

Настоящее изобретение относится к способу выделения поксвирусов, а в частности модифицированного вируса коровьей оспы Анкара (MVA), из инфицированных клеток. В соответствии с настоящим изобретением инфицированные поксвирусом клетки подвергают гомогенизации при высоком давлении с получением гомогената, содержащего поксвирус. Поксвирусодержащий гомогенат может быть подвергнут по крайней мере одной стадии очистки с получением обогащенной поксвирусом фракции. Настоящее изобретение также относится к поксвирусодержащей фракции и поксвирусодержателю гомогенату, полученному способом настоящего изобретения.

Уровень техники

Вирусы Poxviridae представляют собой большое семейство сложных ДНК-вирусов, которые реплицируются в цитоплазме клеток позвоночных и беспозвоночных. Семейство поксвирусов может быть разделено на подсемейство хордопоксвирусов (поксвирусов позвоночных) и энтомопоксвирусов (поксвирусов насекомых).

Хордопоксвирусы включают несколько поксвирусов животных (классифицированных по их происхождению), имеющих важное экономическое значение, такие как вирус оспы верблюдов, вирус оспы овец, вирус оспы коз или вирус оспы птиц, а в частности вирус оспы домашней птицы. Для вакцинации крупного рогатого скота против оспы овец и коз может быть использован "живой" аттенуированный вирус и инактивированные вакцины. Для вакцинации домашней птицы были разработаны рекомбинантные вакцины с использованием вируса оспы домашней птицы в качестве вектора. Поскольку вирус оспы домашней птицы инфицирует человеческие клетки, то было высказано предположение, что он может быть также использован в качестве вектора для экспрессии гетерологичных генов у человека и для индуцирования соответствующего иммунного ответа. Вирусы оспы домашней птицы, содержащие в своем геноме гены ВИЧ, описаны в патентах США №5736368 и №6051410.

Наиболее важным поксвирусом для человека, несомненно, является вирус натуральной оспы, принадлежащий к роду ортопоксвирусов. Вирус коровьей оспы, также принадлежащий к роду ортопоксвирусов семейства Poxviridae, был использован в качестве живой вакцины для иммунизации против натуральной оспы. Успешная вакцинация вирусом коровьей оспы, проводимая во всем мире, привела к полному уничтожению вируса натуральной оспы (The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication; History of Public Health, No 4, Geneva: World Health Organization, 1980). Согласно декларации, принятой ВОЗ (WHO), вакцинация была приостановлена на многие годы, за исключением людей, подвергающихся значительному риску инфицирования поксвирусом (например, сотрудников, работающих в лабораториях). В настоящее время снова возрос интерес к программам по вакцинации, что вызвано риском, который возникает из-за возможности использования вируса натуральной оспы в бактериологической войне или в качестве биологического оружия террористами.

Совсем недавно вирусы коровьей оспы были использованы в целях конструирования вирусных векторов для экспрессии рекомбинантных генов и для возможного их использования в качестве рекомбинантных живых вакцин. (Mackett, M., Smith G.L. & Moss, B. [1982] P.N.A.S. USA 79, 7415-7419; Smith G.L., Mackett, M. & Moss, B. [1984] Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2, 383-407). Это позволяет получить ДНК-последовательности (гены), кодирующие чужеродные антигены, вводимые в геном вирусов коровьей оспы с помощью методов рекомбинантных ДНК. Если данный ген интегрируется в сайте вирусной ДНК, который не играет решающей роли в жизненном цикле этого вируса, то можно снова продуцировать рекомбинантный вирус коровьей оспы, который будет инфекционным, то есть можно с уверенностью сказать, что он будет способен инфицировать чужеродные клетки, а значит и экспрессировать интегрированную ДНК-последовательность (патентные заявки EP № 83286 и № 110385). Эти рекомбинантные вирусы коровьей оспы, полученные таким способом, могут быть использованы, с одной стороны, в качестве живых вакцин для профилактики инфекционных заболеваний и, с другой стороны, для получения гетерологичных белков в эукариотических клетках.

Использование вируса коровьей оспы в качестве вектора для разработки рекомбинантных живых вакцин связано с проблемами безопасности и контроля. Большинство из рекомбинантных вирусов коровьей оспы, описанных в литературе, было получено на основе штамма Western Reserve вируса коровьей оспы. Известно, что этот штамм обладает высокой нейровирулентностью, а поэтому он является мало подходящим для человека и животных. (Morita et al., Vaccine 5, 65-70 [1987]). С другой стороны, известно, что модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA) является абсолютно безопасным. MVA был генерирован путем длительного серийного пассирования штамма вируса коровьей оспы Анкара (CVA) на фибробластах куриного эмбриона (см. Mayr, A., Hochstein-Minitzel, V. & Stickl H. [1975] Infection 3, 6-14; патент Швейцарии № 568392). Примерами штаммов вируса MVA, депонированных в соответствии с требованиями Будапештского договора, являются штаммы MVA 572, MVA 575 и MVA-BN, депонированные в Европейской коллекции культур клеток животных (ECACC), Salisbury (UK) под регистрационными номерами ECACC V94012707, ECACC V00120707 и ECACC V00083008, соответственно. MVA отличается тем, что он является в высокой степени аттенуированным, то есть он имеет низкую вирулентность или инфекционность, но при этом сохраняет хорошую иммуногенность. Вирус MVA был проанализирован на изменения в его геноме по сравнению со штаммом CVA дикого типа. Было иденти-

фицировано (Meyer H. Sutter G. & Mayr A. [1991] J. Gen. Virol. 72, 1031-1038) шесть основных делеций геномной ДНК (делеция I, II, III, IV, V и VI), имеющей всего 31000 пар оснований. По своему кругу хозяев полученный вирус MVA строго ограничивается клетками птиц. Кроме того, MVA отличается своей очень высокой аттенуацией. При тестировании на различных животных-моделях, было подтверждено, что MVA является авирулентным даже у животных с иммуносупрессией. И что более важно, превосходные свойства штамма MVA были продемонстрированы в широких клинических испытаниях (Mayr et al., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B. 167, 375-390 [1987], Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392. [1974]). Во время этих исследований, проводимых с участием свыше 120000 человек, включая пациентов с высоким риском инфицирования, каких-либо побочных эффектов, ассоциированных с использованием MVA-вакцины, обнаружено не было. Рекомбинантный MVA, используемый в качестве вакцин, уже был сконструирован и применен в клинических испытаниях. В WO 98/13500 описан рекомбинантный MVA, содержащий и способный экспрессировать одну или несколько ДНК-последовательностей, кодирующих антигены вируса денге. Чужеродные ДНК-последовательности были подвергнуты рекомбинации в вирусную ДНК в сайте природной делеции в геноме MVA.

Перед использованием поксвирусов или рекомбинантных поксвирусов для вакцинации необходимо очистить данный вирус до определенной степени, так чтобы он удовлетворял нужным требованиям. Традиционный способ очистки поксвирусов, а в частности MVA и рекомбинантного MVA, заключается в следующем: в первой стадии культивируют клетки, восприимчивые к инфицированию соответствующим поксвирусом. В случае MVA такими восприимчивыми клетками являются, например, фибробласты куриных эмбрионов. Указанные восприимчивые клетки инфицируют поксвирусом и культивируют в течение определенного периода времени, достаточного для генерирования вирусного потомства. Затем клетки замораживают и оттаивают для отделения этих клеток от поверхности культурального флакона и для частичного разрушения клеток. Смесь интактных и разрушенных клеток центрифугируют. Для получения гомогената используют ультразвук. Вирус выделяют из гомогената путем центрифугирования с сахарозной "подушкой" (Joklik W.K. "The purification of four strains of poxvirus" Virology 1962; 18:9-18). Ключевой стадией в этом процессе является гомогенизация с использованием ультразвука (Hedstrom K.G. & Lindberg, U.Z. Immun. Forsch. 1969, 137:421-430; Stickl H. Korb, W. & Hochstein-Minitzel, V., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. (1970), 215, 38-50). В промышленном применении предпочтительно, чтобы все стадии процессов были легко регулируемы и воспроизводимы. Однако недостаток использования ультразвука для гомогенизации суспензии вируса и клеток заключается в том, что стадия обработки ультразвуком трудно поддается идентичному воспроизведению, трудно регулируется и трудно поддается масштабированию при переходе от лабораторных процессов к промышленному производству.

Цель настоящего изобретения

Таким образом, целью настоящего изобретения является разработка способа выделения поксвирусов, а в частности вирусов коровьей оспы, таких как штамм MVA, из инфицированных поксвирусом клеток, где способ гомогенизации инфицированных клеток является воспроизводимым, легко регулируемым и поддающимся масштабированию при переходе от лабораторных процессов к промышленному производству.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к способу выделения поксвирусов, а в частности вирусов коровьей оспы, таких как штамм Elstree или модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA), из инфицированных клеток. В соответствии с настоящим изобретением способ выделения поксвируса из инфицированных клеток включает стадию гомогенизации инфицированных клеток при высоком давлении с получением поксвирусодержащего гомогената.

Неожиданно было обнаружено, что интактные и инфекционные поксвирусы могут быть выделены способом настоящего изобретения. Гомогенизация при высоком давлении обычно используется для деструкции клеточных и субклеточных структур в целях выделения белков или липидов из эукариотических и прокариотических клеток. В патенте США № 3983008 описан способ экстракции подходящих компонентов из микробных клеток посредством гомогенизации при высоком давлении. Экстрагированными соединениями были дрожжевые белки, бактериальные ферменты и дрожжевые липиды. В DE 19918619 описано применение гомогенизации высокого давления для выделения HbsAg из дрожжевых клеток. В патенте США № 4255521 описан способ экстракции глюкозоизомеразы из клеток микроорганизмов путем выделения при высоком давлении. Гомогенизация при высоком давлении также была использована для выделения вирусоподобных частиц (VLP) из рекомбинантного *Saccharomyces cerevisiae* (Milburn & Dunnill (1994) *Biotechnology and Bioengineering* 44, 736-744) и для продуцирования и очистки аденовирусных векторов (патент США № 6194191). VLP и аденовирусы не имеют оболочки и представляют собой довольно небольшие и простые вирусы, которые, тем самым, имеют сходство со структурами клеточных белков. Поэтому не был неожиданным тот факт, что гомогенизация при высоком давлении, подходящая для выделения белков из клеток, может быть также использована для выделения аденовирусов и VLP из эукариотических клеток. В противоположность этому, внутриклеточные зрелые вирионы поксвирусов (IMV, см. ниже, Fields et al., *Fields Virology*, 1996, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, USA, ISBN 0-7817-0253-4, chapter 83, pages 2654-5) имеют очень сложную морфологию, которая включа-

ет *inter alia*, липидные мембраны. В некоторых аспектах поксвирусы IMV по своей морфологии и физическим свойствам более близки к клеткам, чем вирусы, не имеющие оболочки. Следовательно, было высказано предположение, что условия, используемые для разрушения клеток путем гомогенизации при высоком давлении, должны также приводить к деструкции поксвирусов. Таким образом, неожиданным оказался тот факт, что гомогенизация при высоком давлении разрушает клетки, но позволяет получить достаточное количество интактных поксвирусов, которые могут быть затем очищены. Другими словами, не следует предполагать, что гомогенизация при высоком давлении может быть использована в способе выделения поксвирусов из инфицированных клеток. Действительно, в известном методе выделения поксвирусов из инфицированных клеток для гомогенизации используется ультразвук, что делает такой способ гомогенизации более мягким.

В отличие от методов выделения с использованием ультразвука, способ настоящего изобретения позволяет осуществлять воспроизводимую гомогенизацию инфицированных клеток; причем такой способ является легко регулируемым и может быть масштабирован при переходе от лабораторных процессов к промышленному производству.

В контексте настоящего изобретения термин "поксвирус" означает любой вирус, принадлежащий к семейству *Poxviridae*. Способ настоящего изобретения предпочтительно осуществляют с использованием поксвирусов, принадлежащих к подсемейству *chordoroxvirinae*, более предпочтительно к роду *orthoroxvirus*, *aviroxvirus*, *sarpiroxvirus* и *suiproxvirus*. Наиболее предпочтительно, настоящее изобретение относится к способу выделения и очистки поксвирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса коровьей оспы, вируса оспы коз, вируса оспы овец, вируса оспы канареек и вируса оспы домашней птицы. Наиболее предпочтительным является вирус коровьей оспы. Примерами штаммов вируса коровьей оспы, используемых в способе настоящего изобретения, являются штаммы Elstree, Wyeth, Copenhagen, Temple of Heaven, NYCBH, Western Reserve. Настоящее изобретение не ограничивается этими конкретно упомянутыми штаммами вируса коровьей оспы, и вместо них может быть использован любой штамм вируса коровьей оспы. Предпочтительным примером штамма вируса коровьей оспы является модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA). Типичным штаммом MVA является MVA 575, который был депонирован в Европейской коллекции культур клеток животных под регистрационным номером ECACC V00120707. Наиболее предпочтительным является MVA-BN или его производное. MVA-BN был описан в WO 02/42480 (PCT/EP01/13628). В указанных Международных заявках описаны биологические анализы, позволяющие определить, является ли штамм MVA штаммом MVA-BN или его производным, а также методы, позволяющие получить MVA-BN или его производное. Содержание этой заявки вводится в настоящее описание посредством ссылки. Штамм MVA-BN был депонирован в Европейской коллекции культур клеток животных под регистрационным номером ECACC V00083008.

Выделяемыми вирусами могут быть нативные вирусы, аттенуированные вирусы или рекомбинантные вирусы.

Термин "рекомбинантный вирус" означает любой вирус, имеющий встроенный в его вирусный геном гетерологичный ген, который в природе не является частью этого вирусного генома. Гетерологичным геном может быть терапевтический ген; ген, кодирующий антиген или пептид, содержащий по крайней мере один эпитоп для индуцирования иммунного ответа; антисмысловой экспрессионный кластер или ген рибозима. Методы получения рекомбинантных вирусов известны специалистам. Гетерологичный ген предпочтительно встраивают в неосновную область вирусного генома. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты встраивают в природный делеционный сайт генома MVA (как описано в PCT/EP96/02926).

Термин "аттенуированный вирус" означает вирус, который после инфицирования организма хозяина приводит к снижению уровня смертности и/или заболеваемости по сравнению с неаттенуированным родительским вирусом. Примером аттенуированного вируса коровьей оспы является штамм MVA, в частности MVA-575 и MVA-BN.

Известно, что поксвирусы, такие как вирус коровьей оспы, существуют в двух различных формах: поксвирус, присоединенный к клеточным мембранам в цитоплазме инфицированных клеток (внутриклеточные зрелые вирионы (IMV)) и вирусы, которые были экстернализованы (внеклеточные вирионы с оболочкой (EEV)) (Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith G.L. "Intercellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms" *J. Gen. Virol.* (1998), 79, 877-887). Оба IMV и EEV являются инфекционными вирусами, но имеют морфологические различия, поскольку EEV содержит дополнительную липопротеиновую оболочку. В нормальных условиях частицы IMV присутствуют в большем количестве, чем EEV, но в способе настоящего изобретения могут быть получены частицы обоих типов.

Исходными материалами для проведения стадии гомогенизации настоящего изобретения являются клетки, инфицированные соответствующим поксвирусом. Термин "инфицированные клетки", используемый для определения исходного материала, предназначенного для гомогенизации в соответствии с настоящим изобретением, означает интактные клетки, инфицированные соответствующим вирусом, а также части и фрагменты инфицированных клеток, к которым присоединен соответствующий поксвирус или смесь интактных клеток и лизированных/разрушенных клеток. Примерами части и фрагмента инфици-

цированных клеток являются клеточные мембраны разрушенных/лизированных клеток, к которым присоединен соответствующий поксвирус. Исходный материал может также содержать свободные вирусные частицы, которые не присоединены к клеточной мембране и не находятся внутри клеток.

Для получения инфицированных клеток, которые представляют собой исходный материал для осуществления способа настоящего изобретения, эукариотические клетки инфицируют соответствующим поксвирусом. Эукариотическими клетками являются клетки, восприимчивые к инфицированию соответствующим поксвирусом и способные реплицировать и продуцировать инфекционный вирус. Такие клетки, подходящие для всех поксвирусов, известны специалистам. Для MVA и штамма Elstree вируса коровьей оспы, примером клеток такого типа являются фибробласты куриного эмбриона (CEF) (Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V. and Sutter G. "Highly attenuated modified vaccinia Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells" *J. Gen. Virol.* (1998), 79, 347-352). Клетки CEF могут быть культивированы в условиях, известных специалистам. Предпочтительно, клетки CEF культивируют в бессывороточной среде в неподвижных колбах или роллер-флаконах. Инкубирование предпочтительно осуществляют в течение 48-96 ч при $37\pm 2^\circ\text{C}$. Инфицирование поксвирусами предпочтительно осуществляют при множественности заражения (m.o.i.) 0,05 для 1 TCID₅₀, а инкубирование предпочтительно осуществляют в течение 48-72 ч при $37\pm 2^\circ\text{C}$.

За процессом инфицирования можно наблюдать по цитопатогенным эффектам (CPE), которые обычно проявляются заметным округлением инфицированных клеток.

Настоящее изобретение позволяет выделять поксвирусы, такие как Elstree или MVA, из инфицированных клеток. Термин "выделение" означает способ настоящего изобретения, который предусматривает разрушение инфицированных поксвирусом клеток и/или отделение поксвирусов от клеточных мембран, с которыми они обычно связываются так, чтобы можно было проводить последующую очистку поксвируса. Так, например, продукт выделения поксвирусов из инфицированных клеток (называемый в настоящей заявке "поксвирусодержащим гомогенатом") представляет собой гомогенную смесь свободного поксвируса и клеточного дебриса, содержащего лишь небольшое количество интактных неразрушенных клеток и вируса, связанного с клеточными мембранами.

Если инфицированными клетками являются клетки, которые могут быть культивированы в суспензионной культуре, то такие инфицированные клетки могут быть легко собраны центрифугированием.

Если инфицированные клетки являются более или менее интактными связанными клетками, то они должны быть собраны, то есть удалены из культурального флакона, а затем подвергнуты гомогенизации при высоком давлении. Такие методы хорошо известны специалистам. Подходящими методами являются механические методы (например, использование резинового скребка для соскоба клеток), физические методы (например, замораживание при температуре ниже -15°C и оттаивания культуральных флаконов при температуре выше 15°C) или биохимические методы (обработка ферментами, например трипсином для отделения клеток от культурального флакона). Если для этих целей используются ферменты, то время инкубирования должно регулироваться, поскольку эти ферменты могут также повреждать вирус в процессе инкубирования.

В способе настоящего изобретения, инфицированные клетки, а более конкретно, собранные инфицированные клетки, подвергают последующей стадии гомогенизации при высоком давлении. В настоящем описании термин "гомогенизация высокого давления" иногда сокращенно обозначается "ГВД". Гомогенизация высокого давления имеет двойной эффект. С одной стороны, гомогенизация высокого давления приводит к разрушению интактных клеток. Например, вирусы IMV высвобождались и становились доступными для последующей очистки. С другой стороны, гомогенизация высокого давления способствует отделению поксвирусов от клеточных мембран или, по крайней мере, снижению размера агрегатов "клеточная мембрана-вирус". Такая гомогенизация также упрощает процедуру последующей очистки поксвируса.

Каждый специалист знаком с общим принципом гомогенизации высокого давления (White M.D., Marcus D., "Disintegration of microorganisms", *Adv. Biotechnol. Processes* 1988, 8:51-96). Системы ГВД основаны на использовании высокого давления, прилагаемого к образцу, подаваемому через небольшое фиксированное отверстие при высокой скорости, в регулируемых и воспроизводимых условиях. В настоящем описании термины "фильера", "отверстие" или "сопло" являются взаимозаменяемыми.

Главным элементом каждого клеточного дезинтегратора является дезинтегрирующая головка. Эта дезинтегрирующая головка, предпочтительно, состоит из (I) камеры/цилиндра высокого давления, (II) поршня высокого давления, который входит в камеру и тем самым увеличивает давление в указанных камере/цилиндре, и (III) сопла/фильеры, через которые выталкивается содержимое камеры. Выталкиваемое содержимое камеры направляется на нужную поверхность, такую как образец металла, который предпочтительно имеет теплопередающую поверхность, подверженную охлаждению. Для сбора дезинтегрированного содержимого камеры эту систему снабжают устройством для сбора дезинтегрированного образца (называемым "камерой-сборником"). Типичным устройством для гомогенизации высокого давления является Basic Z+ от Constant Cell Disruption Systems (Low March, Daventry, Northants, NN114SD, United Kingdom).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения для осуществления разрушения клеток с использованием системы для гомогенизации высокого давления проводят три стадии. (I) Образец вводят в цилиндр/камеру высокого давления. Затем в указанные цилиндр/камеру подают высокое давление. Для этого поршень высокого давления опускается. (II) Затем этот поршень проталкивает образец через сопло при высокой скорости. Быстрый перенос образца из области высокого давления в одну из зон низкого давления приводит к разрушению клеток. (III) Затем этот образец достигает цели и радиально распределяется по охлажденной теплопередающей поверхности. После этого продукт попадает в камеру-сборник. Гидравлическое устройство перезагружают и цикл продолжают.

По окончании этого процесса, выходящий гомогенат собирают в соответствующий сосуд в зависимости от объема.

Для выделения поксвирусов в соответствии с настоящим изобретением, сопло должно иметь диаметр в пределах 0,10-0,6; 0,15-0,6; 0,15-0,50 мм, а предпочтительно в пределах 0,15-0,40; 0,20-0,50; более предпочтительно 0,20-0,40 мм и наиболее предпочтительно 0,25-0,35 мм. Примерами наиболее предпочтительных диаметров являются диаметры 0,25 и 0,35 мм.

Давление в камере/цилиндре высокого давления, устанавливают в пределах 200-1000 бар, предпочтительно 400-1000; 200-800 бар, более предпочтительно 400-800; 600-1000 бар, еще более предпочтительно 600-900 бар и наиболее предпочтительно 700-900 бар. Наиболее предпочтительным давлением является давление в 800 бар.

Температура гомогената на выходе предпочтительно не должна превышать 25°C, а предпочтительно она должна быть ниже 15°C, а наиболее предпочтительно ниже 10°C.

Способ настоящего изобретения может быть масштабирован почти линейно и может быть осуществлен как периодический или как непрерывный процесс.

В периодическом способе каждая партия гомогенизуемых клеток может быть подвергнута одной или нескольким стадиям гомогенизации при высоком давлении. Предпочтительно, каждую партию подвергают стадиям гомогенизации от одного до трех раз, а наиболее предпочтительно только один раз.

Эффективность данной стадии гомогенизации может быть предпочтительно оценена путем определения титра вируса (эквивалентного числу инфекционных вирусных частиц, измеряемому либо в виде инфицирующей дозы в культуре ткани (TCID₅₀) либо в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)) исходного материала, определенного выше, и материала, полученного после проведения стадии гомогенизации. Другими словами, титр вируса определяют до и после гомогенизации высокого давления. Исходный материал содержит более или менее интактные клетки и довольно высокий процент крупных агрегатов, включающих частицы поксвируса, связанные с клеточными мембранами. Если такой материал используется для определения титра вируса, то полученный титр будет ниже, чем фактическое число инфекционных частиц. Это обусловлено тем, что тест-системы, используемые для определения вирусного титра, обычно представляют собой системы клеточных культур (такие как система, описанная в примере 2), в которых подсчитывают число инфицированных клеток или число бляшек. С использованием такой системы невозможно отличить положительный результат, который определяется инфицированием клетки только одной вирусной частицей, от результата, полученного при инфицировании клеток, например, крупным агрегатом вирусов, связанных с клеточными мембранами. После гомогенизации при высоком давлении поксвирусы отделяются от клеточных мембран и/или размер агрегатов "клеточная мембрана - вирус" значительно снижается, что приводит к увеличению числа более мелких агрегатов. Если этот материал используется для определения титра, то полученные результаты имеют более высокие значения, даже, если фактическое количество инфекционных вирусных частиц не изменяется. Таким образом, эффективность данной гомогенизации предпочтительно определяется, по крайней мере, по равным или более высоким значениям TCID₅₀/мл (аббревиатура "TCID" означает "инфицирующая доза для культуры ткани") гомогената по сравнению с исходным материалом. В разделе "Примеры" подробно описано определение величины TCID₅₀/мл. Альтернативно, качество и эффективность гомогенизации при высоком давлении могут быть определены с помощью электронной микроскопии.

Для дополнительной очистки полученный гомогенат подвергают по крайней мере одной стадии очистки, в результате чего получают обогащенную поксвирусом фракцию. В соответствии с настоящим изобретением эти стадии могут быть осуществлены применительно к гомогенату, содержащему вирус коровьей оспы, в том случае, если необходима последующая очистка указанного вируса коровьей оспы.

Стадия очистки, *inter alia*, может включать:

периодическое центрифугирование (например, с использованием сахарозных "подушек") или непрерывное ультрацентрифугирование (в градиенте сахарозы) (Hilfenhaus, J., Kohler R. & Gruschau, H., J. Biol. Stand. (1976) 4, 285-293; Madalinski W., Bankovski, A. & Korbecki, M., Acta Virol. (1977), 21, 104-108),

ультрафильтрацию (например, фильтрацию в поперечном потоке с использованием мембраны с размером пор более, чем 500 кДа, но равном или составляющем менее чем 0,1 мкм),

колоночную хроматографию (например, ионообменную, гидрофобную, эксклюзионную по размерам или комбинированную хроматографию) (Hedstrom K.G. & Lindberg, U.Z. Immun. Forsch. 1969, 137:421-430; Stickl H. Korb, W. & Hochstein-Minitzel, V., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. (1970), 215, 38-50) или

комбинацию всех вышеуказанных методов (Masuda N. Ellen, R.P. & Grove, D.A. J. Bacteriol. (1981), 147(3), 1095-1104).

Объем настоящего изобретения включает также любые другие методы очистки, известные специалистам.

Предпочтительной стадией очистки является стадия ультрафильтрации. Наиболее предпочтительно ультрафильтрацию проводят путем фильтрации в поперечном потоке. Принцип фильтрации в поперечном потоке известен специалистам. См., например, Richards, G.P. and Goldmintz, D., J. Virol. Methods (1982), 4(3), pages 147-153. "Evaluation of a cross-flow filtration technique for extraction of polioviruses from inoculated oyster tissue homogenates".

Хотя одна стадия очистки может оказаться достаточной для удовлетворения требованиям Регулирующих органов, касающимся биофармацевтических продуктов, однако для получения еще более чистого продукта могут быть объединены две или более из вышеупомянутых стадий очистки.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения первой стадией очистки является фильтрация в поперечном потоке, а за ней следует по крайней мере одна стадия колоночной хроматографии. Наиболее предпочтительной стадией колоночной хроматографии является ионообменная или гидрофобная хроматография.

Полученную обогащенную вирусом фракцию необязательно лиофилизируют. Методы лиофилизации известны специалистам. (Day J. and McLellan M., Methods in Molecular Biology (1995), 38, Humana Press, "Cryopreservation and freeze-drying protocols").

Настоящее изобретение также относится к обогащенной поксвирусом фракции и/или к поксвирусо-содержащему гомогенату, полученному способом выделения поксвирусов настоящего изобретения, то есть способом, который включает стадию гомогенизации инфицированных клеток при высоком давлении. В частности, настоящее изобретение относится к обогащенной поксвирусом фракции, полученной путем выделения/очистки способом настоящего изобретения, то есть способом, в котором поксвирусо-содержащий гомогенат, полученный посредством ГВД, подвергают по крайней мере одной стадии очистки. Поксвирусом может быть любой поксвирус, определенный выше. В частности, поксвирусом настоящего изобретения является вирус коровьей оспы, например любые его штаммы, которые являются подходящими для вакцинации, в частности штамм Elstree или модифицированный вирус коровьей оспы Анкара, а наиболее предпочтительно MVA-BN.

Поксвирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная поксвирусом фракция, полученные способом настоящего изобретения, который включает стадию ГВД, отличается тем, что они имеют очень высокое отношение свободного поксвируса IMV и поксвируса EEV. Термин "свободный IMV" относится к вирусам IMV, которые были отделены от клеточных мембран после, до или во время дизрупции инфицированных клеток, и которые поэтому могут быть подвергнуты дальнейшей очистке. Во всех промышленных способах получения поксвирусов исходный материал содержит инфицированные клетки, а также супернатант культуры. Таким образом, исходный материал содержит поксвирусы IMV, присутствующие в инфицированных клетках, а также поксвирусы, которые, главным образом, присутствуют в супернатанте. Известные методы разрушения клеток с последующей гомогенизацией (например, с использованием ультразвука) не дают такого эффективного разрушения клеток и/или отделения поксвирусов IMV от клеточного дебриса, как гомогенизация высокого давления. Другими словами, большинство IMV остаются связанными с клеточными мембранами и дебрисом. Таким образом в этих методах отношение свободного IMV к EEV будет ниже, чем отношение, получаемое в способе настоящего изобретения. В методе с использованием ультразвука это отношение значительно не меняется в процессе проведения последующих стадий очистки, поскольку клеточный дебрис, в котором еще остаются связанные IMV, обычно удаляется. В отличие от известных методов очистки поксвирусов способ выделения настоящего изобретения дает очень эффективное разрушение инфицированных клеток и очень эффективное отделение IMV от клеточных мембран. Таким образом, общее количество свободных IMV, которые становятся доступными для последующей очистки, превышает количество, полученное в уже известных методах, а следовательно и отношение свободных поксвирусов IMV к поксвирусам EEV, получаемое в способе настоящего изобретения, будет выше.

Поксвирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная поксвирусом фракция, полученные способом настоящего изобретения, могут быть использованы в качестве вакцин.

Если поксвирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная поксвирусом фракция содержат немодифицированные поксвирусы или аттенуированные поксвирусы, такие как штаммы вируса коровьей оспы Elstree или MVA, они могут быть использованы для вакцинации против инфекций, вызываемых поксвирусами. Например, вирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная вирусом фракция, которые содержат вирусы коровьей оспы, такие как штамм Elstree или MVA, а в частности MVA-BN, могут быть использованы в качестве вакцины против натуральной оспы.

Если поксвирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная поксвирусом фракция содержат поксвирус, который включает и экспрессирует один или несколько гетерологичных генов, то поксвирусо-содержащий гомогенат и/или обогащенная поксвирусом фракция могут быть, кроме того, использованы

для вакцинации животных, включая человека, против белка, экспрессируемого таким(и) гетерологичным(и) геном(ами).

Для изготовления вакцины поксвирусоносительный гомогенат и/или обогащенную поксвирусом фракцию, полученные способом настоящего изобретения, получают в физиологически приемлемой форме. Это может быть осуществлено исходя из существующей практики получения вакцин на основе поксвирусов, используемых для вакцинации против натуральной оспы (как описано Stickl, H. et al. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). Так, например, поксвирусоносительный гомогенат и/или обогащенную поксвирусом фракцию хранят при -80°C с титром 5×10^8 TCID₅₀/мл, приготовленным примерно в 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, pH 7,4. Для получения вакцинных препаратов для инъекций, например, при TCID₅₀ вируса = 10^3 - 10^9 , этот вирус лиофилизуют в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) в присутствии 2% пептона и 1% человеческого альбумина в ампуле, а предпочтительно в стеклянной ампуле. Альтернативно, эти вакцинные препараты могут быть получены путем поэтапной лиофилизации указанного вируса в препарате. Этот препарат может содержать дополнительные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактозу или поливинилпирролидон, либо другие добавки, такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, альбумин человеческой сыворотки), подходящие для введения *in vivo*. Типичный вирусосодержащий препарат, подходящий для лиофилизации, содержит 10 мМ Трис-буфера, 140 мМ NaCl, 18,9 г/л декстрана (MW 36000-40000), 45 г/л сахарозы, 0,108 г/л моногидрата монокальевой соли L-глутаминовой кислоты, pH 7,4. Затем стеклянную ампулу герметично закрывают, после чего ее можно хранить при температуре в пределах от 4°C до комнатной температуры в течение нескольких месяцев. Однако, эту ампулу, до того как она может понадобиться, предпочтительно хранить при температуре ниже -20°C .

Для вакцинации лиофилизированный или высушенный замораживанием продукт может быть растворен в 0,1-0,5 мл водного раствора, а предпочтительно физиологического раствора или Трис-буфера, и введен либо системно, либо местно, то есть парентерально, внутримышечно или каким-либо иным способом введения, известным практическому врачу. Способ введения, доза и число введений может быть соответствующим образом оптимизировано самим специалистом. Для поксвирусных векторов наиболее предпочтительным является подкожное или внутримышечное введение.

Настоящее изобретение также относится к способу вакцинации животных, включая человека, предусматривающему инокуляцию животного, включая человека, нуждающегося в этом, поксвирусоносительным гомогенатом и/или обогащенной поксвирусом фракцией, полученными способом настоящего изобретения.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение, *inter alia*, включает нижеследующие аспекты, взятые отдельно или в комбинации друг с другом.

Способ выделения поксвируса из инфицированных клеток, включающий стадию гомогенизации инфицированных клеток при высоком давлении с получением поксвирусоносительного гомогената.

Вышеописанный способ отличается тем, что указанный поксвирус выбран из группы, состоящей из ортопоксвирусов, вирусов оспы птиц, вирусов оспы свиней и вирусов оспы коз.

Вышеописанный способ отличается тем, что указанный поксвирус выбран из группы, состоящей из вируса коровьей оспы, вируса оспы коз, вируса оспы овец, вируса оспы канареек и вируса оспы домашней птицы.

Вышеописанный способ отличается тем, что указанным вирусом коровьей оспы является модифицированный штамм вируса коровьей оспы Анкара (MVA), а в частности MVA-BN, депонированный под регистрационным номером ECACC V00083008.

Вышеописанный способ отличается тем, что указанным поксвирусом является рекомбинантный поксвирус.

Вышеописанный способ отличается тем, что гомогенизацию при высоком давлении осуществляют путем введения инфицированных клеток в камеру высокого давления, повышения давления в указанной камере и вывода указанных инфицированных клеток через сопло.

Вышеописанный способ отличается тем, что давление в указанной камере увеличивают до значения в пределах 200-1000 бар.

Вышеописанный способ отличается тем, что сопло имеет диаметр в пределах от 0,10 до 0,6 мм.

Вышеописанный способ отличается тем, что поксвирусоносительный гомогенат подвергают по крайней мере одной стадии очистки с получением обогащенной поксвирусом фракции.

Вышеописанный способ отличается тем, что по крайней мере одной стадией очистки является стадия ультрафильтрации.

Вышеописанный способ отличается тем, что указанной ультрафильтрацией является фильтрация в поперечном потоке.

Вышеописанный способ отличается тем, что в указанной стадии фильтрации в поперечном потоке используют мембрану, имеющую размер пор более чем 500 кДа, но равную или составляющую менее чем 0,1 мкм.

Вышеописанный способ отличается тем, что после указанной ультрафильтрации осуществляют по крайней мере одну стадию колоночной хроматографии.

Вышеописанный способ отличается тем, что полученные поксвирусодержащий гомогенат или обогащенную поксвирусом фракцию подвергают лиофилизации.

Поксвирусодержащий гомогенат или обогащенная поксвирусом фракция, полученные способом, определенным выше.

Поксвирусодержащий гомогенат или обогащенная поксвирусом фракция, используемые в качестве вакцины.

Применение вышеописанных поксвирусодержащего гомогената или обогащенной поксвирусом фракции для получения вакцины.

Способ вакцинации животного, включая человека, нуждающихся в этом, отличающийся тем, что в организм указанного животного вводят поксвирусодержащий гомогенат или обогащенную поксвирусом фракцию или вакцину, определенные выше.

Описание чертежа

Клетки CEF, инфицированные MVA-BN, подвергают циклу замораживания-оттаивания и получают суспензию "вирус-клетка". Титр вируса в этой суспензии определяют как описано в примере 2 без дополнительной очистки указанной суспензии "вирус-клетка" ("О-значение"). Суспензию "вирус-клетка" подвергают гомогенизации известным специалистам методом с использованием ультразвука ("Sonifier") или гомогенизации способом настоящего изобретения ("ГВД"), описанным в примере 1. На стадии ГВД, давление составляет 800 бар, а сопло имеет диаметр 0,25 мм. По окончании стадии гомогенизации снова определяют титр вируса.

Примеры.

Нижеследующие примеры более подробно иллюстрируют настоящее изобретение. Для каждого специалиста очевидно, что приведенные ниже примеры не должны рассматриваться как ограничение применения технологии настоящего изобретения, описанной в данном примере.

Пример 1. Гомогенизация суспензий "поксвирус-клетка" с использованием гомогенизатора высокого давления.

Фибробласты куриного эмбриона (CEF), культивируемые в роллер-флаконах, инфицировали MVA-BN (ECACC V00083008). Инфицированные клетки подвергали замораживанию и оттаиванию, в результате чего получали суспензию "вирус-клетка".

В гомогенизатор Basic Z+, поставляемый Constant Cell Disruption Systems (Low March, Daventry, Northants, NN114SD, United Kingdom), загружали 50 мл неочищенной суспензии "вирус-клетка" для каждой партии. Для достижения оптимальных условий гомогенизации проводили тесты, где использовали сопла диаметром в пределах от 0,18 до 0,40 мм и подавали давление в пределах от 200 до 1000 бар. Неочищенную суспензию подвергали гомогенизации при высоком давлении один, два или три раза.

Гомогенизатор использовали в соответствии с инструкциями производителей. Оценку этого способа осуществляли путем мониторинга титра, как описано в примере 2.

Предварительные исследования показали, что диаметры фильеры, составляющие более чем 0,4 мм, не оказывали положительного влияния на результаты гомогенизации. Если диаметры сопла составляли 0,18; 0,25 и 0,35 мм, то наилучшие результаты были получены только после обработки суспензии "вирус-клетка" под давлением в 800 бар. При этих условиях какого-либо значительного отличия в титрах не наблюдалось.

Способ настоящего изобретения сравнивали со способом непосредственной обработки выходящего потока ультразвуком, известным из предшествующего уровня техники. Результаты представлены на чертеже. По сравнению с ультразвуковой обработкой способ настоящего изобретения позволяет получить более высокий титр вируса и достичь лучшей гомогенности суспензии, а поэтому он является более подходящим для осуществления последующей обработки.

Пример 2. Титрование модифицированного вируса коровьей оспы Анкара (MVA).

Титрование модифицированного вируса коровьей оспы Анкара (MVA) осуществляли анализом, основанном на определении TCID₅₀ с использованием 10-кратных разведений в 96-луночном планшете. В конечной точке титрования в этом анализе инфицированные клетки визуализировали с использованием антитела против вируса коровьей оспы и соответствующего окрашивающего раствора.

2-3-дневные первичные клетки CEF (фибробласты куриных эмбрионов) разводили до плотности 1×10^5 клеток/мл в 7% RPMI. 10-кратные разведения были сделаны в 8 повторностях для разведений. После разведения в 96-луночные планшеты высевали 100 мкл клеточной культуры на лунку. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и в 5% CO₂.

Приготавливали 10-кратные разведения вирусосодержащих растворов (10^{-1} - 10^{-12} , по необходимости) с использованием среды-RPMI, не содержащей фетальной телячьей сыворотки. Затем в лунки с клетками добавляли 100 мкл образца каждого вируса. 96-луночные планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 5 дней для инфицирования клеток и репликации вируса.

Через 5 дней после инфицирования клетки окрашивали антителом против вируса коровьей оспы. Для детекции специфического антитела использовали "второе" антитело, конъюгированное с пероксида-

зой хрена (HRP). MVA-специфическим антителом является кроличье поликлональное антитело против вируса коровьей оспы, класса IgG. (Quartett, Berlin, Germany # 9503-2057). "Вторым" антителом является HRP-конъюгированное поликлональное козье антитело против кроличьих IgG (Promega, Mannheim, Germany, # W4011). Реакцию окрашивания проводили известными методами.

Каждую лунку с клетками, которые были положительными по реакции окрашивания, помечали как положительную для вычисления TCID₅₀.

Титр вычисляли по формуле Spearman [1] и Kaerber [2]. Поскольку все параметры анализа являются постоянными, то может быть использована следующая упрощенная формула:

$$\text{титр вируса [TCID}_{50}\text{/мл]} = 10^{[a+1,5+x_a/8+x_b/8+x_c/8]},$$

где а = кратность разведения последней колонки планшета, в которой все восемь лунок являются положительными,

x_a - число положительных лунок в колонке а+1,

x_b - число положительных лунок в колонке а+2,

x_c - число положительных лунок в колонке а+3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения поксвируса из инфицированных клеток, включающий стадию гомогенизации инфицированных клеток при высоком давлении с получением поксвируссодержащего гомогената.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный поксвирус выбран из группы, состоящей из ортопоксвирусов, вирусов оспы птиц, вирусов оспы свиней и вирусов оспы коз.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный поксвирус выбран из группы, состоящей из вируса коровьей оспы, вируса оспы коз, вируса оспы овец, вируса оспы канареек и вируса оспы домашней птицы.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанным вирусом коровьей оспы является штамм Elstree или модифицированный штамм вируса коровьей оспы Анкара (MVA), а в частности MVA-BN, депонированного под регистрационным номером ЕСАСС V00083008.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанным поксвирусом является рекомбинантный поксвирус.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что в нем гомогенизацию при высоком давлении осуществляют путем введения инфицированных клеток в камеру высокого давления, повышения давления в указанной камере и вывода указанных инфицированных клеток через сопло.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что давление в указанной камере увеличивают до значения в пределах от 200 до 1000 бар.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что сопло имеет диаметр в пределах от 0,10 до 0,6 мм.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что сопло имеет диаметр в пределах от 0,10 до 0,6 мм.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что поксвируссодержащий гомогенат подвергают по крайней мере одной стадии очистки с получением обогащенной поксвирусом фракции.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что по крайней мере одной стадией очистки является стадия ультрафильтрации.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанной ультрафильтрацией является фильтрация в поперечном потоке.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что на указанной стадии фильтрации в поперечном потоке используют мембрану, имеющую размер пор более чем 500 кДа и равную или составляющую менее чем 0,1 мкм.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что после ультрафильтрации осуществляют по крайней мере одну стадию колоночной хроматографии.

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что полученные поксвируссодержащий гомогенат или обогащенную поксвирусом фракцию подвергают лиофилизации.

16. Обогащенная поксвирусом фракция или поксвируссодержащий гомогенат, полученные способом по любому из пп.1-15.

17. Обогащенная поксвирусом фракция или поксвируссодержащий гомогенат по п.16, используемые в качестве вакцины.

18. Применение обогащенной поксвирусом фракции или поксвируссодержащего гомогената по п.16 для получения вакцины.

19. Способ вакцинации животного, включая человека, нуждающихся в этом, отличающийся тем, что в организм указанного животного вводят обогащенную поксвирусом фракцию или поксвируссодержащий гомогенат по п.16 или вакцину по п.17.

