



HU000228691B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **228 691**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

- (21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 00120**
- (22) A bejelentés napja: **2001. 03. 10.**
- (40) A közzététel napja: **2003. 05. 28.**
- (45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 05. 28.**
- (51) Int. Cl.: **C12N 7/08** (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 392/75 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C12N 158/63 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
- (86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám: **PCT/EP 01/02703**
- (87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 0168820**

(30) Elsőbbségi adatok: PA 2000 00410 2000. 03. 14. DK	(73) Jogosult(ak): Bavarian Nordic A/S, Kvistgard (DK)
(72) Feltaláló(k): Mayr, Anton, Starnberg (DE)	(74) Képviselő: dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Módosított Ankara vaccinia vírus (MVA) megváltoztatott törzse**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát a módosított Ankara vaccinia vírus (MVA) megváltoztatott törzsei képezik, melyek a legtöbb emlőssel - különösen az emberekkel - szemben erősen lecsökkent virulenciát mutatnak, viszont képesek szaporodni terápiás ágensek - például vakcinák - termelésére jóváhagyott folytonos sejtvonalak sejtjeiben. A találmány tárgyát képezi egy eljárás is a találmány szerinti MVA törzsek termelésére.

A találmány szerinti MVA törzsek alkalmazhatók például parenterális immunizációra, vektor rendszer részeként vagy aktív illetve inaktívált formájában mint adjuváns, vagy mint az immunrendszer nem-specifikus komponenseinek szabályozója.



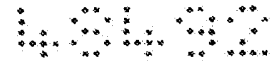
Módosított Ankara vaccinia vírus (MVA)

megváltoztatott törzse

A találmány tárgyát a módosított Ankara vaccinia vírus (MVA) megváltoztatott törzsei képezik, melyek a legtöbb emlőssel - különösen az emberekkel - szemben erősen lecsökkent virulenciát mutatnak, viszont képesek szaporodni terápiás ágensek - például vakcinák - termelésére jóváhagyott folytonos sejtvonalak sejtjeiben. A találmány tárgyát képezi egy eljárás is a találmány szerinti MVA törzsek termelésére.

A találmány szerinti MVA törzsek alkalmazhatók például parenterális immunizációra, vektor rendszer részeként vagy aktív illetve inaktivált formájában mint adjuváns, vagy mint az immunrendszer nem-specifikus komponenseinek szabályozója.

Egy élő szervezet folyamatosan kihívásnak van kitéve olyan fertőző ágensek részéről, mint például a baktériumok, vírusok, gombák vagy paraziták. Az immunrendszer védi meg az élő szervezetet az ezen ágensek okozta állandó fertőzéstől a fertőző ágensek és az ezek által termelt bármely toxikus molekula elpusztítása illetve eltávolítása útján. Az immunrendszer specifikus és nem-specifikus részre osztható, bár mindkét rész szoros kapcsolatban van egymással. A nem-



specifikus immunválasz azonnali védelmet biztosít az idegen anyagok és fertőző ágensek széles körével szemben. Ezzel szemben a specifikus immunválasz egy késleltetési fázis után jön létre, amikor az élő szervezet első ízben találkozik egy anyaggal. Azonban a specifikus immunválasz nagymértékben hatékony. A specifikus immunválasz felelős azért a jelenségért, hogy egy egyed, amikor helyrejön egy specifikus fertőzésből, védetté válik az adott specifikus fertőzéssel szemben ám továbbra is fogékony más fertőző betegségekre. Általánosságban egy második fertőzés ugyanazzal a fertőző ágenssel - vagy ahhoz nagyon hasonló fertőző ágenssel - sokkal enyhébb tüneteket okoz, vagy egyáltalán nem okoz tüneteket. Az immunitás hosszú ideig megmarad, néhány esetben ez élethosszig is terjedhet. Ezt az immunológiai memóriát használjuk fel a védőoltásokban, amikor az élő szervezetet a fertőző ágens ártalmatlan vagy inaktivált formájával érintkeztetjük, hogy specifikus immunitást váltsunk ki. Egyes esetekben adjuvánsokat is hozzáadunk a vakcinákhoz, hogy növeljük a specifikus immunválaszt.

A fertőző betegségekről és az immunitásról szerzett tudásunk nagy részét a himlő tanulmányozásának köszönhetjük. A betegséget a variola vírus okozza, az Orthopox vírusok nemzetségének tagja. Csaknem két évszázaddal ezelőtt tehénhimlővel végzett megelőző oltásokat kezdtek, ami a himlő elleni immunizációt eredményezte. Később az immunizációt a vaccinia vírussal végezték. Az 1950-es évek elején sok ipari ország felszámolta az endemikus himlőt a vaccinia vírussal végzett védőoltás alkalmazásával. Azonban az ezen

vaccinia vírussal végzett himlő védőoltás esetenként súlyos komplikációkhoz vezetett, mint például a védőoltás után fellépő encefalitisz, generalizált vaccinia vagy kontakt fertőzés.

Anton Mayr egy új vakcinát fejlesztett ki, amely nem mutatja ezeket a komplikációkat. A himlő vakcina a módosított Ankara vaccinia virus (MVA) himlővírust tartalmazza és parenterális védőoltásban alkalmazták himlő ellen körülbelül 150.000 védőoltás során anélkül, hogy bármilyen a védőoltással kapcsolatba hozható komplikációt okozott volna. Még az immunológiai hiányosságokkal rendelkező gyermekek esetében sem mutatkoztak komoly mellékhatások. Az MVA-t az eredeti Ankara vaccinia vírus mutáltatása és szelekciója segítségével állították elő, 575 passzálás után csirke embrió fibroblaszt tenyészeteken. Ezen MVA biztonságossága tükröződik biológiai, kémiai és fizika jellemzőiben. Az MVA molekulatömege lecsökkent, a genomban hat deléció található és nagymértékben legyengített az emlős sejtek esetében, azaz a DNS és a fehérje szintetizálódik, de gyakorlatilag nem termelődik vírusrészecske. Az Anton Mayr által kifejlesztett módosított Ankara vaccinia vírus letétbe került az Európai Sejttenyészet Gyűjteményben (European Collection of Cell Cultures, ECACC) (Salisbury, Egyesült Királyság) a V94012707 katalógusszám alatt.

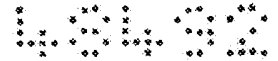
A himlő elleni védőoltás nagyon sikeres volt. 1979-ben az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) bejelentette a himlő felszámolását. Ennek megfelelően a gyermekek tömeges beoltását megszüntették és csak laborató-



riumi dolgozók valamint egyes országokban a fegyveres erők tagjai részesülnek védőoltásban.

A himlő felszámolásával az emberek himlő fertőzésének az elsődleges okát megszüntették. Azonban néhány nem-humán himlővírus esetében csökkent a gazdaszervezet specifitása, azaz ezek nem csak a tipikus gazdaszervezeteikben okoznak fertőzéseket (azaz például tehénhimlő a tehénben), hanem más állatokban is (mint például patkányokban és macskákban). Az emberek éppúgy megfertőződhetnek ezen az úton. Mivel a lakosság egyes részei már nem immunisak a himlő ellen, az állatfajokból eredő ortohimlő fertőzések veszélyesek lehetnek a számukra. A háziállatok képezik az emberek fertőzésének a fő forrását. Ennek megfelelően a háziállatok ortohimlő vírusok elleni védőoltásának fontossága növekszik. Továbbá az MVA jelentőséggel bír mint génterápiás vektor, azaz például nukleinsav szekvenciák bejuttatásában egy célsejtbe ahol expresszióra kerülnek.

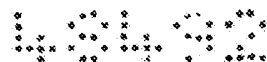
Az MVA logaritmikus termeléséhez primer vagy szekunder csirke embrió fibroblaszt sejttenyészetekre van szükség. A sejteket csirke tojásokból állítjuk elő, amelyeket 10-12 napig keltettünk. Mivel a tojások biológiailag változékonyak, a sejttenyésztő rendszer számára kinyert sejtek hasonlóképpen variábilisak a sejt szinten. Továbbá egy csirke embrió „fibroblaszt tenyészetben” gyakran más sejt típusok is találhatóak, mint például epithél sejtek. A sejteknek ez a variabilitása ugyanakkor a csirke embrió fibroblasztok által termelt vírusok variabilitását is eredményezi. Ezért tehát nehéz standardizálni és validálni a sejttenyésztő



rendszert, hogy a termelt MVA folyamatosan magas minőségét tudjuk garantálni. Továbbá nem lehet tökéletesen kizárni a sejttenyésztő rendszer szennyeződését azoktól a mikroorganizmusoktól vagy vírusoktól, amelyek a keletetett tojásokban már jelen vannak. Amikor az MVA-t vírusfertőzött sejtekben tenyésztjük, az MVA rekombinálódhat a szennyező vírussal. Ezért tehát új és előre nem tudható jellemzőkkel rendelkező MVA-t hozhatunk létre. A vírus szuszpenziós tenyészetben, nagy méretben történő termeléséhez a primer illetve szekunder csirke embrió fibroblasztok nem nagyon megfelelőek. Továbbá az MVA tisztítása és koncentrációja előnyösen megvalósítható lenne gradiens ultracentrifugálással. Azonban az ilyen tisztítás nehéz akkor, ha az MVA-t primer vagy szekunder csirke embrió fibroblasztokon tenyésztjük. Végül a páciensek növekvő számában alakult ki allergia csirke tojásalbuminnal szemben. Bár a tenyésztés *in vitro* körülményei erősen lecsökkentik az allergén potenciált, egy allergiás reakció veszélye nem zárható ki teljes mértékben.

Összefoglalva, egyrészt az MVA csak primer illetve szekunder csirke fibroblasztokon tenyészhető eredményesen, ami számos hátránnyal jár; azonban másrészt kimutatható az MVA biztonságos használhatósága embereken annak védőoltásban történő széleskörű alkalmazása során.

A találmány tárgyát képező eljárás az MVA homogén vírus részecskéinek termelésére. Továbbá ezen körülményeknek lehetővé kell tenniük az MVA egyszerű és nagy méretben történő termelését.



Az előbbiekben említett és más célok eléréséhez a találmány tárgyát képezi egy MVA törzs, amelyet folytonos sejtvonala sejtjeiben történő tenyésztéshez adaptáltunk és amely sejtvonalat terápiás ágens termelésére jóváhagyták.

A leírás szerint első ízben nyílik lehetőség az MVA hatékony és nagyméretben történő termelésére. Mivel egy folytonos sejtvonala sejtjei homogének és jellemzőik stabilak, az ezen sejtvonalakból begyűjtött MVA szintén homogén, nagymértékben a várható jellemzőkkel rendelkezik. Továbbá a mikroorganizmusok okozta szennyeződés kockázata ellenőrizhető és az MVA készítmény tyúktojás fehérjékkel történő szennyeződése - ami kimutatható, amikor az MVA-t csirke embrió fibroblasztokon tenyésztjük - kizárható. A permanens sejtvonala kezelése kényelmes és így nagymértékben megfelel ipari alkalmazásokra.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva, az MVA-t emlős sejtvonala sejtjeiben történő tenyésztéshez adaptáljuk, amely sejtvonala vakcina termelésére jóváhagyott. Meglepő módon azt találtuk, hogy az emlős sejtvonala - mint például a Vero sejtvonala - adaptált MVA továbbra is csökkentett virulenciával rendelkezik emberek esetében és ugyanakkor más emlősök széles tartományában. Ennek megfelelően az MVA nagymértékben legyengített - azaz DNS és fehérje szintetizálódik, de gyakorlatilag nem termelődnek vírus részecskék, amely gyakorlatilag megszünteti a betegséget okozó képességet. Így tehát a találmány szerinti MVA ugyanakkor nagymértékben alkalmas mint vakcina emberek és az emlősök széles köre számára. Ennek megfelelően az MVA

különösen jól alkalmazható az állatgyógyászat területén.

Továbbá a találmány tárgyát képezi egy találmány szerinti MVA törzs előállítására szolgáló eljárás. A találmány egy megvalósítási módja szerint eljárva terápiás anyag termelésére jóváhagyott sejtvonal sejtjeit fertőzzük meg a vad-típusú MVA-val. Előnyösen magas multiplicitású fertőzést (MOI) - azaz sejtenként nagyszámú vírust - alkalmazunk ebben a fertőzésben. Ezt követően a vírusokat begyűjtjük és ugyanazon sejtvonalból származó friss sejteket fertőzünk meg az újonnan termelt vírusokkal. Ezt a folyamatot megismételjük (sorozatos passzálás) amíg az MVA adaptálódik a sejtvonalhoz. Az adaptációt akkor érjük el, amikor 72 órával a fertőzés után a vírus titer legalább 1-9-szeres, előnyösen legalább 10-99-szeres, előnyösebben 100-10⁶-szoros és legelőnyösebben több mint 10⁷-10¹⁰-szeres mértékben megemelkedett a kezdeti vírus titerrel összehasonlítva. Az adaptációt korlátozott számú passzálás után érjük el.

A leírás során a "tenyésztésre adaptálva" kifejezés alatt azt értjük, hogy egy fertőzésből előállított vírus mennyisége (kivett mennyiség) megnövekedett a sejtek fertőzésére eredetileg felhasznált vírus mennyiséghez képest (bevitt mennyiség). Ebben az esetben a kivett/bevitt mennyiség arány nagyobb, mint egy.

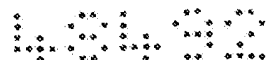
A leírás során az MVA "származék" kifejezés alatt - amelyet az ECACC-nél (Salisbury, Egyesült Királyság) helyeztünk letétbe a 99101431 letéti számon és/vagy a 01021411 ideiglenes katalógus számon - olyan MVA-t értünk, amelyet Vero sejtekben történő tenyésztéshez adaptáltunk a

letétbe helyezett törzssel lényegében azonos növekedési sebességgel de legalább egy különbséget hordoz a genomjában a letétbe helyezett törzssel összehasonlítva.

A leírás során az "immunrendszer" kifejezés alatt alapvetően olyan komplexet értünk, amely szerepet játszik az élő szervezet védelmében idegen anyagokkal és mikroorganizmusokkal szemben. Ez sejtes részre - amely számos sejttípust, mint például limfocitákat és a fehérvérsejtekből származó más sejteket tartalmaz - és humorális részre osztható, amely peptidokat és fehérjéket, mint például antitesteket, komplement faktorokat és citokineket tartalmaz.

A leírás során az "immunválasz" kifejezés alatt az immunrendszer reakcióját értjük, amikor egy idegen anyag vagy mikroorganizmus bejut az élő szervezetbe. Általánosságban az immunválasz specifikus és nem-specifikus reakcióra osztható, bár mindkettő közeli kapcsolatban van egymással. A nem-specifikus immunválaszt mint közvetlen védelmet tekintjük az idegen anyagok és fertőző ágensek széles körével szemben. A specifikus immunválasz mint az élő szervezet nagymértékben hatékony védekezési mechanizmusa jellemezhető egy idegen anyaggal szemben, amely mechanizmus az anyaggal szemben egy késleltetési fázis után jelentkezik és nagymértékben specifikus az adott anyagra. A specifikus immunválasz felelős azért a jelenségért, hogy az egyed, aki felgyógyult egy specifikus fertőzés után, védelmet élvez az adott specifikus fertőzéssel szemben a jövőben.

A leírás során az "immunrendszer aktivátora" kifejezés alatt bármely olyan anyagot értünk, amely képes immunvá-



laszt kiváltani vagy erősíteni.

A leírás során az "immunrendszer szupresszora" kifejezés alatt bármely olyan anyagot értünk, amely képes csökkenteni vagy megakadályozni egy immunválaszt.

A leírás során az "immunrendszer stabilizátora" kifejezés alatt bármely olyan anyagot értünk, amely képes az immunválaszt állandó szinten tartani.

A feltalálók két előnyösen alkalmazható MVA törzset biztosítottak, amelyeket afrikai zöldmajom sejtvonálhoz - az úgynevezett Vero sejtvonálhoz (ATCC katalógusszám: CCL-81) - adaptáltak. Az MVA-törzs - amelyet 100-szor passzáltak Vero sejtekben - a Vero-MVA elnevezést kapta és letétbe helyezték az Európai Típustenyészet Gyűjteményben (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Egyesült Királyság) a 99101431 letéti szám alatt. A Vero sejtekben végzett 200 passzálás után nyert MVA-törzs a Vero-MVA-200 elnevezést kapta, és letétbe került az ECACC-nél a 01021411 ideiglenes katalógusszám alatt.

A fentiek szerint kapott MVA-t tovább amplifikáltuk a jóváhagyott sejtvonál sejtjeit alkalmas körülmények között tenyésztve, a sejteket az MVA-val fertőzve és a sejtek által termelt vírusrészecskéket begyűjtve. Így az MVA hatékonyan és könnyen amplifikálható nagy méretben. Meglepő módon a találmány szerinti MVA nem mutat megnövekedett virulenciát a Vero sejtektől különböző további sejtekben, mint például a HL, HEP-2 vagy HeLa sejteket magukba foglaló humán sejtvonalakban.



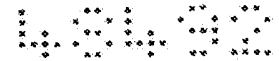
A találmány egy másik megvalósítási módja szerint eljárva olyan MVA-t alkalmazunk, amely legalább egy heterológ nukleinsav szekvenciát tartalmaz, azaz olyan nukleinsav szekvenciát, amely természetes körülmények között nem fordul elő az MVA genomban (rekombináns MVA). Előnyösen a heterológ nukleinsav szekvencia egy gén, még előnyösebben olyan gén, amely immunizáló fehérjét kódol és legelőnyösebben a következők ellen immunizáló fehérjét kódoló gén: málária, veszettség, és/vagy hepatitisz. A heterológ nukleinsav szekvencia expressziója előnyösen egy vaccinia vírus promóter transzkripció szabályozása alatt van, előnyösebben az MVA saját promótere szabályozása alatt. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a heterológ nukleinsav szekvenciát az MVA genomban egy természetes körülmények között előforduló deléciós helyre illesztjük be (ennek leírása megtalálható a PCT/EP96/02926 azonosítószámú szabadalmi dokumentumban).

A rekombináns MVA-t egy nukleinsav szekvencia célsejtbe történő bejuttatására alkalmazzuk, amely nukleinsav szekvencia homológ vagy heterológ lehet a célsejttel. Egy heterológ nukleinsav szekvencia bejuttatása egy célsejtbe felhasználható heterológ nukleinsavak, peptidek és/vagy polipeptidek és/vagy fehérjék *in vitro* előállítására, amelyeket a nukleinsav szekvencia kódol. Az eljárás során gazdasejtet fertőzünk meg a rekombináns MVA-val, a fertőzött gazdasejteket alkalmas körülmények között tenyésztjük és adott esetben a gazdasejt által termelt peptidet és/vagy fehérjét izoláljuk vagy koncentrációját megnöveljük.



Továbbá egy homológ vagy heterológ szekvencia bejuttatása alkalmazható *in vitro* és előnyösen *in vivo* génterápiában. Sorrendben megfeleltetve az *in vitro* és *ex vivo* génterápia esetében sejteket izolálunk a kezelésre kerülő egyedből, transzformáljuk a rekombináns MVA-val és visszajuttatjuk abba az egyedbe, amelyből eredetileg a sejteket kinyertük. *In vivo* génterápia esetében a rekombináns MVA-t közvetlenül beadjuk a élő állati testbe, beleértve az élő emberi testet. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a rekombináns MVA antigént vagy antigén epitópot expresszál. Legelőnyösebben a vektor antigén determinánst expresszál a következőkből: *Plasmodium falciparum*, *Mycobacteria*, herpeszvírus, influenzavírus, hepatitisz vagy humán immundeficiencia vírus.

Mivel a találmány szerinti MVA - meglepő módon - továbbra is nagymértékben legyengített, az MVA ideális arra, hogy emlősök széles tartományát immunizáljuk, beleértve az embereket. Így tehát a találmány tárgyát képezi egy MVA-t tartalmazó vakcina is élő állati test immunizációjára - beleértve az embert is - himlő fertőzések ellen, előnyösen ortohimlő fertőzések ellen. A vakcina tartalmazhat az MVA mellett egy vagy több járulékos anyagot is, mint például antibiotikumot, tartósítószeret vagy stabilizátort. A vakcina különösen jól alkalmazható az állatgyógyászat területén például az állatok ortohimlő fertőzések elleni immunizációjára, azaz például macska immunizálására macskahimlő ellen, egerek immunizálására ektromélia ellen, vagy tevék immunizálására tevehimlő ellen. Az immunizációkat előnyösen pa-



reenterálisan végezzük.

Egy antigén determináns immunizáló hatását a vakcinában gyakran megnöveljük egy úgynevezett adjuváns hozzáadásával. Az adjuváns az immunrendszer egyidejű stimulálását végzi nem-specifikus módon, amely erősebb specifikus immunreakciót okoz a vakcina antigén determinánsával szemben. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint eljárva az MVA-t mint adjuváns alkalmazzuk az immunválasz egyidejű stimulálására egy vakcina antigén determinánsával szemben. Ebben az esetben az MVA-t előnyösen inaktiváljuk. Az MVA inaktiválása megvalósítható például hőkezeléssel vagy kémiai anyagok alkalmazásával. Előnyösen az MVA inaktiválását β -propiolaktonnal végezzük. A találmány ezen megvalósítási módja szerint eljárva az inaktivált MVA-t számos fertőző betegség elleni vakcinához adhatjuk hozzá, hogy megnöveljük az immunitást ezen betegséggel szemben.

Fertőzés esetén az egyed immun-, ideg-, hormonális és vaszkuláris rendszere szorosan együttműködve dolgozik. Ezek a kölcsönhatások szabályozhatók a nem-specifikus immunrendszer elemei útján, azaz például citokinekkal, mint az interferonok és az interleukinek. A himlővírusok képesek befolyásolni az immunrendszer szabályozását [Swiss Vet. 11 13 (1999)]. Így a találmány egy további megvalósítási módja szerint eljárva az MVA és előnyösen az inaktivált MVA alkalmazható emlősökben - beleértve embereket - a sejtes és a humorális elemek szabályozására a nem-specifikus ("innate") immunrendszerben. Előnyösen az MVA-t mint bioregulátor alkalmazzuk, ahol az immunrendszer hibás funkciói megszüntet-

hetők és a test saját védelmi mechanizmusát aktiváljuk, stabilizáljuk és/vagy szupresszáljuk. Legelőnyösebben az MVA-t mint bioregulátor alkalmazzuk olyan vírusfertőzés esetében, mint például herpesz, hepatitisz-B vagy -C vírus, krónikus gyulladós betegség esetében és/vagy tumorterápia támogatására. Az MVA alkalmazható az immunrendszer stabilizálására is fertőzésekkel szemben megnövekedett fogékonyság esetében, mint például stressz esetében vagy újszülöttekben. Az aktív és/vagy előnyösen az inaktivált MVA alkalmazható szisztémásan, azaz például intramuszkulárisan és/vagy lokálisan, azaz például a nyálkahártya membránokon és/vagy a bőrön keresztül.

Összefoglalva a találmány tárgyát MVA törzsek képezik, amelyek általánosságban ugyanazon alkalmazásokban használhatók fel mint a vad-típusú MVA, de megszüntetik a problémákat, amelyeket a vad-típusú MVA csirke embrió fibroblasztokon végzett amplifikációja okoz.

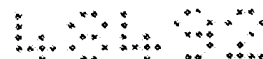
A találmány tárgyát képezik *inter alia* az alábbiak, önmagukban vagy kombinációban:

Módosított Ankara vaccinia vírus (MVA), amelyet folytonos sejtvonal sejtjeiben történő tenyésztéshez adaptáltunk, amely sejtvonal terápiás anyag termelésére jóváhagyott.

A fentebb említett MVA, amelyet emlős sejtvonal sejtjeiben történő tenyésztéshez adaptáltunk.

A fentebb említett MVA, ahol a sejtvonal vakcina termelésére jóváhagyott sejtvonal.

A fentebb említett MVA, ahol a jóváhagyott sejtvonal egy Vero sejtvonal.



A fentebb említett MVA, ahol a jóváhagyott sejtvonal az ATCC CCL-81 katalógusszámú Vero sejtvonal.

A fentebb említett MVA, amelyet letétbe helyeztünk az Európai Típustenyészet Gyűjteményben (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Egyesült Királyság) a 99101431 letéti számon és/vagy ennek származéka.

A fentebb említett MVA, amelyet letétbe helyeztünk az ECACC-nál (Salisbury, Egyesült Királyság) a 01021411 ideiglenes katalógusszámon és/vagy ennek származéka.

A fentebb említett MVA, amely legalább egy heterológ nukleinsav szekvenciát tartalmaz.

A fentebb említett MVA, amely heterológ nukleinsav szekvenciát tartalmaz, amely szekvencia például egy terápia fehérjét és/vagy antigén determinánst kódol, mint például egy peptid, amely malária, hepatitisz és/vagy veszettség fertőzés ellen immunizálni képes.

Gazdasejt, amelyet a fentebb leírt MVA-val fertőztünk meg.

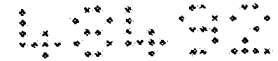
Készítmény, előnyösen gyógyászati készítmény, amely a fentebb leírt MVA-t és/vagy az MVA DNS-ét tartalmazza.

A fentebb leírt gyógyászati készítmény, ahol a gyógyászati készítmény egy vakcina.

A fentebb leírt vakcina, amelyet élő állati test - beleértve embert - immunizálására alkalmazunk.

A fentebb leírt vakcina, amelyet Orthopox fertőzés elleni immunizációra alkalmazunk.

A fentebb leírt vakcina, amelyet macskák immunizálására alkalmazunk macskahimlő fertőzés ellen, egerek immunizálá-



sára alkalmazunk ektromélia fertőzés ellen és/vagy tevék immunizálására alkalmazunk tevehimlő fertőzés ellen.

A fentebb leírt gyógyászati készítmény, amelyben az MVA a nem-specifikus immunrendszer aktivátora, szupresszora és/vagy stabilizátora.

Gyógyászati készítmény, amely a fentebb leírt MVA-t és/vagy az MVA DNS-ét adjuvánsként tartalmazza.

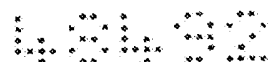
Gyógyászati készítmény, amely a fentebb leírt rekombináns MVA-t és/vagy a rekombináns MVA DNS-ét tartalmazza.

A fentebb leírt gyógyászati készítmény, amelyet génterápiában alkalmazunk.

Eljárás homológ és/vagy heterológ nukleinsav szekvencia bejuttatására célsejtbe, amelynek során a célsejtet a fentebb leírásra került MVA-val fertőzzük.

Eljárás a fentebb leírtak szerinti MVA törzs előállítására, amelynek során: (a) egy jóváhagyott sejtvonal sejtjeit fertőzzük meg vad-típusú MVA-val, előnyösen a V94012707 letéti szám alatt az ECACC-nál letétbe helyezett MVA-val; (b) a vírusokat begyűjtjük; (c) ugyanazon sejtvonalba tartozó friss sejteket fertőzünk meg az újonnan termelt vírusokkal; és adott esetben (d) megismételjük a (b) és (c) pontokat, amíg a vírus adaptálódik a sejtvonal sejtjeiben történő tenyésztéshez.

Eljárás a fentebb leírásra került MVA vírusrészecskék termelésére, amelynek során egy jóváhagyott sejtvonal sejtjeit tenyésztjük alkalmas körülmények között, a sejtvonalat az MVA-val fertőzzük és a sejtek által termelt vírusrészecskéket begyűjtjük.



A fentebb leírt módszer, amelynek végrehajtása során a sejtvonalat az ECACC-nál a 99101431 letéti számon letétbe helyezett MVA-val fertőzzük és/vagy az ECACC-nál a 01021411 ideiglenes katalógusszám alatt letétbe helyezett MVA-val fertőzzük vagy ezen törzsek valamelyikének származékával fertőzzük.

Eljárás nukleinsav szekvencia, peptid, polipeptid és/vagy fehérje előállítására, amelynek során gazdasejtet fertőzünk a fentebb leírt rekombináns MVA-val, a fertőzött gazdasejtet alkalmas körülmények között tenyésztjük és adott esetben a nukleinsav szekvenciát, a gazdasejt által termelt peptidet és/vagy fehérjét izoláljuk és/vagy koncentrációját megnöveljük.

A fentebb leírt MVA alkalmazása gyógyászati készítmény előállítására az MVA-ra reagáló betegség vagy rendellenesség kezelésére vagy megelőzésére.

A fentebb leírt MVA alkalmazása vakcina előállítására élő állati test - beleértve embert is - immunizálásához.

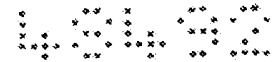
A fentebb leírt MVA alkalmazása aktivátor, szupresszor és/vagy stabilizátor előállítására a nem-specifikus immunrendszer számára.

A fentebb leírt alkalmazás adjuváns előállításához.

A fentebb leírt MVA alkalmazása vakcinaként.

A fentebb leírt MVA alkalmazása adjuvánsként.

A fentebb leírt MVA alkalmazása mint a nem-specifikus immunrendszer aktivátora, szupresszora és/vagy stabilizátora.



Eljárás élő állati test - beleértve az embert - immuni-
zálására, amelynek során rászoruló személynek egy fentebb
leírt gyógyászati készítmény terápiásan hatékony mennyiség-
gét beadjuk.

Eljárás homológ és/vagy heterológ nukleinsav szekvencia
célsejtbe történő bejuttatására, amelynek során a célsejtet
a fentebb leírt MVA-val és/vagy az MVA DNS-sel fertőzzük
meg.

Eljárás egy élő állati test - beleértve az embert - im-
munrendszerének aktiválására, szupressziójára és/vagy sta-
bilizálására, amelynek során a fentebb leírt gyógyászati
készítményt egy élő állati testbe - beleértve az embert -
beadjuk.

Eljárás specifikus immunválasz megnövelésére egy vakci-
nában található antigén determinánsai szemben, amelynek
során a fentebb leírt MVA-t adjuvánsként juttatjuk be egy
élő állati testbe - beleértve az embert.

Módosított Ankara vaccinia vírus amelyet folytonos
sejtvonal sejtjeiben történő tenyésztéshez adaptáltunk,
amely a következő lépéseket tartalmazó folyamat segítségé-
vel hozható létre: terápia anyag termelésére jóváhagyott
sejtvonal sejtjeit fertőzzük, a sejtvonalak által termelt
vírusrészecskéket begyűjtjük, és adott esetben a fenti lé-
péseket addig megismételjük, amíg az MVA kívánt tenyésztési
jellemzőit a sejtekben elérjük.

Az alább következő példák a találmány jobb megértését
szolgálják. A szakember számára egyértelmű, hogy az alábbi
példák semmiképpen nem vehetők korlátozó értelemben. Számos

más, a fentiekkel egyenértékű módosítás illetve változtatás hajtható végre, és az ilyen módosítások nem térnek el a táplalmányi gondolattól és a csatolt szabadalmi igénypontok által meghatározott igényelt oltalmi körön belülnek tekintendők.

1. példa

Az MVA adaptálása Vero sejtekhez és az MVA törzs jellemzése

1. Az MVA adaptálása Vero sejtekhez:

Az Anton Mayr által kifejlesztett vad-típusú MVA - amely egy módosított Ankara vaccinia vírus - letétbe került az ECACC-nál (Salisbury, Egyesült Királyság) a V94012707 katalógusszám alatt. A vad-típusú MVA-t Vero sejtekben történő tenyésztéshez adaptáltuk oly módon, hogy a vírust sorozatos passzálásokba vittük Vero sejtekben (1. táblázat). A stationer Vero sejt vonal (WHO oltóanyag törzs, ECACC katalógusszám: 88020401) ATCC CCL-81 sejt klónját használtuk fel a 148-165. passzálásokban (WHO oltóanyag sarzs, fő- és munkabank ("Master and Working Bank")). A sejteket Earle-féle MEM táptalajt (ICN) tartalmazó közegben, pH 7,4 - 7,6 között, 5% BMS szérumban helyettesítő (Biochrom) mellett szaporítottuk. A szakember számára ismert módon, mindig a munkabank azonos sejtjeit oltottuk le, a sejteket 1:2 - 1:4 arányban szétosztva. A táptalaj körülbelül 250.000 sejtet tartalmazott milliliterenként. A sejteket sorrendben megfeleltetve csövekben (2 ml), Roux edényekben (100 ml) és műanyag edényekben (sorrendben megfeleltetve 6 ml és 40 ml) szaporítottuk. Általánosságban a sejtek összefolyó monoré-

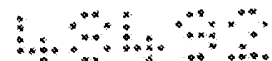
teget alkottak 16-24 óra eltelte után. Ezután a táptalajt hozzáadott anyagok nélküli egyszerű Earle-féle MEM táptalajra cseréltük le.

A vad-típusú MVA adaptálásához egy csöves tenyésztőrendszert alkalmaztunk. A passzálások eredményeit az 1. és a 2. táblázatban foglaljuk össze. A Vero sejteket 10 MOI ("multiplicity of infection", fertőzés többszörös) vad-típusú MVA-val fertőztük meg, azaz átlagosan 10 vírus részecske jutott egy Vero sejtre. A kezdetben alkalmazott vad-típusú MVA genetikailag homogén, plakk-tisztított MVA volt, 575 passzálás után csirke embrió fibroblasztokon (titer: $10^{7.75}$ KID₅₀/ml). Huszonnégy óra elteltével az összefolyó monoréteg Vero sejtjeinek 90 százaléka pusztult el toxikus folyamatok következtében (50% toxicitás útján, 40% lizis útján). A táptalajt a sejttermeléssel együtt a sejtek lefagyasztása és felengedése után - ami a termelt vírusokat tartalmazta - begyűjtöttük és ebből a keverékből 0,2 ml mennyiséget oltottunk le Vero sejtek monorétegére a tenyésztő csövekben (2. passzálás). Ezt a folyamatot 200 alkalommal megismételtük. A harmadik passzálás után már nem figyeltünk meg toxikus hatásokat, bár megfigyelhető volt egy enyhe citopátiás hatás (CPE) amelyre jellemző volt a sejtek lekerekedése és lizise a fertőzés után egy 4-6 napos időtartamban. A vírus titer $10^{1.0}$ KID₅₀/ml volt. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az MVA proliferációja a Vero sejtekben megindult, bár nagyon kevésbé hatékony módon. Az ötödik passzálás után egy tipikus CPE-t figyeltünk meg, amely 4-5 nappal a fertőzés után vált teljessé. A vírus



titer a harmadik passzálás után mért $10^{4,0}$ KID₅₀/ml szintről $10^{4,0}$ KID₅₀/ml szintre emelkedett az ötödik passzálás után. Így tehát a vírus hatékonyabban amplifikálódott Vero sejtekben. Az 5-11. passzálásokban egy teljes CPE volt megfigyelhető mindig hamarabb és a vírus titer minden egyes passzálással növekedett. A 11. passzálásnál platót értünk el $10^{7,5}$ KID₅₀/ml szinten. Ennek megfelelően tizenegy passzálás során elértük az MVA adaptációját Vero sejtekhez. A következő 30 további passzálásnál az eredmények az összes passzálás esetén ugyanazok és nagymértékben reprodukálhatók voltak. A CPE már 24 órával a fertőzés után megkezdődött és a fertőzés után három nappal már az össze sejt érintett volt. Ebben az időpontban a Vero sejtek 20 százaléka volt lekerekített és 80 százaléka lizált. Három nappal a fertőzés után a vírus titer mindig körülbelül $10^{7,75}$ KID₅₀/ml érték volt. A tizenötödik passzálás után a vírusokat mindig begyűjtöttük a fertőzés után két-három nappal és csupán 1 MOI mennyiséget alkalmaztunk a 10 MOI helyett a sejtek fertőzésére (2. táblázat). A következő további passzálásokban az MVA növekedési karakterisztikája csak kismértékben változott. Jelentős módon az optimális vírus titer tovább növekedett és elérte a 10^{10} KID₅₀/ml szintet a 200. passzálásra.

Összefoglalva, a vírus reprodukálhatóan növekszik exponenciális módon Vero sejtekben. A növekedési karakterisztika meglepő módon különbözik a vad-típusú MVA karakterisztikájától. Ennek megfelelően az MVA egy új törzsét állítottuk elő sorozatos passzálások segítségével. Ezt az új törzset a



"Vero-MVA" elnevezéssel láttuk el és 200 passzálás után Vero sejtekben a "Vero-MVA-200" elnevezést kapta.

A Vero-MVA és a Vero-MVA-200 vírusokat nagyobb mennyiségekben tenyésztettük. Tároláshoz a Vero-MVA-t centrifugálás segítségével koncentráltuk, újra szuszpendáltuk 2,5% poligelinben és 2 ml-es ampullákban liofilizáltuk. A titer a liofilizálás után még mindig legalább $10^{6,5}$ KID₅₀/ml szintet mutat. A liofilizált Vero-MVA-t és a Vero-MVA-200-t szennyeződésre és toxicitásra ellenőriztük és +4 °C-on tároltuk.

2. A Vero-MVA biológiai tulajdonságainak jellemzése:

A Vero-MVA biológiai jellemzőit (100 passzálás) és a Vero-MVA-200 biológiai jellemzőit (200 passzálás) hasonlítottuk össze a vad-típusú MVA jellemzőivel (3. táblázat és 5. táblázat). Itt a szakember számára ismertnek feltételezhető módszereket alkalmaztuk. A feltalálók kimutatták, hogy sem a vírus gazdaszervezet tartománya nem változott - kivéve a Vero sejteket - sem az emberekkel vagy állatokkal szemben mutatott virulencia nem változott. A Vero-MVA-ra továbbra is jellemző az elvetélt propagáció a nem engedékeny gazdasejtekben.

A Vero-MVA vírus részecskéinek a fő azonosságát - összehasonlítva a vaccinia vírus Elstree törzsének vírus részecskéivel - mutattuk ki az Elstree törzs ellen termelt antitestek kereszt-reaktivitása útján. Az Elstree törzs a WHO által javasolt vaccinia törzs a himlő elleni védőoltásra. Az Elstree törzs ellen termeltetett nyúl poliklonális hiperimmun szérumot adtuk hozzá a Vero-MVA-hoz. 100

KID₅₀/ml Vero-MVA-t teljes mértékben semlegesítettünk a szérum 1:512 arányú hígításával. A szérum kétszeres hígítása volt szükséges ahhoz, hogy semlegesítse a vaccinia Elstree törzs ugyanezen mennyiségét (1:256). Ennek megfelelően a Vero-MVA továbbra is hatékonyan semlegesíthető vaccinia immunszérummal.

A Vero-MVA, a Vero-MVA-200 és a vad-típusú MVA került összehasonlításra számos további vizsgálatban, ahogyan ezt jelezzük a 3., 4. és 5. táblázatban. A feltalálók kimutatták, hogy a Vero-MVA és a Vero-MVA-200 virulenciája emlősökkel szemben - beleértve embereket - nem növekedett meg a vad-típusú MVA-val összehasonlítva. Azt is kimutattuk, hogy a Vero-MVA és a Vero-MVA-200 nem fertőző vagy toxikus emlősökre, beleértve az embereket. Meglepő módon a Vero-MVA sejt specifikitása többé-kevésbé azonos volt a vad-típusú MVA specifikitásával, kivéve a Vero sejteket. A Vero-MVA csaknem ugyanolyan kis hatékonysággal amplifikálódik humán sejtvonalak sejtjeiben (lásd a 4. táblázatot: HL, HEP-2 és HeLa sejtek) mint ahogyan a vad-típusú MVA amplifikálódik. Ennek megfelelően bár a humán sejtek és az afrikai zöldmájom sejtek filogenetikusan egymással közeli kapcsolatban vannak, a Vero-MVA nem nyeri el azt a képességet, hogy humán sejtekben amplifikálódjon. Más vizsgálatokban sem tapasztaltunk jelentős eltéréseket.

Továbbá a vad-típusú MVA és a Vero-MVA-200 fizikai, kémiai és biológiai jellemzőit hasonlítottuk össze (5. táblázat). Míg a csirke embrió fibroblaszt sejttenyészeteken növekvő vad-típusú MVA három delécióval rendelkezik a bal

megfordított terminális régióban, a Vero-MVA-200 négy delé-
 ciót mutat a bal terminális régióban a himlővírus genomjá-
 val összehasonlítva, amelyet eredetileg Ankarában izolál-
 tak. Így tehát a vad-típusú MVA passzálása Vero sejtekben
 egy további deléciót eredményezett.

A Vero-MVA-t háziállatok immunizációjára alkalmaztuk
Orthopox fertőzések ellen. Az állatok szérumát összegyűj-
 tettük és egy neutralizációs vizsgálatot végeztünk. A fel-
 találók kimutatták, hogy az állatok magas titer mellett
 termeltek antitesteket. Az antitest titerek stabilak voltak
 legalább 111 napos időtartamon keresztül. Azt is kimutat-
 tuk, hogy az antitestek képesek voltak az MVA vírus ré-
 szecskéket *in vitro* semlegesíteni plakk redukciós vizsgálat
 során. Összefoglalva, a Vero-MVA alkalmazható mint vakcina
 ortovírus fertőzésekkel szemben háziállatokban és emberek-
 ben.

1. táblázat. Az MVA adaptációja Vero sejtekhez

passzálás száma	sejt te- nyészet	legmaga- sabb ví- rus titer [log ₁₀ /ml]	eredmény	következte- tés
1	toxikus hatás 24 óra után	2,0	a leoltott ví- rusok maradéka	vak passzálások

3	nincs toxicitás, mérsékelt CPE 4-6 nap után	1,0	a leoltott vírusok maradéka? a vírus szaporodás kezdete	
5	tipikus CPE teljes 4-5 nap után	4,0	növekvő vírus szaporodás	
11	CPE teljes 3 nap után	7,5	logaritmikus vírus szaporodás	adaptáció sikeres
12-42*	CPE kezdődik 24 óra után, teljes 3 nap után	7,75	reprodukálható vírus szaporodás	Vero-MVA
43-100*	CPE kezdődik 24 óra után, teljes 3 nap után	8,0	reprodukálható vírus szaporodás	Vero-MVA
100-200*	CPE kezdődik 24 óra után, teljes 3 nap után	10,0	reprodukálható vírus szaporodás	eredmények a Vero-MVA- 200-ban

* csak 1 MOI kerül leoltásra a tizenegyedik passzálás után a 10 MOI helyett

2. táblázat. A virustiterek változása az MVA Vero sejtekhez történő adaptációja során.

passzálás száma	begyűjtés [napok száma a fertőzés után]	titer per ml [log ₁₀ /ml]
1	1	< 2,0
2	3	2,0
3	5	1,0
5	5	4,0
8	4	6,5
11	3	7,5
18	2	8,0
19	2	7,75
20	3	8,0
25	2	7,75
29	2	7,75
30	3	7,75
31	3	8,0
45	2	7,75
51	3	7,75
60	2	8,0
66	2	7,75
68	2	8,0
75	3	8,0
100	2	8,0
200	2	10,0

3. táblázat. A vad-típusú MVA és a Vero-MVA biológiai jellemzőinek összehasonlítása.

marker	vad-típusú MVA	Vero-MVA (100. passzálás)	Vero-MVA-200
CPE monoreteg sejt te- nyészetekben (1 MOI be- oltás)	a sejtek lekerekedése és lizise az 5. nap után (90% CPE)	a sejtek lekerekedése és lizise az 5. nap után (100% CPE)	a sejtek lekerekedése és lizise a 3-5. nap után (90% CPE)
az optimális begyűjtés titere	$10^{8,0}$ KID ₅₀ /ml	$10^{7,75}$ KID ₅₀ /ml	$10^{10,0}$ KID ₅₀ /ml
elvetélt vírus repro- dukció nem engedékeny sejtszerekben	igen	igen	igen
csökkent virulencia em- berekben és állatokban	igen	igen	igen, egyáltalán nem virulens
fertőzőképesség	nincs	nincs	nincs
a primer plakkok jelle- ge a chorion allantois membránon	nincsenek nekrozis nél- küli proliferáló csomók	nincsenek nekrozis nél- küli proliferáló csomók	nincsenek nekrozis nél- küli proliferáló csomók



	negatív	negatív	negatív
hemagglutináció			
(csirke eritrociták)			
inaktiválás β -	elsőrendű kinetika	elsőrendű kinetika	elsőrendű kinetika
propiolaktonnal	0,05% esetén	0,05% esetén	0,04-0,05% esetén
védőhatás VSV-kölyök	igen	igen	igen
egér érintkeztetéses			
vizsgálatban			
toxicitás emberekkel és	nincs	nincs	nincs
állatokkal szemben			
citokín stimuláció	interferon- α , IL-2 és	interferon- α , IL-2 és	interferon- α és γ , IL-
	IL-12, CSA	IL-12, CSA	1, IL-2 és IL-12, CSA
fagocitózis, természetes	igen	igen	igen, megnövekedett
tes ólósejtek és T-			
limfociták aktiválása			

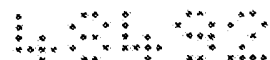
4 2 2 2

4. táblázat. Reprodukciós sebesség KID_{50} /ml értékben a Vero-MVA és a vad-típusú MVA vírusokra különböző sejttenyésztő rendszerekben [\log_{10} /ml].

sejttenyésztő rendszer	Vero-MVA (31. Vero passzálás)	vad-típusú MVA (575. passzálás primer csirke embrió fibroblasztokon)
¹⁾ Vero (afrikai zöld majom vesesejtek)	8,0	4,5
primer csirke embrió fibroblasztok	4,5	8,5
^{1,2)} HL (emberi tüdő)	3,0	2,5
^{1,2)} HEP-2 (humán epidermoid karcinóma)	3,0	2,5
^{1,2)} HeLA (humán méhnyak karcinóma)	2,75	2,75
^{1,2)} BHK (hőrcsög vesesejtek)	5,75	5,25
^{1,2)} MDBK (marha vesesejtek)	3,5	3,5
^{1,2)} PK-15 (sertés vesesejtek)	3,25	3,5

¹⁾ Folytonos sejtvonal, amely a zárójelek között jelzett szövetből és fajból származik.

²⁾ Az Orvosi Mikrobiológiai Intézet (München) gyűjteményéből kapott sejtvonalak.



5. táblázat. A vad-típusú MVA (572. passzálás csirke embrió fibroblasztokon, CEF) összehasonlítása Vero-MVA-200 vírussal (200. passzálás Vero sejtekben)

marker	vad-típusú MVA	Vero-MVA-200
genetikai markerek	3 deléció a bal	4 deléció a bal
(összehasonlítás egy himlővírus törzssel, ahogyan azt Ankarában izolálták)	terminális régióban (fordított terminális ismétlődő szekvencia) a genom méret lecsökkent 208 kb-ról 178 kb-ra	terminális régióban további csökkenés a genom méretben 172 kb-ra
	az eredeti genom molekulatömege 15 százalékának elvesztése	az eredeti genom molekulatömege 20 százalékának elvesztése
	az interferon receptor elvesztése	további receptor vesztések, például IL-1 β
sejtes markerek	T-helper sejtek aktiválása (CD4, CD8, CD25)	a citotoxikus T- limfociták megnövekedett aktiválása

	NK-sejtek aktiválá- sa	az NK-sejtek magnövekedett akti- válása
	elvetélt reproduk- ció emlős sejtekben (kivéve BHK sejtek)	a gazdasejt tartó- mány további szűkü- lése sejttenyésztő rendszerekben
citokin	interferon- α , IL-2, IL-12	interferon- α és - γ , IL-1, IL-2 és IL-12
vírustiter	CEF: $10^{9.5}$ KID ₅₀ /ml; Vero sejtek: $10^{4.0}$ KID ₅₀ /ml	CEF: $10^{4.5}$ KID ₅₀ /ml; Vero sejtek: $10^{9.5}$ KID ₅₀ /ml
immunrendszer	a specifikus immun- rendszer aktivitá- sának csökkenése	a nem-specifikus immunrendszer magnövekedett akti- vitása
virulencia emberek és állatok esetén	alacsony	nincs

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Módosított Ankara vaccinia vírus (MVA), amely a Vero sejtvonala sejtjeiben történő tenyésztéshez lett adaptálva, és amely a következő lépéseket magába foglaló eljárás alkalmazásával állítható elő:

(a) a Vero sejtvonala sejtjeit vad típusú MVA-val, előnyösen a V94012707 letéti számon az Európai Sejttenyésztés Gyűjteményben („European Collection of Cell Cultures”, ECACC, Salisbury, Egyesült Királyság) letébe helyezett MVA-val fertőzzük;

(b) a sejtvonala által termelt vírusrészecskéket begyűjtjük; és

(c) a Vero sejtvonala friss sejtjeit megfertőzzük az újonnan termelt vírusokkal és a sejtek által termelt vírusrészecskéket begyűjtjük, ahol a c) lépést addig ismételjük, amíg a vírustiter kivett/bevitt aránya nagyobb nem lesz, mint egy.

2. Az 1. igényponti szerinti MVA, amely az ATCC CCL-81 katalógusszámú Vero sejtvonala sejtjeiben történő tenyésztéshez lett adaptálva.

3. Az 1. vagy 2. igényponti szerinti MVA, amely az Európai Sejttenyésztés-gyűjteményben (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Egyesült Királyság) a 99101431 letéti számon van letébe helyezve és/vagy olyan Módosított Ankara vaccinia vírus, amely a Vero sejtvonala sejtjeiben olyan növekedési sebességgel történő tenyésztéshez lett adaptálva, amely növekedési sebesség ugyanakkora, mint a deponált törzs növekedési sebessége, és amely vírus a deponált vírushoz képest legalább egy eltérést tartalmaz a genomjában.

4. Az 1. vagy 2. igényponti szerinti MVA, amely az Európai Típustenyésztés Gyűjteményben (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Egyesült Királyság) a 01021411 letéti számon van letébe helyezve és/vagy olyan Módosított Ankara vaccinia vírus, amely a Vero sejtvonala sejtjeiben olyan növekedési sebességgel történő tenyésztéshez lett adaptálva, amely növekedési sebesség ugyanakkora, mint a deponált törzs növekedési sebessége, és amely vírus a deponált vírushoz képest legalább egy eltérést tartalmaz a genomjában.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti MVA, amely legalább egy heterológ nukleinsav szekvenciát tartalmaz.

6. Az 5. igényponti szerinti MVA, amely heterológ nukleinsav szekvenciaként terápiás fehérjét és/vagy antigén determinánst kódoló gént tartalmaz.

7. Gazdasejt, amely 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA vírussal van *in vitro* vagy *ex vivo* megfertőzve.

8. Készítmény, előnyösen gyógyászati készítmény, amely 1-7. igénypontok bármelyike szerinti MVA-t és/vagy az MVA DNS-ét tartalmazza.

9. A 8. igényponti szerinti készítmény, amely vakcina.

10. A 9. igényponti szerinti készítmény, élő állati test -- emberit is beleértve - immunizálására történő alkalmazására.

11. A 9. vagy 10. igényponti szerinti készítmény, ortohimlő fertőzés elleni immunizációra történő alkalmazásra.

12. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, macskák macskahimlő fertőzés elleni immunizálására, egerek ektromélia fertőzés elleni immunizálására és/vagy tevék tevehimlő fertőzés elleni immunizálására történő alkalmazására.

13. A 8. igényponti szerinti készítmény, ahol az MVA a nem-specifikus immunrendszer aktivátora, szupresszora és/vagy stabilizátora.



14. Készítmény, előnyösen gyógyászati készítmény, amely az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA-t és/vagy az MVA DNS-ét tartalmazza adjuvánsként.

15. Készítmény, előnyösen gyógyászati készítmény, amely 5. vagy 6. igénypont szerinti rekombináns MVA-t és/vagy a rekombináns MVA DNS-ét tartalmazza, génterápiában történő alkalmazásra.

16. Eljárás homológ és/vagy heterológ nukleinsav szekvencia *in vitro* vagy *ex vivo* bejuttatására célsejtbe, *azzal jellemezve*, hogy a célsejtet 5. vagy 6. igénypont szerinti MVA-val és/vagy az MVA DNS-ével fertőzzük.

17. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy tartalmazza a következő lépéseket:

(a) egy Vero sejt vonal sejtjeit megfertőzzük vad-típusú MVA-val, előnyösen a V94012707 letéti szám alatt az ECACC-nál letétbe helyezett MVA-val;

(b) az a) lépés szerint fertőzött sejtekben termelődött vírusokat begyűjtjük;

(c) a Vero sejt vonal friss sejtjeit megfertőzzük az újonnan termelt vírusokkal és a sejtek által termelt vírusrészecskéket begyűjtjük, ahol a c) lépést addig ismétljük, amíg a vírus titer kivett/bevitt aránya nagyobb nem lesz, mint egy..

18. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA vírusrészecskék termelésére, *azzal jellemezve*, hogy tartalmazza a következő lépéseket:

(a) olyan sejt vonal sejtjeit tenyésztjük, melyben az MVA alkalmas körülmények között replikálódik;

(b) a sejt vonalat az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA-val fertőzzük; és

(c) a sejtek által termelt vírusrészecskéket begyűjtjük.

19. Eljárás nukleinsav szekvencia, peptid és/vagy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy tartalmazza a következő lépéseket:

(a) gazdasejtet 5. vagy 6. igénypont szerinti rekombináns MVA-val fertőzünk;

(b) a fertőzött gazdasejtet alkalmas körülmények között tenyésztjük; és adott esetben

(c) a nukleinsav szekvenciát, a gazdasejt által termelt peptidet és/vagy fehérjét izoláljuk és/vagy koncentrációját megnöveljük.

20. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA alkalmazása az MVA-ra reagáló betegség vagy rendelkezésére vagy megelőzésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

21. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA alkalmazása élő állati test - beleértve az emberit is - immunizálására alkalmas vakcina előállítására.

22. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA alkalmazása a nem-specifikus immunrendszer aktivátora, szupresszora és/vagy stabilizátora előállítására.

23. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti MVA alkalmazása adjuváns előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.

Dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő