,00E+08	1,80E+08	2,40E+08	1,00E+08
Sammenlignings- verdi	5,60E+07	1,30+08	3,20E+08	1,30E+08

Det høyeste utbyttet i dette eksperimentet ble funnet ved en inkubasjonstid etter infeksjon på 30°C. Sammenligning av dataene fra eksperimentet tidligere (fire temperaturer mellom 30 og 37°C) og dette ble 30°C identifisert som den optimale temperatur for inkubasjon etter infeksjon for mangfoldiggjørelse av MVA på CEF-celler i stasjonære flasker.

Ved analyse av virustiter ved de enkelte temperaturer fra disse to eksperimenter ble det klart at inkubasjon ved 37°C kan til og med gi det laveste virusutbyttet av de seks brukte temperaturer. Den observerte orden vedrørende utbytter ved de brukte temperaturer er følgende:

30°C > 33°C/28°C > 35°C/26°C > 37°C.

Eksempel 2: Virkning av temperatur på formering av Vacciniavirusstamme Elstree

I en annen tilnærming ble Vacciniavirusstammen Elstree testet i tillegg til MVA-BN for temperaturavhengighet. MVA-BN og Elstree ble formert på CEF-celler. For eksperimentet ble primære CEF-celler sådd i stasjonære flasker med en såcelletetthet på $2E+07$ CEF-celler/175 cm². Celler ble sådd i kulturmedia +4mM L-glutamin og 1 % antibiotika/antimykotika. På dag fire etter såing ble en celletetthet på $5E+07$ CEF-celler/175 cm² antatt. Cellene ble infusert med 0,1 TCID₅₀/celle MVA-BN ved å bruke henholdsvis RPMI w/o FCS og Elstree. Infeksjonen etterfulgt av en inkubasjon i 72 timer ble utført ved 30°C og 37°C. Eksperimentet ble utført i triplikat for hver temperatur. Virusreplikasjon ble stoppet ved å fryse stasjonære flasker ved -20°C. Denne blandingen ble frosset/tint ytterligere tre ganger for mekanisk å frigjøre virus fra cellene. Virustiter fra hver stasjonær flaske ble bestemt ved titrering i henhold til SOP/MVA/04. Som et aksepteringskriterie for titreringsresultater ble MVA F6 standard med kjent titer brukt som en internkontroll for hvert titreringseksperiment. Resultatet fra eksperimentene ble bare godtatt når verdiene fra MVA F6 standarden ikke avvok mer enn $\pm 0,5$ logg.

Resultatene fra infeksjonseksperimentene er vist i tabell 5 og i fig. 5.

Dataene fra eksperimentet med MVA-BN viser en klar økning i virusutbyttet ved 30°C sammenlignet med 37°C (0,667 logg). I eksperimentene med Elstree ble det funnet en økning på 1,125 logg ved 30°C sammenlignet med 37°C.

Tabell 5: I tabell 5 er det vist virustiter [logg10 TCID₅₀/ml] oppnådd ved 30 og 37°C for MVA-BN og Vaccinavirusstamme Elstree

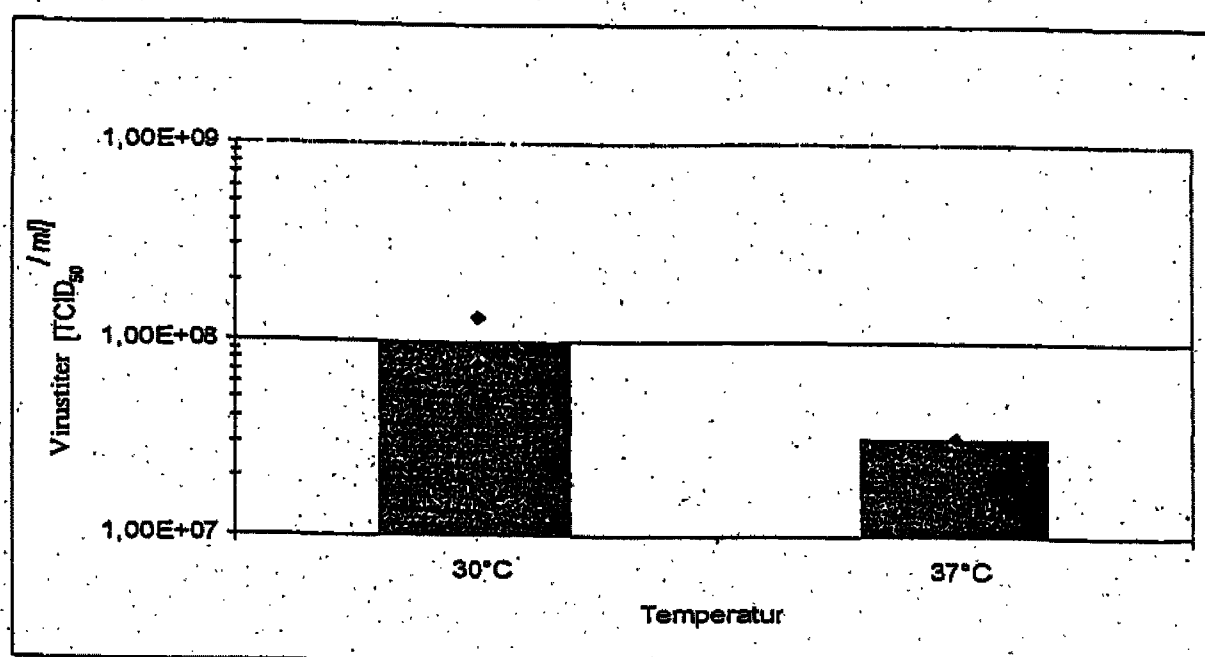
	MVA 30°C	MVA 37°C	Elstree 30°C CEF-celler	Elstree 37°C CEF-celler
Flaske a	9,0	7,88	7,25	6,375
Flaske b	8,0	8,0	8	6,5
Flaske c	8,25	7,38	7,5	6,5
Gjennomsnittlig verdi	8,42	7,75	7,583	6,458

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte til å amplifisere et Chordopoxvirus,
karakterisert ved at Chordopoxvirus blir formert i
kyllingembryofibroblastceller ved en dyrkingstemperatur på omtrent 26°C til
5 omtrent 32°C, der Chordopoxviruset er et vacciniavirus valgt fra stammen Elstree
og modifisert vacciniavirus Ankara (MVA), fortrinnsvis MVA-BN som deponert
ved ECACC under nr. V00083008 eller et derivat derav.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at Chordopoxvirus er formert ved en
10 dyrkingstemperatur på ca. 30°C.
3. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-2,
karakterisert ved at virusformering blir utført i minst 24 timer.
4. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-3,
karakterisert ved at virusdyrking blir utført i minst 2-3 dager.
- 15 5. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-4,
karakterisert ved at Chordopoxvirus er et virus som er nyttig som en
vaksine eller genterapeutisk vektor.
6. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-5,
karakterisert ved at fremgangsmåten blir utført i en stasjonær flaske.
- 20 7. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-6,
karakterisert ved at poxvirus ikke er et temperatursensitivt mutant virus.
8. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-7,
karakterisert ved at poxvirus ikke er et temperatursvekket virus.
9. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-8,
25 karakterisert ved at ingen lipider eller surfaktanter blir tilsatt
dyrkingsmediet.

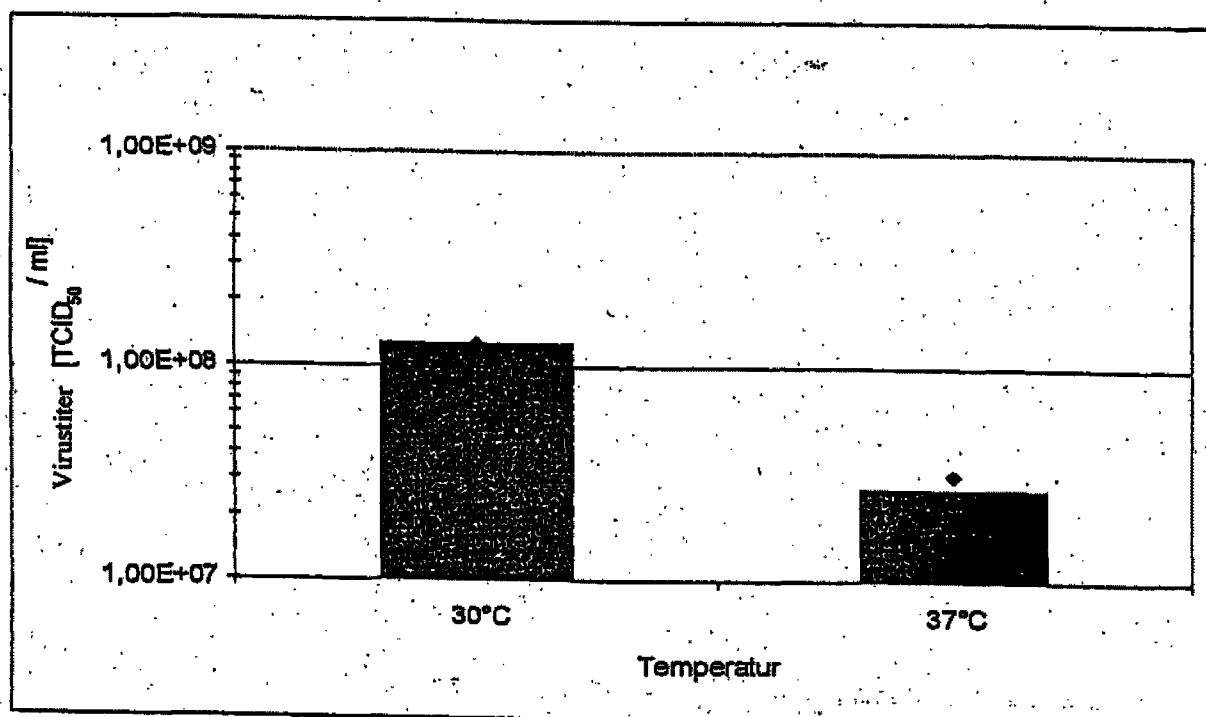
1/5

Fig. 1



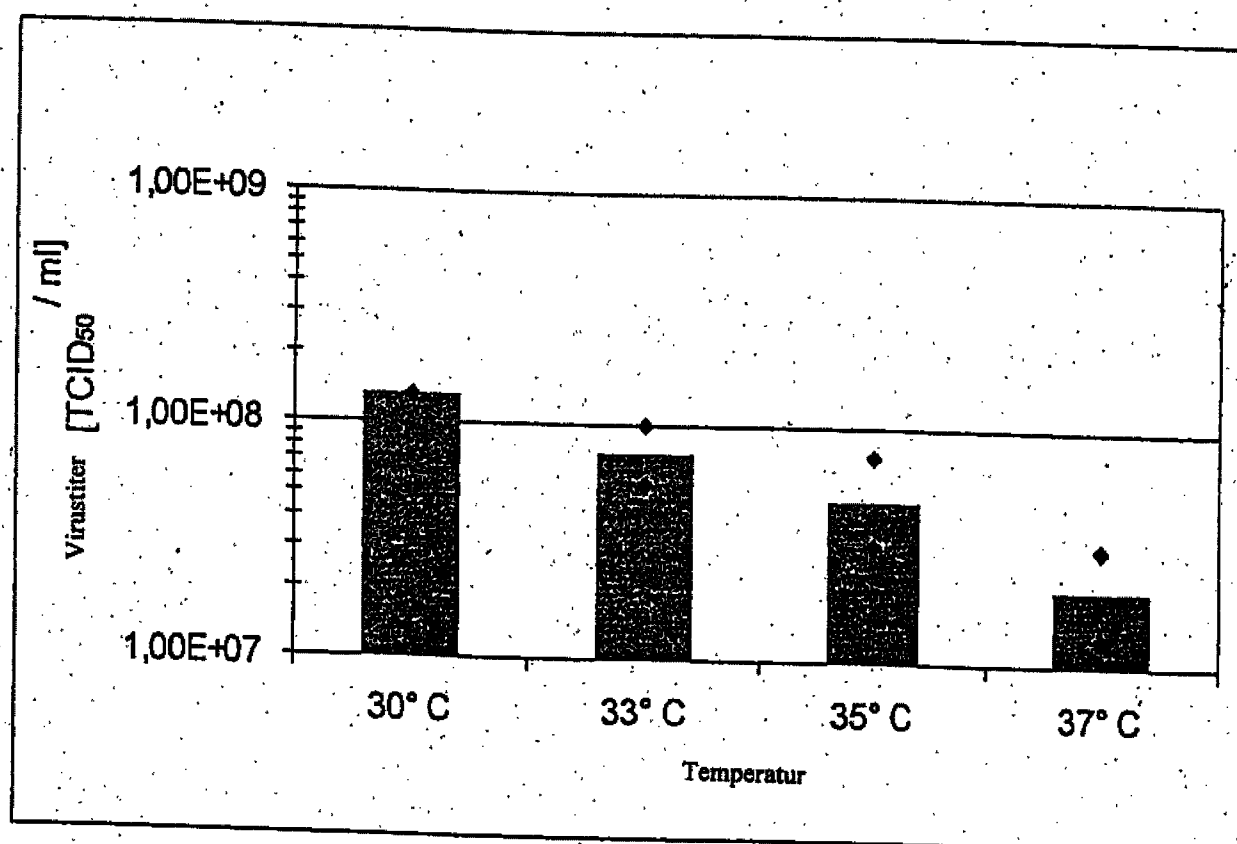
2/5

Fig. 2



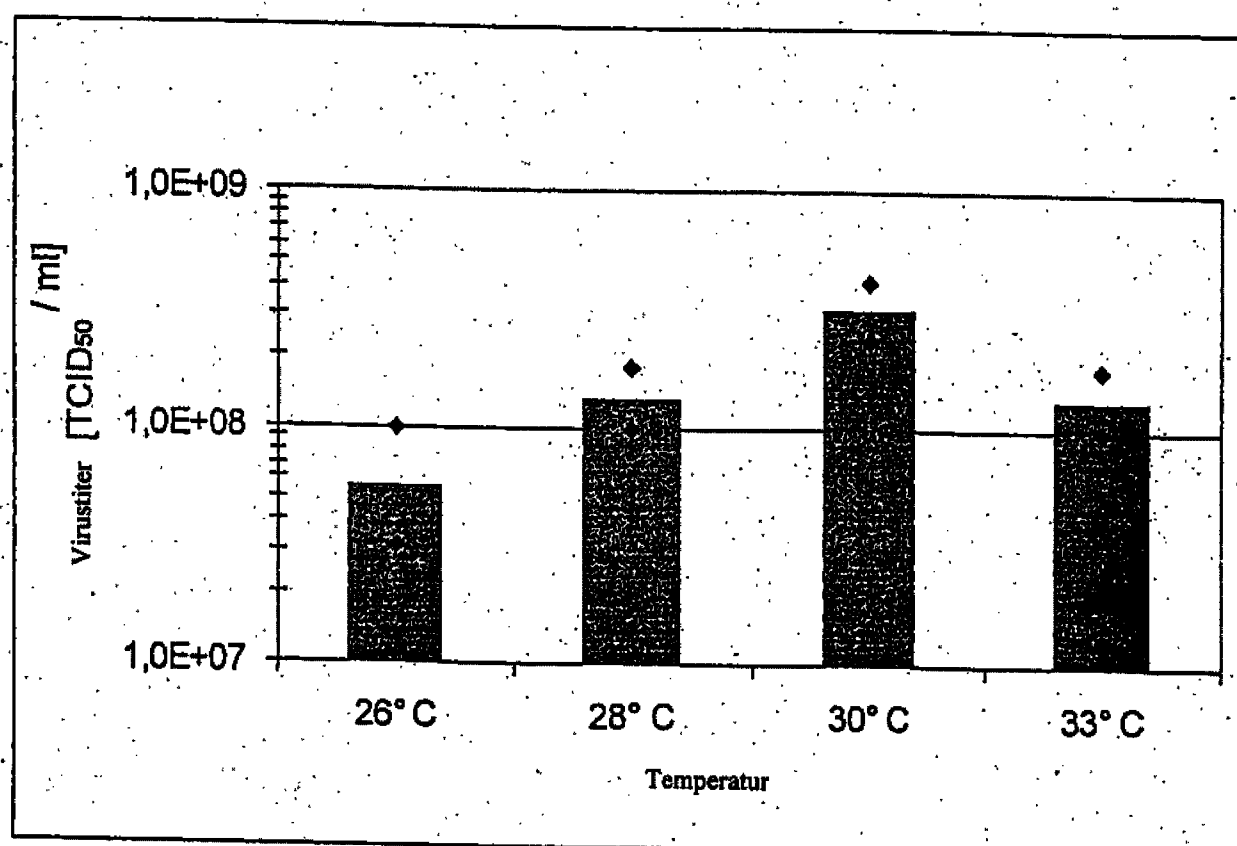
3/5

Fig. 3



4/5

Fig. 4



5/5

Fig. 5

