



등록특허 10-2812180



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월23일
(11) 등록번호 10-2812180
(24) 등록일자 2025년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7030452(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년09월03일
 심사청구일자 2023년10월06일
- (85) 번역문제출일자 2023년09월06일
- (65) 공개번호 10-2023-0134155
- (43) 공개일자 2023년09월20일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7006091
 원출원일자(국제) 2015년09월03일
 심사청구일자 2020년08월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/070161
- (87) 국제공개번호 WO 2016/034678
 국제공개일자 2016년03월10일

- (30) 우선권주장
 62/045,538 2014년09월03일 미국(US)
 62/055,154 2014년09월25일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 국제공개공보 WO2013/155441(2013.10.17.)*
 국제공개공보 WO2014/037124(2014.03.13.)*
 일본 공표특허공보 특표2005-508916
 호(2005.04.07.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 9 항


심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA) 필로바이러스 백신

(57) 요약

본 발명은 필로바이러스 감염에 대한 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라-기반 (MVA-기반) 백신을 포함하는 개선된 필로바이러스 백신 및 관련 생성물, 방법 및 용도에 관한 것이다. 구체적으로는, 본 발명은 마르부르크 바이러스 (MARV) 또는 에볼라 바이러스 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 이중 뉴클레오티드 (뒷면에 계속)

대 표 도 - 도8b



서열을 포함하는 유전공학적으로 처리된 (재조합) MVA 및 FPV 벡터들에 관한 것이다. 구체적으로는, 본 발명에 불라 바이러스 당단백질 및 비리온 단백질 40을 포함하는 재조합 MVA에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예컨대, 개체에서 보호 면역 반응을 유도하기에 적합한 MVA 및 유전공학적으로 처리된 (재조합) FPV의 생성물, 방법 및 이의 용도 그리고 프라임/부스트 요법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

C12N 2710/24043 (2013.01)

C12N 2710/24143 (2013.01)

C12N 2760/14134 (2013.01)

C12N 2760/14234 (2013.01)

(72) 발명자

호체라인, 후베르투스

독일 81825 뮌헨 하프슈트라쎄 134

디르마이어, 울리케

독일 82319 슈타른베르크 안게르바이더슈트라쎄 17

라후터바흐, 헤닌크

독일 85386 에칭 마이젠베크 22 아

하우스만, 유르겐

독일 79194 군델핑엔 알테 분데슈트라쎄 130

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 필로바이러스 아형에 대한 보호 면역 반응을 생성하는데 사용하기 위한 재조합 MVA 벡터를 포함하는 조성물로서,

마르부르크 바이러스 (MARV) 외피 당단백질 (GP)의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 에볼라 바이러스 (EBOV) 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며,

여기서, MARV 외피 당단백질은 전장 MARV-무소케 외피 당단백질이며,

EBOV 단백질은 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)의 외피 당단백질 (GP), 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV)의 외피 당단백질 (GP) 및 코트디브아르 에볼라 바이러스 (EBOV-CdI)의 핵단백질 (NP)을 포함하며,

보호 면역 반응은 MARV-무소케 및 MARV-앙골라 유발 질병에 대한 것인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 마르부르크 바이러스 (MARV) 외피 당단백질 (GP)의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호: 6으로 제시된 서열을 인코딩하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 마르부르크 바이러스 (MARV) 외피 당단백질 (GP)의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호: 5로 제시된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 재조합 MVA 벡터가 서열번호: 6, 서열번호: 20, 서열번호: 29, 및 서열번호: 31로 제시된 서열을 인코딩하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 재조합 MVA 벡터가 서열번호: 5, 서열번호: 19, 서열번호: 28, 또는 서열번호: 30으로 제시된 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 투여가 대상체에서 보호 면역성 또는 보호 면역 반응을 제공하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, CD40L을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, CD40L은 서열번호: 10으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, CD40L을 인코딩하는 핵산은 서열번호: 9로 제시된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

본 발명은 필로바이러스 질환에 대한 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라-기반 (MVA-based) 백신을 포함하는 개선된 필로바이러스 백신 및 관련 생성물, 방법 및 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전공학적으로 처리된 (재조합) MVA 벡터들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 백신접종 방법들, 특히, 두 가지 바이러스 벡터 조성물을 이용하는 상동 및 이종 프라임-부스트 백신접종 요법들에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 상동 프라임-부스트 백신접종 요법에 사용하기 위한 재조합 MVA 및/또는 이종 프라임-부스트 백신접종 요법에서 사용하기 위한 재조합 MVA 및 재조합 계두 바이러스 (FPV)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예컨대, 개체에서의 보호 면역 반응에 적합한 이의 생성물, 방법들 및 용도들에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

필로바이러스들은 바이러스 과 필로바리다에 (*Filoviridae*)의 외피를 가진, 비-분절, 음성-가닥 RNA 바이러스이다. 현재까지 이 바이러스 과 중 다음의 두 가지 구성원들이 확인되었다: 마르부르크 바이러스 (MARV) 및 에볼라 바이러스 (EBOV). 필로바이러스는 매우 악성이고, 사람간에 용이하게 전염가능하며, 보기도 쉽게 치명적이어서, 인간 및 인간이 아닌 영장류동물들에서 극심한 출혈열을 유발한다. 필로바이러스 감염은 인간에서 23% 내

지 최고 90% 범위의 사망율을 가진다. 그러나 이들의 전염성 및 치사율에도 불구하고, 이용가능한 승인된 치료 또는 예방 백신이 전혀 없다.

[0005] 발병한 동안, 환자의 격리 및 방호복 이용과 소독 절차들 (함께 바이러스 출혈열 (VHF) 격리 지침 또는 격리 간병으로 불림)은 마르부르크 또는 에볼라 바이러스의 추가 전염을 중단시키고, 그에 따라 발병을 통제 및 종결시키기에 충분하여왔다. 필로바이러스에 의해 유발된 출혈열에 대한 효과적인 치료법이 전혀 공지되어 있지 않기 때문에, VHF 격리 지침을 적용함에 의한 전염 예방이 현재로서는 필로바이러스 발병을 통제하기 위해 이용가능한 유일한 수단들이다.

[0006] 첫번째 필로바이러스는 1967년에 녹색 원숭이들로부터 얻은 조직들을 취급하였던 독일 및 유고슬라비아의 수많은 실험 연구자들이 심각한 출혈열을 발병한 후 알게되었다. 총 31명의 사례 및 7명의 사망이 이러한 발병과 관련되어 있었다. 이 바이러스는 발병 지역들 중 하나인 독일 마르부르크의 이름을 따서 마르부르크 바이러스 (MARV)로 명명되었다. 초기 발병 후 바이러스는 사라졌으며 재출현하지 않았는데, 1975년에, 아마도 짐바브웨에서 노출된 것으로 보이는 여행객이 남아프리카의 요하네스버그에서 질병에 걸리게 되었을 때, 이 여행객의 여행 동반자와 간호사 또한 감염되었다. 그 때 이후 약간의 산발적인 마르부르크 출혈열 (MHF) 사례들이 확인되었으나, 이 질병은 비교적 보기드문 것으로 남아있다.

[0007] 두 번째 필로바이러스인, 에볼라 바이러스 (EBOV)는, 제일 처음 1976에 두 번의 에볼라 출혈열 (EHF)이 북부 자이르 (현재 콩고 민주 공화국) 및 남부 수단에서 발병하였을 때 확인되었다. 이 발병은 두 가지 상이한 종류의 에볼라 바이러스인 것으로 결국 밝혀진 바이러스로 인한 것이며, 이 바이러스들은 이들이 발견되었던 나라의 이름을 따서 명명되었다. 두 가지 바이러스 모두 매우 치명적인 것으로 밝혀졌는데, 자이르에서 사례의 90%가 그리고 수단에서 사례의 50%가 사망하는 결과를 가져왔다. 1976년 이래, 에볼라 바이러스는 아프리카에서 산발적으로 나타났는데, 일부 작은 내지 중간 규모의 발병들이 1976년에서 1979년 사이에 확인되었으며, 1994년에서 1996년 사이에 가봉에서 또다시 확인되었다. 에볼라 HF의 보다 큰 유행기는 1995년 자이르의 키크위트에서 그리고 2000년 우간다의 굴루에서 발생하였다.

[0008] 필로바이러스는 하나 또는 그 이상의 인간이 아닌 동물들에서 계속 진행되는 생활주기로부터 인간에게 전염되는 것으로 보인다. 그러나 에볼라 및 마르부르크 바이러스의 자연 숙주 또는 자연 숙주들의 정확한 위치를 찾아내고자 수많은 시도를 하였음에도 불구하고, 이들의 기원은 여전히 불가사의하다. 결과적으로, 바이러스가 자연 숙주(들)로부터 인간에게 어떻게 전염되는지 조차도 여전히 불명확하다. 그러나 인간이 일단 감염되었으면, 사람간의 전염에 의해 추가 감염들이 발생한다. 구체적으로, 전염은 감염된 개체 또는 이들의 체액과 또 다른 사람간의 밀접한 개인적 접촉으로 인한 것이다. 필로바이러스 감염에 의해 유발된 출혈열의 발병들이 보고되는 동안, 감염된 개체들과 매우 가까이에서 이들을 돌보거나 (즉, 먹이고, 씻기고, 약처방하고) 근무하였던 사람들은 특히 그들 자신이 감염될 위험에 처해 있었다. 감염된 체액들과의 접촉을 통한 (즉, 소독되지 않은 주사기, 바늘, 또는 이들 체액들로 오염된 기타 의학 장비의 재사용을 통한) 병원내 (병원) 전염 또한 질병의 확산에 있어 중요한 인자였다. 감염되지 않은 환자들과 감염된 환자들간의 밀접한 접촉을 최소화하는 것은 일반적으로 발병동안 인간들에서의 새로운 필로바이러스 감염의 수를 감소시킨다. 필로바이러스는 실험실에서 소-입자 에어로졸을 통한 어느 정도의 감염 가능성을 보여주었으나, 인간들 사이의 공기 전파는 명확히 밝혀지지 않았다.

[0009] 지금까지 다음과 같은 5가지 에볼라 바이러스 균주들이 확인되었으며, 제일 처음 출현한 지역의 이름을 따서 명명된다: 분디부교 (BEBOV), 아이보리 코스트 (EBOV-CdI, 타이숲 바이러스 또는 TAFV로도 불림), 레스턴 (EBOV-레스턴), 수단 (SEBOV), 및 자이르 (ZEBOV); 자이르, 수단, 및 분디부교 균주들이 일반적으로 인간에서 이환 및 사망의 원인이 된다. 에볼라-레스턴은 원숭이에서는 치명적일 수 있음에도 불구하고, 인간에서는 심각한 질병을 유발하지 않는 것으로 공지된 유일한 필로바이러스이다. 지금까지 몇가지 마르부르크 바이러스 균주들이 확인되었는데, 이중 무소케 (Musoke) 균주가 가장 높은 치사율을 가진다. 도 1을 참조하라.

[0010] 구조적으로, 필로바이러스 비리온은 긴, 때때로 분지형 필라멘트, 뿐만 아니라 "U", 문자 "U", 또는 원과 같은 형상의 보다 짧은 필라멘트를 비롯한 여러가지 형상들로 나타날 수 있다. 바이러스 필라멘트는 최대 14 마이크로미터 (μm) 길이로 측정될 수 있으며, 80 나노미터 (nm)의 균일한 직경을 가지고, 지질막에 둘러싸여있다. 각각의 비리온은 대략 19 킬로염기쌍 (kb) 길이의 하나의 단일-가닥, 음성-센스 RNA 분자를 함유하며, 이는 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 외피 당단백질 (GP), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L) 순서로 순차적으로 배열된 7개의 유전자들을 포함한다. 숙주 세포 세포질로 유입시, 이 RNA는 전사되어 단백질들을 인코딩하는 폴리아데닐화된, 준유전체 mRNA 종들을 생성한다. 전사 및 번역은 7개의 구조적 폴리펩티드를 합성하게 되며, 이들

은 상이한 필로바이러스들 각각에 대해 동일한 기능들을 가지는 것으로 추정된다. 4가지 단백질들 (NP, VP30, VP35 및 L)은 뉴클레오팝시드 복합체에서 바이러스 유전체 RNA와 관련되어 있다. 나머지 3가지 구조 단백질들은 막과 관련되어 있는데; GP는 I형 막관통 단백질인 반면, VP24 및 VP40은 아마도 막의 안쪽에 위치된다. 외피 당단백질 (GP)은 이형이량체의 세 개의 복제를 포함하는 동형삼량체 ('페플로머'로도 언급됨)로서 바이러스 외피에서 나타난다. 이러한 이형이량체는 퓨린 절단에 의해 생성되고, 'GP1' 및 'GP2'로 공지된, 전장 GP 전구물질 ('GPO'로도 언급됨)의 두 개의 절편들을 포함한다. GP1 및 GP2는 이황화 결합에 의해 결합된다. 비-구조적, 분비 당단백질 (sGP)은 MARV가 아니라 EBOV에 의해 발현된다 (H. Feldmann & M.P. Kiley, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 235:1-21 (1999)). 새로운 바이러스 입자들은 숙주 세포들의 표면으로부터 출아(budding)하여 생성된다 (하기 참조).

[0011] 필로바이러스 생활 주기는 특이적 세포-표면 수용체들에 대한 비리온 접착으로 시작하여, 세포막들과 비리온 외피의 융합 및 바이러스 뉴클레오팝시드의 세포액 내부로의 방출이 후속된다. 바이러스 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 (RNAP, 'L' 단백질로도 공지됨)는 뉴클레오팝시드를 부분적으로 코팅하지 않으며 유전자들을 양성-가닥 mRNA들로 전사하고, 이후 이는 구조 및 비구조 단백질들로 번역된다. 도 2를 참조하라. RNAP는 유전체의 3' 말단에 위치한 단일 프로모터에 결합한다. 전사는 하나의 유전자 이후에 종결하거나 다음 유전자 하위흐름으로 지속되는데, 이는 유전체의 3' 말단에 가까운 유전자들이 가장 많은 양으로 전사되지만 유전체의 5' 말단을 향하는 유전자들은 가장 적게 전사되기 쉬움을 의미한다. 그러므로 유전자 순서는 간단하지만 효과적인 전사 조절 형태이다. 생성된 가장 많은 양의 단백질은 핵단백질 (NP)이고, 이의 세포 농도는 RNAP가 유전자 전사로부터 유전체 복제로 전환될 때 결정한다. 복제는 전장의 양성-가닥 항-유전체를 생성하고 이는 순차적으로 음성-가닥 바이러스 후대 유전체 복사본으로 전사된다. 새로이 합성된 구조 단백질들 및 유전체들은 자기-조립하여 세포막 내부 근방에 축적된다. 바이러스 입자들은 감염된 숙주 세포로부터 출아시 외피를 보유하게 되어, 성숙한 감염성 비리온을 생성한다.

[0012] 선행 백신 개발

[0013] 하나 이상의 필로바이러스 종들에 의한 감염에 대항하는 보호 면역을 유도할 수 있는 안전한 면역원성 백신을 개발하고자 시도하는 동안 많은 전략들이 평가되어 왔으나, 분명히 엇갈린 결과를 가져왔다. Marzi 및 Feldmann의 문헌에 개요가 요약되어 있다 (A. Marzi and H. Feldmann *Expert Rev. Vaccines* 13(4):521-531 (2014)). 예를 들어, 하나는 ZEBOV로부터 외피 당단백질을 발현시키고, 두 번째는 SEBOV로부터 외피 당단백질을 발현시키고, 세 번째는 ZEBOV로부터 핵단백질을 발현시키는, 3가지 DNA 플라스미드의 혼합물을 포함하는 3가 DNA 백신은 인간에서 세 가지 항원들 중 한가지 이상에 대해 안전하고 면역원성이었으며 항체 반응을 유도할 수 있었다. CD8+ T-세포 반응들은 백신접종 개체수의 1/3 보다 적은 수에서 검출되었다 (J.E. Martin 외., *Clin. Vaccine Immunol.* 13(11):1267-1277 (2006)). 유사하게, ZEBOV, SEBOV, 마르부르크-Ci67 (라타이작(Ratayczak) 균주), 마르부르크-무소케(Marburg-Musoke), 및 마르부르크-라븐(Marburg-Ravn)으로부터 외피 당단백질들, 뿐만 아니라 ZEBOV 및 마르부르크-무소케로부터 핵단백질들을 발현시키는 4개의 상이한 재조합 아데노바이러스의 혼합물을 포함하는 5가 아데노바이러스-기반 '팬-필로바이러스(pan-filovirus)' 복합 백신은, ZEBOV 또는 MARV 시험감염으로부터 비-인간 영장류 동물을 보호하였으며 두가지 유형의 바이러스 모두에 대하여 항체 반응을 유도하였으나, 이 백신이 임의의 CD8+ T-세포 반응을 유도하였는지 여부는 여전히 명확하지 않다 (D.L. Swenson 외., *Clin. Vaccine Immunol.* 15(3):460-467 (2008)).

[0014] ZEBOV로부터 외피 당단백질 또는 외피 당단백질과 핵단백질 두가지 모두를 발현시키는 재조합 파라믹소바이러스 - 인간 파라인플루엔자 바이러스, 혈청형 3 (HPIV3) -의 비강내 투여는 EBOV를 이용한 후속 시험감염으로부터 기니아피그를 보호하였다. 영장류 동물 중에서 설치류 모델은 종종 결과를 예측하기 어려우며, 설치류에서 효과적이었던 얼마간의 종래의 EBOV 백신 후보들은 전적으로 비-인간 영장류동물에 속하였다 (A. Bukreyev 외., *J. Virol.* 80(5):2267-2279 (2006)). 붉은털 원숭이들에서 ZEBOV로부터의 외피 당단백질을 발현시키는 임의의 구조체가 중간 정도의 면역원성을 띠었으며 ZEBOV를 이용한 백신접종 이후 ZEBOV를 이용한 시험감염 후 질병에 대해 상기 동물들 중 80% 이상을 보호하였음을 보여주었다 (A. Bukreyev 외., *J. Virol.* 81(12):6379-6388 (2007)). 마지막으로, 소수포구내염 바이러스 (VSV) 당단백질이 ZEBOV 외피 당단백질로 대체되어 있는 재조합 VSV는 50%의 기니아 피그를 보호하였으나, 이와 달리 24시간이 경과한 이후 늦게 처리한 마우스들 100%는 균일하게 치사감염되었다. 8마리의 히말라야 원숭이 중 4마리 (50%)는 노출 후 20 내지 30분간 에볼라 바이러스 감염에 대한 노출-후 치료 옵션을 제공하여 치료시 보호되었다(H. Feldmann, *PLoS Pathogens* 3(1):54-61 (2007)).

[0015] Geisbert 외.는 비인간 영장류동물에서 치사 EBOV 감염으로부터 마우스 또는 기니아 피그를 보호하였던 백신 전

략들의 효과를 평가하였다. 이들은 EBOV 당단백질 및 핵단백질을 발현시키는 베네수엘라 말 바이러스 (VEEV)의 약독화 균주로부터 유래한 RNA 복제단위 입자들, EBOV 당단백질을 발현시키는 재조합 백시니아 바이러스 (VACV), 지질 A 및 불활성화 EBOV를 함유하는 리포좀, 및 농축된, 불활성화 전(whole)-비리온 제제를 사용하였다. 이들은 이들 전략들 중 어떤것도 EBOV의 강력한 시험감염으로부터 비인간 영장류동물들을 성공적으로 보호하지 못했음을 발견하였다 (T.H Geisbert 외., *Emerging Infectious Diseases* 8(3):503-507 (2002)).

[0016] 다른 연구자들은 항원 반응을 유도하기 위하여 포유동물, 박테리아, 식물 또는 곤충 세포들에서 비-복제성 아단위 백신들로 발현되는 바이러스 유사 입자들 (VLP)을 사용하였다 (D.L. Swenson 외., *Vaccine* 23:3033-3042 (2005); K. L. Warfield 외., *JID* 196(2):430-437 (2007), N. Kushnir 외., *Vaccine* 31(1):58-83 (2012), K. L. Warfield ET AL., *PLOS ONE* 10(3):e0118881 (2015), K. L. Warfield and M.J. Aman *JID* 204:1053-1059 (2011), V.M. Wahl-Jensen 외., *J Virol.* 79(16):10442-10450 (2005), WO 2003/039477, WO 2006/046963, WO 2006/073422, WO 2004/042001, US 8,900,595, US 7,211,378). 그러나 필로바이러스 VLP는 비용-집약적이고 도전적인 제조 공정을 필요로하며 시간이 지남에 따라 주위 온도에서 보관될 필요가 있다.

[0017] 그러므로 상당한 시간 및 노력을 들인 후, 임상전 단계들에서 몇가지 가능성있는 백신 후보군들이 나타났으나, 현재 이용가능한 승인된 예방 백신은 없다. 필로바이러스 감염의 전염성 및 치사율을 고려하면, 효과적인 백신이 시급하게 필요하다.

발명의 내용

발명의 간단한 요약

[0019] 본 발명에서 복제 결손 및 복제 불능 백터들의 다양한 프라임-부스트 조합들은 필로바이러스 감염에 대한 효과적인 면역 보호를 생성함이 발견되었다.

[0020] 따라서, 본 발명의 한 일반적인 양태는 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:

[0021] a) 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0022] b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0023] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0024] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:

[0025] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0026] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0027] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0028] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0029] (a) 하나 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0030] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0031] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0032] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0033] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0034] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 백터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

- [0035] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.
- [0036] 한 추가 양태에서, 본 발명은 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 필로바이러스 단백질의 둘 이상의 항원 결정인자들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 (MVA) 벡터에 관한 것이다. 한편 또다른 양태에서, 본 발명은 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 필로바이러스 당단백질의 항원 단백질 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 벡터에 관한 것이다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 a) 서열번호:5, 서열번호:19 및 서열번호:30, b) 서열번호:5, 서열번호:19, 서열번호:28 및 서열번호:30 및 c) 서열번호:19 및 서열번호:33으로 구성된 군에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 벡터에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 상기 재조합 MVA 벡터를 포함하는 조성물, 상기 재조합 MVA 벡터를 포함하는 백신, 상기 재조합 MVA 벡터 및 제약상 담체, 희석제 및/또는 첨가제를 포함하는 제약상 조성물, 그리고 상기 재조합 MVA 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신으로 사용하기 위한 상기 재조합 MVA 벡터 및 상기 재조합 MVA 벡터를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 면역반응을 일으키는 방법에 관한 것이다. 한 추가 양태에서, 본 발명은 제 1 투여 (프라이밍)용 제 1 바이알 또는 용기 및 제 2 투여 (부스팅)용 제 2 바이알 또는 용기에 상기 재조합 MVA 벡터를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명은 또한 서열번호:26을 가지는 FPV-40K 프로모터의 제어 하에 필로바이러스 단백질 (예컨대, 상기 또는 하기 언급된 임의의 필로바이러스 단백질들, 바람직하게는 필로바이러스 외피 당단백질)의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 FPV 벡터에 관한 것이다. 한 추가 양태에서, 본 발명은 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 필로바이러스 단백질의 하나, 둘 또는 그 이상의 항원 결정인자들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 계두 바이러스 (FPV) 벡터에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 상기 재조합 FPV 벡터를 포함하는 조성물, 상기 재조합 FPV 벡터를 포함하는 백신, 상기 재조합 FPV 벡터 및 제약상 담체, 희석제 및/또는 첨가제를 포함하는 제약상 조성물, 그리고 상기 재조합 FPV 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신으로 사용하기 위한 상기 재조합 FPV 벡터 및 상기 재조합 FPV 벡터를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 면역반응을 일으키는 방법에 관한 것이다.
- [0038] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:
- [0039] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터; 및
- [0040] (b) 제약상 허용가능한 담체와 함께 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터;
- [0041] 여기서 상기 벡터들 중 하나는 프라이밍 백신이고 다른 하나의 벡터는 부스팅 백신이다.
- [0042] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:
- [0043] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터; 및
- [0044] (b) 제약상 허용가능한 담체와 함께 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 하나 이상의 추가 MVA 벡터;
- [0045] 여기서 상기 MVA 벡터들 중 하나는 프라이밍 백신이고 그 외 MVA 벡터들은 부스팅 백신이다.
- [0046] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:
- [0047] (a) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및
- [0048] (b) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 2 조성물;
- [0049] 또는
- [0050] (c) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA

벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및

[0051] (d) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 FPV 벡터를 포함하는 제 2 조성물;

[0052] 여기서 상기 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나의 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0053] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 필로바이러스에 대한 면역 반응 유도방법에 관한 것이다:

[0054] (a) 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0055] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0056] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0057] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 필로바이러스에 대한 면역 반응 유도방법에 관한 것이다:

[0058] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0059] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0060] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0061] 본 발명은 또한 다음 단계들을 포함하는, 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 재조합 MVA 벡터 생성 방법을 포함한다:

[0062] (a) 숙주 세포를 MVA 바이러스로 감염시키는 단계,

[0063] (b) 감염된 세포를 본 발명의 임의의 구체예들의 임의의 필로바이러스 단백질들의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질감염시키는 단계, 상기 핵산 서열은 MVA 바이러스 유전체로 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 통합을 유도할 수 있는 유전체 MVA 바이러스 서열을 추가로 포함하며, 그리고

[0064] (c) 생성된 재조합 MVA 바이러스의 식별, 분리 및 선택적 정제단계.

[0065] 또다른 구체예에서, 임의의 상기 구체예들의 재조합 MVA 벡터 생성 방법의 단계 a) 및 b)의 순서는 단계 b)가 첫번째 단계가 되고 단계 a)가 두번째 단계가 되도록 바뀔 수 있다.

[0066] 본 발명은 또한 다음 단계들을 포함하는, 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 재조합 FPV 벡터의 생성방법을 포함한다:

[0067] (a) 숙주 세포를 FPV 바이러스로 감염시키는 단계,

[0068] (b) 감염된 세포를 본 발명의 임의의 구체예들의 임의의 필로바이러스 단백질들의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질감염시키는 단계, 상기 핵산 서열은 FPV 바이러스 유전체로 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 통합을 유도할 수 있는 유전체 FPV 바이러스 서열을 추가로 포함하며, 그리고

[0069] (c) 생성된 재조합 FPV 바이러스의 식별, 분리 및 선택적 정제단계.

[0070] 또다른 구체예에서, 임의의 상기 구체예들의 재조합 FPV 벡터 생성 방법의 단계 a) 및 b)의 순서는 단계 b)가 첫번째 단계가 되고 단계 a)가 두번째 단계가 되도록 바뀔 수 있다.

[0071] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 필로바이러스에 대한 면역 반응 유도방법에 관한 것이다:

[0072] (a) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA

벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및

[0073] (b) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 2 조성물;

[0074] 또는

[0075] (c) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및

[0076] (d) 필로바이러스 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 FPV 벡터를 포함하는 제 2 조성물;

[0077] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0078] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 보호 면역 또는 보호 면역 반응 제공 방법에 관한 것이다:

[0079] (a) 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0080] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0081] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0082] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 보호 면역 또는 보호 면역 반응 제공 방법에 관한 것이다:

[0083] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0084] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0085] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0086] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 필로바이러스-유사 입자들의 제조 방법에 관한 것이다:

[0087] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 하나 이상의 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터; 및

[0088] (b) 제약상 허용가능한 담체와 함께 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터 또는 MVA 벡터;

[0089] 여기서 상기 벡터들 중 하나는 프라이밍 백신이고 다른 하나의 벡터는 부스팅 백신이다.

[0090] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 필로바이러스-유사 입자들의 제조 방법에 관한 것이다:

[0091] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 하나 이상의 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및

[0092] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터 또는 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0093] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나의 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0094] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여함에 의한 개체에서의 필로바이러스-유사 입자 제조를 포함하는, 개체에서 필로바이러스에 대한 증강된 면역 반응 유도방법에 관한 것이다:

[0095] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 하나 이상의 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 비리온

단백질 40 (VP40)의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터; 및

[0096] (b) 제약상 허용가능한 담체와 함께 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터 또는 MVA 벡터;

[0097] 여기서 상기 벡터들 중 하나는 프라이밍 백신이고 다른 하나의 벡터는 부스팅 백신이다.

[0098] 한 추가 양태에서, 본 발명은 다음을 개체에 투여함에 의한 개체에서의 필로바이러스-유사 입자 제조를 포함하는, 개체에서 필로바이러스에 대한 증강된 면역 반응 유도방법에 관한 것이다:

[0099] (a) 제약상 허용가능한 담체와 함께 하나 이상의 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물; 및

[0100] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터 또는 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0101] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

도면의 간단한 설명

도면의 간단한 설명

본 명세서의 일부에 포함되고 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부된 도면들은 본 발명의 몇가지 구체예들을 설명하며 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명한다.

도 1은 확인된 다양한 필로바이러스 균주들 사이의 관계를 도시하는 계통관계를 보여준다. 이 계통관계는 외피 당단백질 (GP) 유전자들의 코딩(coding) 부위들 및 최대 절약법을 이용하여 작성되었다. 마르부르크 바이러스의 라븐 및 라타이작(Ratayczak) 균주들 모두 23% 치사율을 가졌으나, 무소케 및 앙골라(Angola) 균주들은 50% 내지 88% 범위의 치사율을 가졌다. 수단 균주는 41-65% 치사율을 가졌으며, 자이르 균주는 57-90% 치사율을 가졌다. 코트디부아르 및 레스턴 균주들 모두는 아직 사람에서 질병을 유발하지 않았으나, 레스턴 균주는 돼지에서 질병을 유발하였다.

도 2는 필로바이러스 유전체의 구조 및 유전자 조직을 보여준다.

도 3A는 MVA-mBN252B의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. **도 3B**는 MVA-mBN226B의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. **도 3C**는 선별 표지를 포함하는 MVA-mBN254A의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. **도 3D**는 선별 표지를 포함하는 MVA-mBN368A의 구조 및 유전자 조직을 보여준다.

도 4A는 플라스미드 pBNX186의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 플랭크 1 (F1 IGR 88/89) 및 플랭크 2 (F2 IGR 88/89)는 IGR 88/89를 둘러싸는 MVA-BN의 서열들이다. F1 IGR 88/89 및 F2 IGR 88/89는 상동 재조합의 경우에 발현 카세트 및 선별 카세트 (NPT II 및 eGFP)를 MVA-BN으로 삽입하기 위해 사용된다. 재조합 바이러스의 선별을 가능하게 하기 위하여 대장균 약제 선별 유전자 네오마이신 인산기전달효소 (NPT II) 및 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP)은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 통해 연결되어 강한 합성 폭스바이러스 프로모터 (PrS)의 제어하에 삽입되었다. IGR 88/89의 F2 및 F2-반복 서열들은 선별 카세트를 플랭크하며, 이는 선택적 압력의 부재에서 상동 재조합을 통한 선별 카세트의 제거를 가능하게 한다.

도 4B는 플라스미드 pBNX197의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 플랭크 1 (F1 IGR 148/149) 및 플랭크 2 (F2 IGR 148/149)는 IGR 148/149를 둘러싸는 MVA-BN의 서열들이다. F1 IGR 148/149 및 F2 IGR 148/149는 상동 재조합의 경우에 발현 카세트 및 선별 카세트 (GPT 및 RFP)를 MVA-BN으로 삽입하기 위해 사용된다. 재조합 바이러스의 선별을 가능하게 하기 위하여 대장균 구아닌-잔틴-포스포리보실-전달효소 약제 선별 유전자 (GPT) 및 적색 형광 단백질 유전자 (RFP)를 강한 합성 폭스바이러스 프로모터 (PrS)의 제어하에 융합 유전자로서 삽입하였다. LoxP 서열들은 선별 카세트를 플랭크하며 선별 카세트의 Cre 재조합효소-매개 제거를 가능하게 한다. **도 4C**는 Cre 재조합효소를 발현시키는 플라스미드 pBN274의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. **도 4D**는 플라스미드 pBNX221의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 플랭크 1 (F1 IGR BamHI J 계두) 및 플랭크 2 (F2 IGR BamHI J 계두)는 삽입 부위 BamHI J를 둘러싸는 FPV 서열들이다. 상동 재조합의 경우 F1 IGR BamHI J 계두 및 F2 IGR BamHI J 계두는 발현 카세트 및 선별 카세트를 (GPT 및 RFP) FPV로 삽입하기 위해 사용된다. 재조합 바이러스의 선별을 가능하게 하기 위하여 대장균 구아닌-잔틴-포스포리보실-전달효소 약제 선별 유전자 (GPT) 및 적색 형광 단백질 유전자 (RFP)가 강한 합성 폭스바이러스 프로모터 (PrS)의 제어하에 융합 유전자로서 삽입되었다. LoxP

서열들은 선별 카세트를 플랭크하며 선별 카세트의 Cre 재조합효소-매개 제거를 가능하게 한다. 도 4E는 플라스미드 pBNX214의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 플랭크 1 (F1 IGR 148/149) 및 플랭크 2 (F2 IGR 148/149)는 IGR 148/149를 둘러싸는 MVA-BN의 서열들이다. F1 IGR 148/149 및 F2 IGR 148/149는 상동 재조합의 경우에 발현 카세트 및 선별 카세트 (GPT 및 RFP)를 MVA-BN으로 삽입하기 위해 사용된다. pBNX214는 이미 이식유전자들의 발현을 위한 PrS5E 프로모터를 포함한다. 재조합 바이러스의 선별을 가능하게 하기 위하여 대장균 구아닌-잔틴-포스포리보실-전달효소 약제 선별 유전자 (GPT) 및 적색 형광 단백질 유전자 (RFP)가 강한 합성 폭스바이러스 프로모터 (PrS)의 제어하에 융합 유전자로서 삽입되었다. LoxP 서열들은 선별 카세트를 플랭크하며 선별 카세트의 Cre 재조합효소-매개 제거를 가능하게 한다.

도 5A는 플라스미드 pBN433의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. GP-MARV-무소케를 프로모터 PrS의 제어하에 pBNX197의 BspEI/NheI 부위로 삽입하였다. 게다가 플라스미드는 loxP-플랭크된 선별 카세트 및 MVA-BN 유전체의 IGR 148/149를 플랭크시키는 MVA-BN DNA 서열들 또한 내포한다. loxP 부위들은 Cre 재조합효소-매개된 재조합에 의해 차후의 선별 카세트 제거를 가능하게 한다. 도 5B는 플라스미드 pBN384의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 에볼라 바이러스 자이르-마잉가 (GP-ZEBOV-Mayinga) 및 마르부르크 바이러스 무소케 (GP-MARV-Musoke)의 당단백질 유전자들은 프로모터들 Pr7.5 및 PrS의 제어하에 pBNX197의 MluI/NheI 부위들로 삽입되었다. 게다가 플라스미드는 loxP-플랭크된 선별 카세트 및 MVA-BN 유전체의 IGR 148/149를 플랭크시키는 MVA-BN DNA 서열들 또한 내포한다. loxP 부위들은 Cre 재조합효소-매개된 재조합에 의해 차후의 선별 카세트 제거를 가능하게 한다. 도 5C는 플라스미드 pBN385의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 에볼라 바이러스 수단의 당단백질 (GP-SEBOV) 및 에볼라 바이러스 아이보리 코스트의 핵단백질 (NP-EBOV-CdI)이 합성 프로모터들 PrS 및 PrLE1의 제어하에 pBNX186의 MluI/NheI 부위로 삽입되었다. 게다가, 상기 플라스미드는 또한 선택적 압력의 부재에서 상동 재조합을 통한 차후 선별 카세트의 제거를 가능하게 하기 위해 F2 및 F2rpt에 의해 플랭크된 선별 카세트 및 MVA-BN 유전체의 IGR 148/149를 플랭크하는 MVA-BN DNA 서열들을 내포한다. 도 5D는 플라스미드 pBN436의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 에볼라 바이러스 자이르-마잉가의 당단백질 유전자 (GP-ZEBOV-마잉가)는 PrS5E 프로모터의 제어하에 pBNX214의 BspEI/NotI 부위들로 삽입된다. 게다가 플라스미드는 loxP-플랭크된 선별 카세트 및 MVA-BN 유전체의 IGR 148/149를 플랭크시키는 MVA-BN DNA 서열들 또한 내포한다. loxP 부위들은 Cre 재조합효소-매개된 재조합에 의해 차후의 선별 카세트 제거를 가능하게 한다. 도 5E는 플라스미드 pBN555의 구조 및 유전자 조직을 보여준다. 에볼라 바이러스 자이르-마잉가의 당단백질 유전자 (GP-ZEBOV-마잉가)는 FPV-40K 프로모터의 제어하에 pBNX221의 MluI/NotI 부위들에 삽입되었다. 게다가, 플라스미드는 loxP-플랭크된 선별 카세트 및 FPV 유전체의 삽입 부위 BamHI J를 플랭크시키는 FPV DNA 서열들을 또한 내포한다. loxP 부위들은 Cre 재조합효소-매개된 재조합에 의해 차후의 선별 카세트 제거를 가능하게 한다.

도 6은 MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B)로 백신접종 후 ELISA로 측정한 시노몰구스 마카크에서의 GP에 대한 항체 수준을 보여준다. 동물들을 MVA-BN-Filo로 4주 간격으로 2회 (-42일 및 -14일) 백신접종하고, ELISA를 통한 분석을 위해 다음 간격으로 혈액을 채취하였다: 백신접종 전 (-42일, 적색 곡선 (1)), 제 1 백신접종 후 제 2 백신접종 전 (-14일, 녹색 곡선 (2)), 및 제 2 백신접종 후 (-5일, 오렌지색 곡선 (3)). 좌측 그래프는 혈청에서의 마르부르크 GP 특이적 항체들을 보여주고, 중앙의 그래프는 혈청에서의 에볼라 자이르 GP 특이적 항체들을 보여주며, 우측 그래프는 혈청에서의 에볼라 수단 GP 특이적 항체들을 보여준다. 마르부르크 앙골라 GP (좌측 그래프), 에볼라 자이르 GP (중앙 그래프), 또는 에볼라 수단 GP (우측 그래프)로 면역화된 시노몰구스 마카크의 고면역혈청이 각 ELISA에서 양성 대조로 사용되었다.

도 7은 MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B) 백신접종의 MARV-무소케 시험감염 이후 결과들을 보여준다. 도 7A는 MVA-BN-Filo의 백신접종이 MARV-무소케를 이용한 시험감염으로부터 동물들을 100% 보호했음을 보여준다. 도 7B는 시험감염-후 임상 점수를 보여주는데; MARV-무소케로 시험감염된 백신접종 동물들은 출혈열과 관련된 조직학적 변화 또는 증상들을 전혀 보이지 않았으며 간, 비장, 부신, 림프절, 또는 폐에 바이러스가 전혀 번식하지 않았다.

도 8은 이종 MVA/FPV 면역화 이후 항체 및 CD8 T 세포 반응을 보여준다. H-2K^{k+} B6CBA F1 마우스를 0일 및 21일에 5×10^7 TCID₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN354A, 도 3C 참조) 또는 FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPVmBN368A, 도 3D 참조)로 s.c. 면역화시켰다. A) 마우스들을 항체 분석을 위해 21일 및 41일에 채혈하였다. ZEBOV-GP-특이적 항체들의 평균 농도 +/- SEM을 나타낸다. B) 41일에, 마우스들을 죽이고 비장을 GP₅₇₇₋₅₈₄ 웨티드로 재자극 후 유세포 분석하였다. 비장 1개당 CD107a⁺, IFN-γ⁺ 및 TNF-α⁺ CD8 T 세포들의 절대수 $\times 10^4$ +/- SEM을 나타낸다. rMVA = 재조합 MVA-ZEBOV-GP (MVA-mBN254); rFPV = 재조합 FPV-ZEBOV-GP (FPV-mBN368).

도 9는 MVA/FPV를 이용한 마우스의 면역화 (s.c) 이후 ZEBOV-GP 특이적 CD8 T 세포 반응을 보여준다. 비장 1개 당 CD107a⁺, IFN-γ⁺ 및 TNF-α⁺ CD8 T 세포들의 절대수 $\times 10^4$ +/- SEM을 나타낸다. 1: MVA-mBN254/FPV-mBN368; 2: MVA-mBN226/FPV-mBN368, 3: MVA-mBN255/FPV-mBN368.

도 10은 실시예 6에 따라 0 연구일 및 28 연구일에 5×10^8 TCID₅₀ 용량의 MVA-BN-ZEBOV/GP (MVA-mBN254)로 (n=3), 5×10^8 TCID₅₀ 용량의 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255)으로 (n=3) 프라임-부스트 백신접종된 시노몰구스 마카크의 ZEBOV-GP 특이적 항체들을 보여준다. 결과들을 평균의 표준 오차 (SEM)와 함께 기하 평균 농도 (ng/ml)로 나타낸다.

도 11은 0 및 28 연구일에 그리고 5×10^8 TCID₅₀ 용량의 MVA-BN-ZEBOV/GP로 (n=2), 또는 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (5×10^8 TCID₅₀, n=2)로 3회 백신접종된 시노몰구스 마카크의 중성화 항체 반응들을 보여준다. 추가 동물들 (n=2)은 음성 대조군으로서 0 및 56 연구일에 TBS를 제공받았다. 혈청을 ZEBOV-GP-특이적 유사 비리온 중성화 검정으로 분석하였다. 결과들을 VSV를 발현시키는 ZEBOV-GP의 80%를 중성화시키는 개개 항체 역가로서 나타낸다.

도 12 A) 및 B)는 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255)로 감염된 HeLa 세포들에서의 필로바이러스-유사 입자들의 형성을 보여준다. A, B) MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (VLP) 및 MVA wt 감염된 HeLa 세포들의 투과 전자 현미경 (TEM) 분석. HeLa 세포들은 10 MOI의 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (A) 또는 BAC-유래 MVA-wt (B)로 감염되었으며 얇은 절편들을 만들어 TEM 처리하였다. 화살표: VLP의 횡단면을 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40에 의해 생성하였다. C)는 HeLa 세포들에서 GP 및 VP40의 (공동-) 발현의 면역탁본 분석을 보여준다. D)는 10 MOI의 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40로 2일간 감염된 HeLa 세포들의 상청액으로부터의 면역침강물 (C에 나타낸 바와 같은 동일한 상청액들의 분취물)의 면역탁본을 보여준다. VP40 및 GP는 무손상 VLP들에 존재하는 경우에만 공동-침강될 수 있었으며 트리톤-X-100 (1%)로 VLP 파괴 후에는 그렇지 않았다. 166: MVA-mBN166, 254: MVA-mBN254, 255: MVA-mBN255.

도 13은 특정 재조합 MVA/FPV 구조체들의 구조를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 본 발명의 상세한 설명

본 발명의 발명자들은 마르부르크 바이러스 (MARV) 당단백질 (GP)의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)를 포함하는 백신이 마르부르크 바이러스에 대해, 뿐만 아니라 천연두에 대해 보호 면역을 제공하기에 충분한 세포성 및 체액성 반응들 모두를 유도할 수 있는 필로바이러스 백신을 제공함을 발견하였다. 에볼라 바이러스 자이르 (ZEBOV) 당단백질 (GP), 에볼라 바이러스 수단 (SEBOV) 당단백질 (GP), 및/또는 EBOV 핵단백질 (NP)의 항원 결정인자를 인코딩하는 추가적인 이종 뉴클레오티드 서열들의 재조합 MVA로의 삽입은 MARV 및 EBOV 모두에 대해, 그리고 심지어는 MARV 및/또는 EBOV의 다수 균주들, 가령, 예를 들어, 에볼라 출혈열의 치사 형태와 관련된 두 가지 유형인 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV) 및 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)에 대해 면역 반응들을 유도할 수 있는 다가 백신을 제조한다. 그러므로 EBOV GP의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 벡터는 에볼라 균주들에 대한 매우 우수한 면역 반응들을 나타낸다. 더욱이, MVA 및 이의 유도체들 (예컨대, MVA-BN)의 탁월한 안전성 프로파일, 뿐만 아니라 다수의 이종 뉴클레오티드 서열들을 수용할 수 있는 이들의 능력은 초기 개발 단계들의 수많은 다중-성분 백신들과는 대조적으로 안전한 단일 성분 다가 팬-필로바이러스 백신의 제조를 가능하게 한다 (하기 내용 참조).

필로바이러스들에 대하여, 특히 MARV 및 EBOV에 대하여 비-인간 영장류동물에서 면역 반응을 생성하기 위한 선행 기술의 시도들이 실패하였음을 고려할 때, 본 발명은 놀라운 것이었다. 선행 기술이 개시한 내용 및 선행 기술에서 구현된 것들로부터 MVA-기반 백신이 필로바이러스 감염, 특히 MARV에 대해 비-인간 영장류동물에서 보호를 제공하는 면역 반응을 생성할 것임을 예상할 수 없었다. 물론, 본 발명의 발명자들에 의해 생성된 데이터 및 이들의 관찰내용로부터, MVA-기반 백신 또한 인간에서 면역 반응을 유도할 수도 있다고 결론내리는 것이 보다 타당하고 이치에 맞다. 실제로, FDA는 비-인간 영장류동물에서 보호를 제공하는 백신이 유사하게 인간에서도 적합하다는 증거로서 이들 비-인간 영장류동물 모델들을 인정한다.

본 발명의 발명자들은 또한 EBOV, 가령, 예를 들어, 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV) 및/또는 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이

러스 양카라 (MVA)를, EBOV, 예를 들어 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV) 및/또는 차이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 변형된 FPV와 조합하여 포함하는 백신접종 요법이 보호 면역을 제공하기에 충분한 세포성 및 체액성 반응들 모두를 유도할 수 있는 필로바이러스 백신을 제공함을 발견하였다.

[0107] 하기 연구에서 본 발명은, 이종 프라임 및 부스트로서 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질, 특히 필로바이러스 당단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터, 및 제1 필로바이러스 당단백질의 항원 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 계두 벡터의 사용이, 특히 MVA 벡터가 하나 이상의 프라임 조성물로서 사용되고 계두 벡터가 부스트 조성물로서 사용되었던 경우, 높은 수준의 항체 반응 그리고 최대 5-배 더 높은 세포독성 CD8 T 세포 반응의 유도에 의한 필로바이러스 면역원에 대한 보호 면역 반응을 생성함을 또한 발견하였다.

[0108] 재조합 MVA 및/또는 FPV는 일가, 즉, EBOV의 하나의 항원 결정인자를 인코딩하는 오직 하나의 이종 서열을 포함하는 일가, 또는 다가, 즉, EBOV의 항원 결정인자들을 인코딩하는 둘 이상의 이종 서열들을 포함하는 다가일 수 있다.

[0109] 그러므로 본 발명은 둘 이상의 필로바이러스 아형들, 특히 마르부르크 바이러스 및/또는 에볼라 바이러스 아형들에 의한 감염들에 대하여 이종 보호 또는 교차 보호를 부여하는 면역 반응을 생성함에 사용하기 위한 백신 또는 백신 조합물 및 둘 이상의 필로바이러스 아형들, 특히 마르부르크 바이러스 및/또는 에볼라 바이러스 아형들에 대한 백신 제조에 사용될 수 있는 백신 또는 백신 조합물들을 제공한다. 그러므로 필로바이러스들, 가령, 에볼라 차이르-마잉가 및 차이르-키크위트 및/또는 마르부르크-무소케 및 마르부르크-앙골라에 대한 교차-보호를 위한 백신들이 제공될 수 있다. 이제 필로바이러스의, 특히 ZEBOV의 하나 이상의 표면 당단백질을 인코딩하기 위한 그 외 다른 이종 뉴클레오티드 서열들과 함께 특정 항원들, 가령, ZEBOV의 VP40 단백질을 발현시키는 MVA 벡터를 이용한 면역화는, 이들의 표면에 필로바이러스 당단백질을 함유하는 필로바이러스-유사 입자들 예컨대, 에볼라 바이러스-유사 입자들을 생성할 수 있음이 최초로 발견된다. 이는 필로바이러스 GP의 세포 표면으로의 운반이 MVA에 의해 매우 억제되었음이 보고되었던 바 있기 때문에 예상밖의 것이었다 (Sanger 외. *J. Virol. Meth.* 81, 29-35 (2001)). 그러나 필로바이러스 입자 출이는 세포 표면에서 발생하기 때문에 (Noda 외., *PLoS Pathog.* 2(9):e99 (2006)) GP-함유 필로바이러스-VLP의 형성을 위한 효과적인 GP 표면 운반이 필요하다. 하기 본 발명의 연구에서 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40) 및 당단백질을 발현시키는 재조합 MVA, 예컨대, VLP를 제조할 수 있는 GP-ZEBOV-마잉가는 다양한 프라임-부스트 조합물을 이용하여 증강된 면역 반응을 유도하였으며 비-인간 영장류동물을 필로바이러스 감염에 대하여 보호하였다. 수행된 연구들은 또한 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40) 단백질을 발현시키는 재조합 MVA에만 기반한 상동 프라임-부스트가 비-인간 영장류동물에서 필로바이러스 감염에 대해 보호하였음을 보여줄 수 있었다.

[0110] 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 당단백질, 특히, 마르부르크 바이러스 및/또는 에볼라 바이러스의 당단백질을 인코딩하는 핵산, 및 이종 프라임 부스트로서 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를, 제 1 필로바이러스 당단백질의 항원 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 계두 벡터와 함께 사용하는 것은 증강된 CD8 T 세포 반응을 생성함이 추가로 발견되었다. 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 당단백질, 특히, 에볼라 바이러스의 당단백질을 인코딩하는 핵산 및 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 사용은, 예컨대, 프라이밍 이후 이미 비-인간 영장류동물에서 더 높은 중성화 항체 반응을 유도하였고 이는 부스팅 후 추가로 개선되었으므로, 하나 이상의 필로바이러스 감염, 특히, 차이르-마잉가 및 차이르-키크위트에 대한 면역 반응을 생성함 또한 밝혀졌다. 특정 항원들, 가령, 필로바이러스 당단백질과 함께 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)을 발현시키는 MVA 벡터를 이용한 면역화는 무손상 필로바이러스 비리온과 유사한 VLP의 전체 표면을 라이닝하는 필로바이러스 외피 당단백질을 발현시키는 VPL을 제조할 수 있음 또한 알아냈다. 이러한 방식에서, 필로바이러스 VP40 단백질을 인코딩하는 핵산의 MVA 벡터로의 흔입은 항원 단백질 또는 단백질들을 발현시키는 바이러스 벡터, 특히 MVA 벡터의 면역 반응을 증강시키는 것으로 나타났다.

[0111] 본 발명의 예시적인 구체예들을 참고하여 상세히 설명할 것이며, 이를 실시예들은 첨부된 도면에 도시된다.

재조합 MVA 바이러스

[0113] 한 양태에서, 본 발명은 필로바이러스 당단백질 (GP), 특히 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라 (MVA)를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 필로바이러스 당단백질, 특히 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열, 및

또다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 백터를 제공한다. MVA는 터키 앙카라 지방의 백신접종 기구에서 수년간 유지되었고 인간의 백신접종을 위한 기재로서 사용되었던 피부 백시니아 균주 앙카라의 닭 배아 섬유모세포에 대한 570회 이상의 연속 계대에 의해 생성되었다 (*Chorioallantois vaccinia virus Ankara virus, CVA; 검토를 위해 Mayr 외. (1975), Infection* 3: 6-14 참조). 그러나 종종 백시니아 바이러스들과 연관된, 심각한 백신접종-후 합병증들로 인해, 보다 약독화된, 보다 안전한 천연두 백신을 생성하기 위한 여러 시도들이 있었다.

[0114] 1960년에서 1974년의 시기 동안, Anton Mayr 교수는 CEF 세포들에서 570회 이상의 연속 계대에 의한 CVA 약독화에 성공하였다 (Mayr 외. (1975)). 생성된 MVA가 치명적이었음이 다양한 동물 모델들에서 나타났다 (Mayr, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41:225-234). MVA의 전-천연두 백신으로서의 초기 개발의 일부로서, 백시니아로부터 역반응을 일으킬 위험이 있는 개체들에서 Lister Elstree와의 조합에 MVA-517을 사용하는 임상 실험들이 있었다 (Stickl (1974), *Prev. Med.* 3:97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munch. Med. Wochenschr.* 113:1149-1153). 1976년에, MVA-571 시드 스트록으로부터 유래한 MVA (571번쨰 계대에 해당)는 독일에서 2단계 비경구 천연두 백신접종 프로그램에서 프라이머 백신으로서 등록되었다. 후속적으로, MVA-572는 대략 120,000명의 백인 개인들 (Caucasian individuals)에 사용되었으며, 상기 모집단 중에서 다수의 개체들은 백시니아 관련 합병증의 위험이 높았음에도 1세 내지 3세 사이의 다수의 어린이들에게서는 심각한 부작용들이 전혀 보고되지 않았다 (Mayr 외. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572는 유럽 동물 세포 배양 은행 (European Collection of Animal Cell Cultures)에 ECACC V94012707로서 기탁되었다.

[0115] MVA를 약독화시키기 위해 사용된 계대의 결과로, CEF 세포들에서 수행된 계대 수에 따라 수많은 상이한 균주들 또는 분리주들 (isolates)이 존재한다. 예를 들어, MVA-572는 천연두 근절 프로그램 동안 독일에서 전-백신으로서 소량으로 사용되었으며, MVA-575는 수의학관련 백신으로서 광범위하게 사용되었다. MVA 뿐만 아니라 MVA-BN은 선조 CVA 바이러스에 비해 유전체의 대략 13% (6개 구역으로부터 26.6 kb)가 없다. 이러한 결실은 수많은 독성의 숙주 범위 유전자들 뿐만 아니라 A형 봉입체들에 영향을 준다. MVA-575는 2000년 12월 7일 유럽 동물 세포 배양 은행 (ECACC)에 기탁 번호 V00120707로 기탁되었다. 약독화 CVA-바이러스 MVA (변형된 백시니아 바이러스 앙카라)는 일차 닭 배아 섬유모세포에 대한 CVA의 계대 배양 (570 회 이상의 계대)에 의해 얻었다.

[0116] 비록 Mayr 등이 1970년대 동안 MVA가 인간 및 포유동물들에서 매우 약독화되며 치명적임을 입증하였으나, 일부 연구자들은 포유동물 및 인간 세포주들에서 잔여 복제가 발생할 수 있었음을 이유로 이들 세포들에서 MVA가 완전히 약독화되는 것은 아님을 보고하였다 (Blanchard 외. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211; U.S. Patent No. 5,185,146; Ambrosini 외. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569). 이들 문헌들에서 보고된 결과들은 다양한 MVA의 공지 균주들을 이용하여 얻어졌던 것으로 추정되는데, 왜냐하면 사용된 바이러스들이 이들의 성질들, 특히 다양한 세포주들에서 이들의 성장 거동에 있어 본질적으로 상이하였기 때문이다. 이러한 잔여 복제는 인간에서의 사용과 관련된 안전성 문제를 비롯한 다양한 이유들로 인해 바람직하지 않다.

[0117] 보다 안전한 생성물, 가령, 백신 또는 약의 개발을 위한 증강된 안전성 프로파일을 가지는 MVA 균주들이 Bavarian Nordic사에 의해 개발되었다: MVA는 Bavarian Nordic사에 의해 추가 계대되었으며 MVA-BN으로 표시된다. 대표적이고 바람직한 MVA-BN 샘플이 2000년 8월 30일 유럽 동물 세포 배양 은행 (ECACC)에 기탁 번호 V00083008로 기탁되었다. MVA-BN은 WO 02/42480 (US 2003/0206926) 및 WO 03/048184 (US 2006/0159699)에 또한 기재되어있으며, 이들 모두는 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

[0118] MVA-BN은 바이러스-인코딩된 유전자들이 매우 효과적으로 발현되는 인간 세포들에 부착되어 유입할 수 있다. MVA-BN은 일차 닭 배아 섬유모세포 (CEF)에 강력하게 적응되며 인간 세포들에서 복제하지 않는다. 인간 세포들에서, 바이러스 유전자들은 발현되며 감염성 바이러스는 전혀 생성되지 않는다. MVA-BN은 미국의 질병 관리 및 예방 센터에 따르면 생물안전 1등급 유기체로 분류된다. MVA-BN 및 유도체들의 제제는 많은 유형들의 동물들, 및 면역-결핍 개인들을 비롯한 2000명 이상의 인간 개체들에 투여되어 왔다. 모든 백신접종들은 일반적으로 안전하고 내성이 좋은 것으로 밝혀졌다. 높은 약독화 및 감소된 독성에도 불구하고, 임상전 연구들에서 MVA-BN은 MVA 유전체로 클로닝된 유전자들에 의하여 인코딩된 이종 유전자 생성물들에 대해 그리고 백시니아에 대해 체액성 및 세포성 면역 반응들 모두를 유도하는 것으로 나타났다 (E. Harrer 외. (2005), *Antivir. Ther.* 10(2):285-300; A. Cosma 외. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola 외. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14(14):1347-1360; M. Di Nicola 외. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10(16):5381-5390).

[0119] MVA의 "유도체" 또는 "변이체"는 본출원에 기재된 바와 같이 MVA와 본질적으로 동일한 복제 특성들을 보이지만

이들의 유전체들 중 하나 또는 그 이상의 부분들에 있어서 차이점을 보이는 바이러스를 의미한다. MVA-BN 뿐만 아니라 MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 인간 및 마우스에서, 그리고 심한 면역 억제 마우스에서 조차도 생체내 생식적 복제를 하지 못한다. 더욱 구체적으로는, MVA-BN 또는 MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 바람직하게는 또한 닭 배아 섬유모세포 (CEF)에서 생식 복제 능력을 가지지만, 인간 각질형성세포 세포주 HaCaT(Boukamp 외 (1988), *J. Cell Biol.* 106:761-771), 인간 골육종 세포주 143B (ECACC 기탁번호. 91112502), 인간 배아 신장 세포주 293 (ECACC 기탁번호. 85120602), 및 인간 자궁경부 선암종 세포주 HeLa (ATCC 기탁번호. CCL-2)에서는 생식 복제 능력이 없다. 추가적으로, MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 HeLa 세포들 및 HaCaT 세포주들에서의 MVA-575 보다 2배 이상 작은, 보다 바람직하게는 3배 작은 바이러스 증폭비를 가진다. MVA 변이체의 이러한 성질들에 관한 테스트 및 분석은 WO 02/42480 (US 2003/0206926) 및 WO 03/048184 (US 2006/0159699)에 기재되어 있다.

- [0120] 용어 "생식적 복제를 할 수 없는" 또는 "생식적 복제 능력이 없는"은, 예를 들어, WO 02/42480에 기재되어 있으며, 이는 또한 상기 언급된 바람직한 성질들을 가지는 MVA를 얻는 방법을 개시하고 있다. 이 용어는 WO 02/42480 또는 미국 특허 제 6,761,893호에 기재된 분석법들을 이용하여 감염 4일 후에 1 미만의 바이러스 증폭비를 가지는 바이러스에 적용된다.
- [0121] 용어 "생식적으로 복제할 수 없음"은 감염 4일 후에 1 미만의 바이러스 증폭비를 가지는 바이러스를 의미한다. WO 02/42480 또는 미국 특허 제 6,761,893호에 기재된 분석법들은 바이러스 증폭비의 결정에 이용가능하다.
- [0122] 바이러스의 증폭 또는 복제는 일반적으로 첫번째 구역에서 세포를 감염시키기 위하여 원래 사용된 양 (입력값)에 대한 감염된 세포로부터 생성된 바이러스 (출력값)의 비율로 표현되고 "증폭비"로 언급된다. 증폭비 "1"은 감염된 세포들로부터 생성된 바이러스의 양이 세포들을 감염시키기 위해 초기에 사용된 양과 동일한 증폭 상태를 정의하며, 감염된 세포들은 바이러스 감염 및 생식에 허용성임을 의미한다. 대조적으로, 1 미만의 증폭비, 즉, 입력값 수준에 비해 출력값이 감소한 증폭비는 생식적 복제가 부족하고 그에 따른 바이러스의 약독화를 나타낸다.
- [0123] MVA-기반 백신의 이점들에는 이의 안전성 프로파일 뿐만 아니라 대규모 백신 제조 가능성이 포함된다. 임상전 테스트들은 MVA-BN이 그 외 MVA 균주들에 비해 보다 우수한 약독화 및 효능을 나타냄을 밝혀냈다 (WO 02/42480). MVA-BN 균주들의 또 다른 성질은 DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 요법과 비교할 때 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 요법에서 동일한 수준의 면역성을 실질적으로 유도할 수 있는 능력이다.
- [0124] 본 출원에서 가장 바람직한 구체예인 재조합 MVA-BN 바이러스는 포유동물 세포들에서의 이들의 뚜렷한 복제 결핍 및 이들의 확립된 비독성으로 인해 안전한 것으로 생각된다. 더욱이, 이의 효능 이외에도, 산업적 규모의 제조 실현성이 유익할 수 있다. 추가적으로, MVA-기반 백신들은 다수의 이종 항원들을 전달하여 체액성 및 세포성 면역을 동시에 유도할 수 있다.
- [0125] 한 바람직한 구체예에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위하여 사용되는 임의의 구체예들의 재조합 MVA 벡터는 닭 배아 섬유모세포 (CEF)에서 시험관내 생식적 복제 능력을 가지지만 인간 각질형성세포 세포주 HaCat, 인간 골육종 세포주 143B, 인간 배아 신장 세포주 293, 및 인간 자궁경부 선암종 세포주 HeLa에서는 생식적 복제 능력이 없는 MVA-BN 바이러스 또는 유도체이다.
- [0126] 또 다른 구체예에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위하여 사용되는 임의의 구체예들의 재조합 MVA 벡터는 유럽 동물 세포 배양 은행 (ECACC)에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN이다.
- [0127] 본 발명에 유용한 MVA 벡터들은 해당 기술분야에 공지된 방법들, 가령, WO 02/042480 및 WO 02/24224에 기재된 방법들을 사용하여 제조될 수 있으며, 이를 모두는 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.
- [0128] 또 다른 양태에서, 재조합 바이러스의 생성에 적합한 MVA 바이러스 균주는 균주 MVA-572, MVA-575 또는 임의의 유사 약독화 MVA 균주일 수 있다. 또한 돌연변이 MVA, 가령, 결실된 융모요막 백시니아 바이러스 앙카라 (dCVA)가 적합할 수 있다. dCVA는 MVA 유전체의 del I, del II, del III, del IV, del V, 및 del VI 결실 부위들을 포함한다. 이 부위들은 다수의 이종 서열들의 삽입에 특히 유용하다. dCVA는 인간 세포주 (가령, 인간 293, 143B, 및 MRC-5 세포주들)에서 (10 보다 큰 증폭비로) 생식적으로 복제할 수 있고, 그 후 바이러스-기반 백신접종 전략에 유용한 또 다른 돌연변이에 의하여 최적화 가능하다 (WO 2011/092029 참조).
- [0129] 재조합 FPV

- [0130] 한 양태에서, 본 발명은 필로바이러스 당단백질 (GP), 특히 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 FPV를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 필로바이러스 당단백질, 특히 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열, 및 또 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 FPV를 제공한다.
- [0131] 본 발명에 따른 FPV는 조류폭스바이러스 속에 속하는 원형 종들이다. 수많은 FPV 균주들이 설명되어 있으며 예를 들어 CEVA Laboratories, Cynamid Webster, Fort Dodge, Intercontinental Laboratories, Intervet (NOBILIS VARIOLE), Merial (DIFTOSEC CT 균주), Schering-Plough, Select Laboratories, Solvay, Syntro-Zeon 및 Vineland Laboratories로부터 이용가능하다. FP1은 1일령의 닭에서 백신으로 사용되는 변형된 Duvette 균주이다. 상기 균주는 1980년 10월 0 DCEP 25/CEP67/2309로 표기된 시판 계두 바이러스 백신 균주이며 Institute Merieux Inc.사로부터 구입가능하고, FP5는 Wisconsin주 Madison의 American Scientific Laboratories (Division of Schering Corp.)의, United States Veterinary License No. 165로부터, 일련번호 30321로 구입가능한 닭 배아 유래의 시판 계두 바이러스 백신 균주이다. 다양한 계두 바이러스의 약독화 균주들은 공지인데, 가령, 호주 Cyanamid Websters PtY, Ltd로부터 수득할 수 있는 가령, FPV M (마일드 백신 균주) 및 FPV S (표준 백신 균주)가 있다. 미국 농무부 (USDA) 시험감염 균주는 C.L. Afonso 외., *J. Virol.* 74(8):3815-3831 (2000), 74(8):3815-3831 (2000)에 추가로 설명되어 있다. FP9는 IAH Houghton Laboratories (St Ives, UK)의 Tomeley, Binns, Bourne 및 Brown에 의해 1980년대 후반에 수득된 백신 목적으로 사용되는 계두 균주이다. HP1 (A. Mayr & K. Malicki (1966), *Zentralbl Veterinarmed* (B) 13:1-13, Skinner 외. (2005), *Expert Res. Vaccines* 4(1):63-76)로부터 닭 배아 섬유모세포 (CEF) 배양에서 438회 계대된 바이러스의 플라크 정제(plaque purification)로부터 유도되었다. 그 외 약독화 균주들은 S. Jenkins 외. (1991), *Aids Research and Human Retroviruses* 7(12):991:998에 기재된 POXVAC-TC가 있다. 기탁된 균주들은, 예를 들어, 계두 바이러스 ATCC® VR-229 (1928년 이전 뉴저지주의 닭볏으로부터의 전형적인 계두 옴(fowlpox scabs)) 및 계두 바이러스 ATCC® VR-250 (닭, 켄터키주, 1950)을 포함한다.
- [0132] 또 다른 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기에 적합한 FPV 바이러스 균주는 상기 언급한 임의의 균주 또는 임의의 유사 FPV 균주일 수 있다. 또 다른 양태에서, FPV는 FP1, FP5, FP9, FPV M, FPV S, ATCC® VR-229, ATCC® VR-250, USDA 균주 및 POXVAC-TC의 균에서 선택된다. 또한 또 다른 구체예에서, 임의의 구체예들의 FPV는 약독화 FPV이다.
- [0133] FPV의 이점은, 이 바이러스가 백시니아 바이러스와 면역학적으로 비-교차-반응성이므로 천연두를 앓았던 인간들에서의 기존의 면역성을 벗어날 수 있는 반면, 조류 종들에서만 질병을 유발함에도 포유동물 세포들에 유입하여 이식유전자들을 발현시킬 수 있다는 점이다.
- [0134] 재조합 FPV를 생성하기에 적합한 재조합 FPV 벡터들은 확립된 방법들에 의해 구조화될 수 있다. 생 약독화 계두 바이러스들은 조류 세포들에서 다수의 바이러스 계대에 의해 제조될 수 있다. FPV 벡터들의 준비는, 예를 들어 Michael J.P. Lawman and Patricia D. Lawman (eds.) *Cancer Vaccines: Method and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1139, Chapter 32 Paul M. Howley, Kerrilyn R. Diener and John D. Hayball p.407-427에 기재되어 있다. 바이러스-기반 백신접종 전략에 유용한 재조합 FPV의 생성은 또한 EP 0 284 416 B1, WO 88/02022, WO 89/03429, WO 89/03879, WO89/07644, WO 89/12684, WO 90/02191, WO 91/02072, WO 89/03879 및 WO 94/019014에 기재되어 있다. 유전체 서열 및 유전체 조직화는 Afonso 외. 및 Laidlaw 및 Skinner (C.L. Afonso 외. (2000), *J. Virol.* 74(8):3815-3831, S.M. Laidlaw and M.A. Skinner (2004), *Journal of General Virology* 85:305-322)에 기재되어 있다. FPV의 예시적 유전체 서열은 GenBank 등록번호. AF198100.1에서 찾을 수 있다.
- [0135] **항원 결정인자**
- [0136] 용어 "항원 결정인자"는 숙주의 면역계를 자극하여, 세포성 반응이든 또는 체액성 항체 반응이든 항원-특이적 면역 반응을 일으키는 임의의 분자를 의미한다. 항원 결정인자들은, 여전히 숙주에서 면역 반응을 이끌어내고 항원의 일부를 형성하는 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원, 및 에피토프, 단백질, 폴리펩티드, 및 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프의 유사체 또는 변이체를 포함할 수 있으며 이러한 유사체 또는 변이체에는 예를 들어, 당화된 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프, 및 이러한 분자들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열들이 포함된다. 그러므로 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프는 특정 고유 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들에 제한되지 않으나 고유 서열과 동일한 서열들 뿐만 아니라 고유 서열에 대한 변형들, 가령, 결실, 부가, 삽입 및 치환도 포함한다.

- [0137] 용어 "에피토프"는 B- 및/또는 T-세포들이 단독으로 또는 다른 단백질, 가령, 예를 들어, 주조직 적합 복합체 ("MHC") 단백질 또는 T-세포 수용체와 결합하여 반응하는 항원상의 부위를 의미한다. 에피토프는 단백질의 2차 및/또는 4차 폴딩에 의해 나란히 놓인 불연속 아미노산 또는 연속 아미노산들 모두로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산들로부터 형성된 에피토프들은 통상적으로 변성 용매들에 대한 노출시 유지되지만, 4차 폴딩에 의해 형성된 에피토프들은 통상적으로 변성 용매들로의 처리시 소실된다. 에피토프는 통상적으로 특유의 공간적 입체 형태에서 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상 또는 그 이상의 아미노산들 - 일반적으로 20개 미만의 아미노산들 -을 포함한다. 에피토프들의 공간적 입체형태를 결정하는 방법들에는, 예를 들어, x-선 결정학 및 2차원 핵자기공명이 포함된다. 예컨대, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)에서 "Epitope Mapping Protocols"를 참조하라.
- [0138] 바람직하게는, 유사체 또는 변이체는 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 수준에서 기준 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프와 약 50%, 약 60% 또는 65%이상, 약 70% 또는 75%이상, 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 이상, 더욱 통상적으로, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상 그리고 더더욱 통상적으로 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상, 가장 통상적으로, 약 99% 이상의 동일성을 가진다.
- [0139] 핵산들과 아미노산들 간의 서열 동일성을 결정하는 기술들은 해당 기술 분야에 공지되어 있다. 둘 이상의 서열들은 "동일성 백분율"을 결정하여 비교될 수 있다. 2개 서열들, 핵산 또는 아미노산 서열들의 동일성 백분율은, 2개의 정렬된 서열들 간의 일치 정합수(exact matches)를 더 짧은 서열들의 길이로 나누고 100을 곱한 것이다.
- [0140] 본 출원에 기재된 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프에 관한 "아미노산 서열 동일성 백분율 (%)"은, 필요에 따라 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하기 위하여 상기 서열들을 정렬하고 캡을 도입시킨 후, 그리고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 기준 서열에 있는 아미노산 잔기들 (즉, 서열이 유래되는 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 또는 에피토프)과 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기들의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 해당 기술 분야의 통상의 지식에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 배포되는 컴퓨터 소프트웨어, 가령, BLAST, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 이루어질 수 있다. 해당 기술분야의 숙련된 기술자는 비교되는 서열들의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수들을 결정할 수 있다.
- [0141] 동일한 원리가 "뉴클레오티드 서열 동일성 백분율 (%)"에 준용된다.
- [0142] 예를 들어, 핵산 서열들에 대한 적절한 정렬은 Smith 및 Waterman, (1981)의 국소적 상동성 알고리즘, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 미국 Washington, D.C.의 National Biomedical Research Foundation이 펴낸 Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358에 의해 개발되고, Gribskov (1986), *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763에 의해 정규화된 점수 행렬을 사용함으로써 아미노산 서열들에 적용될 수 있다. 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위한 이러한 알고리즘의 예시적인 실행은 "BestFit" 실용신안 출원에서 Genetics Computer Group (Madison, Wis.)에 의해 제공된다. 이 방법의 기본 매개변수들은 Wisconsin 서열 분석 패키지 프로그램 매뉴얼, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, Wis.으로부터 구입가능)에 기재되어 있다. 본 발명의 내용에서 동일성 백분율을 정하는 바람직한 방법은 University of Edinburgh이 판권을 소유하고, John F. Collins 및 Shane S. Sturrok이 개발하고, IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, California)사가 배포한 MPSRCH 프로그램 패키지를 사용하는 것이다. 이 패키지 모음에서, 기본 매개변수가 점수표에 사용되는 (예를 들어, 캡 개시 폐널티는 12, 캡 연장 폐널티는 1, 및 캡은 6) Smith-Waterman 알고리즘을 이용할 수 있다. 생성된 데이터로부터 "정합(Match)"값은 "서열 동일성"을 반영한다. 서열들 간의 동일성 또는 유사성 백분율을 계산하는 그 외 적합한 프로그램들은 일반적으로 해당 기술분야에 공지이며, 예를 들어, 또다른 정렬 프로그램은 기본 매개변수와 함께 사용되는 BLAST가 있다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 기본 매개변수를 사용하여 이용될 수 있다: 유전 부호=표준; 필터=없음; 가단=모두; 컷오프=60; 기대값=10; 매트릭스=BLOSUM62; 디스크립션=50 서열들; 분류=HIGH SCORE; 데이터베이스=비다중(non-redundant), GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+ GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. 이들 프로그램들의 상세내용은 다음 인터넷 주소에서 찾을 수 있다: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.
- [0143] 일부 구체예들에서, 이종 핵산은 전체 항원 단백질보다는 항원 도메인 또는 항원 단백질 절편을 인코딩한다. 이

들 절편은 항원성 또는 면역원성이 되기에 충분한 임의의 길이일 수 있다. 절편은 8개 이상의 아미노산 길이, 바람직하게는 10-20개 아미노산일 수 있으나, 보다 길 수도 있는데, 가령, 예컨대, 50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000개 이상의 아미노산 길이, 또는 이들 사이의 임의의 길이일 수 있다.

[0144] 일부 구체예들에서, 항원 단백질 절편 또는 이의 면역원성 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 절편이 본 발명의 바이러스 벡터에 삽입된다. 또 다른 구체예에서, 상이한 항원 단백질들을 인코딩하는 약 2-6개 상이한 핵산들이 하나 또는 그 이상의 바이러스 벡터들에 삽입된다. 일부 구체예들에서, 다양한 단백질들의 다수의 면역원성 절편 또는 아단위들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 단백질의 상이한 부위들로부터의 또는 동일한 군주의 상이한 단백질들로부터의, 또는 상이한 군주들로부터의 단백질 상동유전자로부터의 여러개의 상이한 에피토프들이 벡터들로부터 발현될 수 있다.

정의

[0145] 본 출원에서 사용되는 단수형태 "하나" 및 "그것"은 내용상 명확히 달리 언급이 없는 한 복수의 언급을 포함함을 유의하여야 한다. 그러므로, 예를 들어, "하나의 항원 결정인자"에 대한 언급은 하나 이상의 항원 결정인자들을 포함하며 "그 방법"에 대한 언급은 본 출원에 기재된 방법들에 대해 변형 또는 치환될 수 있는, 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진자들에게 공지된 균등한 단계들 및 방법들에 대한 언급을 포함한다.

[0146] 달리 언급이 없는 한, 일련의 요소들 앞에 오는 용어 "~이상"은 그 일련의 요소들에 있는 각 요소를 의미하는 것으로 이해하여야 한다. 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들은 통상적인 실험을 통해 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 구체예들에 대한 많은 균등예들을 인식 또는 알 수 있을 것이다. 이러한 균등예들은 본 발명에 포함되는 것으로 한다.

[0147] 본 명세서 및 하기 청구범위를 통해, 내용상 달리 요구되지 않는 한, 용어 "포함하다", 및 이의 변형들, 가령 "포함하다" 및 "포함하는"은, 언급된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 군을 포함함을 의미하지만 임의의 그 외 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 제외시키지 않음이 이해될 것이다. 본 출원에서 용어 "포함하는"이 사용될 경우, 이는 용어 "함유하는" 또는 "비롯한"으로 치환될 수 있거나 때때로 용어 "가지는"과 함께 사용될 경우도 있다. 본 발명의 한 양태 또는 구체예의 내용에서 임의의 전술한 용어들 (포함하는, 함유하는, 비롯한, 가지는)이 본 출원에서 사용될 경우엔 언제나, 바람직하지 못할 수 있으나 용어 "~로 이루어진"으로 치환될 수 있다.

[0148] "~로 이루어진"이 본 출원에서 사용될 경우 이는 청구범위 요소에 특정되어 있지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 제외시킨다. "실질적으로 ~로 이루어진"이 본 출원에서 사용될 경우 이는 청구범위의 기본적이고 신규한 특성들에 물질적으로 영향을 주지 않는 물질들 또는 단계들을 제외시키지 않는다.

[0149] 본 출원에서 사용되는, 언급된 다수의 요소들 사이의 접속어 "및/또는"은 개별적인 그리고 조합된 선택사항들 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 요소들이 "및/또는"에 의해 이어질 경우, 제 1 선택사항은 제 2 요소 없이 제 1 요소를 적용함을 의미한다. 제 2 선택사항은 제 1 요소 없이 제 2 요소를 적용함을 의미한다. 제 3 선택사항은 제 1 및 제 2 요소들을 함께 적용함을 의미한다. 이를 선택사항들 중 임의의 하나는 상기 의미에 속하므로, 본 출원에서 사용되는 용어 "및/또는"의 요구사항을 만족시키는 것으로 이해된다. 상기 선택사항들 중 하나 이상을 동시에 적용하는 것 또한 상기 의미에 속하므로 용어 "및/또는"의 요구사항을 만족시키는 것으로 이해된다.

[0150] 본 명세서의 내용 전반에 걸쳐 여러 문헌들이 인용된다. (모든 특허, 특히 출원, 과학 간행물들, 제조업자의 상세설명, 지시사항 등을 비롯하여) 본 출원에 상기 또는 하기 인용된 문헌들 각각은 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. 참고문헌으로 포함되는 문헌이 본 명세서와 모순되거나 본 명세서와 일관되지 않는 경우, 본 명세서가 이러한 임의의 문헌보다 우선할 것이다. 본 출원에서 어떤것도 본 발명이 이러한 개시내용을 선행 발명 보다 선행시키는 것에 대한 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0151] 본 발명의 필로바이러스 항원 단백질들의 내용에서 용어 "실질적으로 유사한"은 폴리펩티드가 10-20개 아미노산의 비교 구간에 걸쳐 기준 서열에 대하여 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 가진 서열을 포함함을 나타낸다. 서열 동일성의 백분율은 비교 구간에 걸쳐 최적으로 정렬된 2개의 서열들을 비교하여 결정되는데, 여기서 비교 구간에 있는 폴리뉴클레오티드 서열 부분은 상기 2개 서열들의 최적 정렬을 위한 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 기준 서열과 비교할 때 부가 또는 결실 (즉, 캡)을 포함할 수 있다. 백분율은 두가지 서열들 모두에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 존재하는 위치들의 수를 결정하여 정합되는 위치들의 수를 산출하고, 정합되는 위치들의 수를 비교구간에 있는 총 위치들의 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열

동일성의 백분율을 산출하여 계산된다.

[0153]

본 출원에서 용어 "아형"은 "종"으로 대체될 수 있다. 아형은 임의의 필로바이러스, 가령, 마르부르크 또는 에볼라 바이러스의 균주, 분리주, 클레이드 또는 변이체를 포함한다. 용어 "균주" "클레이드" 또는 "분리주"는 미생물 분류학과 관련된 기술자들에게 널리 공지된 기술 용어들이다. 상기 분류학적 시스템은 지금까지 특성화된 모든 미생물을 과, 속, 종, 균주의 계층적 순서로 분류한다 (Fields B. N., Lippincott-Raven Publishers의 Fields Virology, 4th edition 2001). 과의 구성원들에 관한 기준은 이들의 계통발생적 관계인 반면, 속은 공통 특징들을 공유하는 모든 구성원들을 포함하며, 종은 복제 계통을 구성하고 특정한 생태학적 소재를 차지하는 복합적 클래스로서 정의된다. 용어 "균주" 또는 "클레이드"는 기본 형태 또는 유전체 구조 및 조직화와 같은 공통 특징들을 공유하나, 숙주 범위, 조직 친화성, 지리학적 분포, 약독화 또는 병원성과 같은 생물학적 성질들에 있어 달라지는 미생물, 즉, 바이러스를 나타낸다. 예를 들어, 5개의 공지된 에볼라 바이러스 아형들, 즉, 자이르 에볼라 바이러스, 수단 에볼라 바이러스, 레스턴 에볼라 바이러스, 분디부교 에볼라 바이러스 및 아이보리 코스트 에볼라 바이러스가 존재한다. 자이르 에볼라 바이러스 균주들은 예를 들어, 자이르-마잉가, 자이르-키크 위트, 자이르-가봉 (1994), 자이르-가봉 (Feb. 1996), 자이르-가봉 (Oct. 1996)이 있다. 오직 하나의 마르부르크 바이러스 아형 또는 종, 즉, 마르부르크-무소케 및 마르부르크-앙골라를 포함하는 균주들로 지금까지 알려져 있는 Victoria 호수 마르부르크바이러스가 존재한다. 또다른 균주들 또는 분리주들에 관하여 또한 도 1을 참조하라.

[0154]

용어 "TCID₅₀"는 "조직 배양 감염량"의 약어인데, 이는 접종된 세포 배양물의 50%에서 병리학적 변화를 생성하게 되는 병원성 제제의 양이며 TCID_{50/ml}로 표현된다. TCID₅₀를 결정하는 방법은 해당 기술분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지되어 있다. 이 방법은 예를 들어, 예컨대, WO 03/053463의 실시예 2에 기재되어 있다.

[0155]

본 출원에서 사용되는 용어 "개체"는 예를 들어, 인간, 비-인간 포유동물 및 (비-인간) 영장류동물을 비롯한, 살아있는 다세포 척추동물 유기체이다. 용어 "개체"는 본 출원에서 용어 "동물"과 호환적으로 사용될 수 있다.

[0156]

임의의 구체예들에서 언급되는 용어 "필로바이러스-유발 질병"은 본 출원에서 언급한 임의의 필로바이러스 균주, 분리주 또는 이의 변이체 또는 (상기 또는 하기 임의의 부분에서 및/또는 상기 또는 하기 임의의 구체예들에서 언급된) 임의의 필로바이러스 균주, 분리주 또는 이의 변이체의 임의의 조합의 감염에 의해 유발되는 임의의 질병일 수 있다.

[0157]

본 출원에서 사용되는 용어 "증강된"은 필로바이러스에 대한 면역 반응, 가령, (예컨대, 항원 특이적 항체 반응 또는 ZEBOV-GP-특이적 항체 반응을 중성화시키는) 항체 반응, 시토카인 반응 또는 CD8 T 세포 반응 (예컨대, 면역우세 CD8 T 세포 반응)에 관하여 사용될 경우, 임의의 필로바이러스 비리온 단백질 40을 발현시키지 않는 MVA 벡터들의 상동 프라임-부스트 조합 백신으로 투여된 동물로부터 관찰된 상응하는 면역 반응에 비해 MVA의 상동 프라임-부스트 조합 백신으로 투여된 동물에서 면역 반응이 증가함을 의미하거나, 또는, MVA 벡터가 임의의 필로바이러스 비리온 단백질 40을 발현시키지 않는 본 발명에 따른 MVA 및 FPV 벡터들의 이종 프라임-부스트 조합 백신으로 투여된 동물로부터 관찰된 상응하는 면역 반응에 비해, 본 발명에 따른 MVA 및 FPV 벡터들의 이종 프라임-부스트 조합 백신으로 투여된 동물에서 면역 반응이 증가함을 의미한다. 바람직하게는, 면역 반응, 가령, 항체 반응 예컨대, 중성화 항체 반응, 시토카인 반응 또는 CD8 T 세포 반응에 관하여 사용될 경우 "증강된"은, FPV 벡터가 프라임으로 제공되고 MVA 벡터가 면역 반응을 부스트하기 위해 제공되며 동일한 프라임-부스트 간격을 사용하는 역 프라임-부스트 조합으로 투여된 동물로부터 관찰된 상응하는 면역 반응에 비해, 본 발명에 따라 MVA를 프라임으로 그리고 FPV 벡터들을 부스트로 하는 이종 프라임-부스트 조합 백신으로 투여된 동물에서 면역 반응이 증가함을 의미한다.

[0158]

본 발명의 내용에서, "면역우세 CD8 T 세포 반응"은 MVA 및/또는 FPV 벡터에 의해 인코딩된 재조합 항원에 대한 숙주의 주된 CD8 T 세포 반응을 의미한다. 그러므로 재조합 MVA의 상동 프라임-부스트 또는 재조합 MVA 및 FPV의 이종 프라임-부스트에 의해 인코딩된 재조합 항원에 대한 면역우세 CD8 T 세포 반응은, MVA 벡터가 임의의 필로바이러스 비리온 단백질 40을 발현시키지 않는 재조합 MVA 또는 FPV의 임의의 재조합 항원에 대한 CD8 T 세포 반응보다 크게 생성될 수 있다.

[0159]

CD8 T 세포 반응의 수준은 해당 기술분야에 널리 공지된 방법들, 가령, ELISPOT 분석 (예컨대, 인터페론 감마 (IFN-γ) ELISPOT) (그러나 이에 제한되지 않음)에 의해 결정될 수 있다. 프로토콜들은, 예를 들어, Current Protocols in Immunology (John Wiley & Son, Inc.사 (1994) (예컨대, Chapter 6, Section 19: ELISOPT Assay to Detect Cytokine-secreting Murine and Human Cells, Supplement 10 참조))에 또는 Schneider, 외.

의, *Nat. Med.* 4:397-402 (1998)에 기재되어 있으며, 예를 들어, 본 발명의 특정 바이러스에 관한 실시예에 제시된 기술들에 의한다. 그 외 적합한 분석법들은 CD8 T 세포 활성에 관한 세포내 시토카인의 수준들을 분석하는 ICS 분석을 포함한다. 예를 들어, CD8 T 세포 반응은 동물 개체에서 총 항원 특이적 T-세포 반응들의 50%를 초과하는, 가령 51%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%인 항원 특이적 CD8 T 세포 반응을 포함할 수 있다. 바람직하게는, CD8 T 세포 반응은 또한 동물 개체에서 총 시토카인 반응들의 0.1% 또는 그 이상, 가령, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 또는 그 이상을 나타낸다. 일부 구체예들에서, 제 2 또는 제 3 부스트 이후, 본 발명에 따른 재조합 바이러스 벡터들은 인코딩된 항원에 대하여 숙주에서 총 CD8 T 세포 구획의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 또는 30% 이상인 CD8 T 세포 반응을 유도한다.

[0160] 항체 반응들의 수준은 해당 기술 분야에 공지된 방법들에 의해 결정될 수 있다. 폴리펩티드 (또는 이러한 폴리펩티드를 발현시키는 뉴클레오티드)가 하나 이상의 필로바이러스 아형의 하나 이상의 필로바이러스 항원들에 대하여 하나 이상의 중성화 항체들을 유도하는지 여부를 결정하기 위해 임의의 적합한 플라크 감소 중성화항체 검사법 (PRNT)이 사용될 수 있다. 필로바이러스에 관한 예시적인 플라크 감소 중성화항체 검사법이 실시예에 기재되어 있다. 그 외 PRNT 방법 및 형식들은 해당 기술분야의 통상의 기술자들에게 널리 공지되어 있다.

필로바이러스 단백질

[0162] 본 출원에서 호환적으로 사용되는, 용어 "당단백질 유전자" 또는 "GP 유전자"는 임의의 필로바이러스 균주 또는 분리주에서 당단백질, 특히 막관통 외피 당단백질을 인코딩하는 유전자, 또는 이러한 유전자의 유사체 또는 변이체를 의미하나, 당단백질 유전자의 정확한 서열 및/또는 유전체 위치는 균주들 또는 분리주 간에 상이할 수 있다. 예를 들어, SEBOV의 말레오(Maleo) 균주 (SEBOV-말레오)에서, 당단백질 유전자 (GP-SEBOV-말레오 유전자)는 GenBank 등록 번호 U23069.1와 같은 뉴클레오티드 120-1004 및 1004-2149 (종점들 포함)를 포함한다. EBOV 변역체는 전사하는 동안 교정을 거쳐 일부 뉴클레오티드들이 2회 해독되게 된다. GP-SEBOV-말레오 유전자는 GenBank 등록번호 U23069.1와 같은 뉴클레오티드 120-1004 및 1004-2149 (종점 포함)를 신장시키는 단백질 코딩 해독틀 (ORF)을 추가로 포함한다. GP-SEBOV-말레오 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호:1 (GenBank 등록번호. U23069.1)에 제시된다.

[0163] 본 출원에서 사용되는, "유사체" 또는 "변이체"는 기준 유전자, 단백질, 폴리펩티드, 항원 단백질 절편, 항원 및 에피토프와 바람직하게는 약 50% 이상, 약 60% 또는 65% 이상, 약 70% 또는 75% 이상, 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 이상, 더욱 통상적으로, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상 그리고 더더욱 통상적으로 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상, 가장 통상적으로, 약 99% 이상의 뉴클레오티드 서열 동일성을 가진다. 용어 "유사체" 또는 "변이체"는 또한 결실되거나, 절두되거나 또는 그 외 돌연변이된 버전의 유전자들 및 단백질들을 각각 포함한다. 예로서, 예컨대, 전장 GP-EBOV 또는 GP-MARV 단백질의 신호 펩티드뿐만 아니라 막관통 및/또는 세포질 도메인이 없는 GP-EBOV 또는 GP-MARV 단백질들의 가용성 형태가 포함된다.

[0164] 본 출원에서 호환적으로 사용되는, 용어 "당단백질" 또는 "GP"는 당단백질, 특히 막관통 외피 당단백질, 또는 당단백질의 유사체 또는 변이체를 의미한다.

[0165] GP-EBOV-말레오의 아미노산 서열은 서열번호:2 (GenBank 등록번호. U23069.1의 아미노산 서열)에 제시된다. GP-SEBOV-말레오 단백질은 신호 펩티드, 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포질 도메인을 포함한다 (예컨대, UniProtKB/Swiss-Prot 등록 번호 Q66798 참조). GP-SEBOV-말레오 단백질의 신호 펩티드는 서열번호:2의 아미노산 1-32로 구성되며; GP-SEBOV-말레오 단백질의 세포외 도메인은 서열번호:2의 아미노산 33-650 또는 서열번호:2의 아미노산 1-650으로 구성되고; GP-SEBOV-말레오 단백질의 막관통 도메인은 서열번호:2의 아미노산 651-671로 구성되고; 그리고 GP-SEBOV-말레오 단백질의 세포질 도메인은 서열번호:2의 아미노산 672-676로 구성된다.

[0166] GP-ZEBOV-마잉가의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산은 서열번호:19에 제시된다. GP-ZEBOV-마잉가는 서열번호:20 (GenBank 등록번호 ABX75367.1)에 제시된 단백질을 포함한다.

[0167] 유사하게, 본 출원에서 호환적으로 사용되는 용어들 "핵단백질 유전자" 또는 "NP 유전자"는 또한, 핵단백질 유전자의 정확한 서열 및/또는 유전체 위치가 균주들 또는 분리주들 간에 상이할 수도 있으나, 임의의 필로바이러스 균주 또는 분리주에서 핵단백질을 인코딩하는 유전자, 또는 이러한 유전자의 유사체 또는 변이체를 의미한다. 예를 들어, SEBOV의 보니파시오(Boniface) 균주 (SEBOV-보니파시오)에서, 핵단백질 유전자 (NP-SEBOV-보니파시오 유전자)는 GenBank 등록번호 AF173836.1과 같은 뉴클레오티드 383-2599 (종점 포함)를 포함한다. NP-SEBOV-보니파시오 유전자는 GenBank 등록번호 AF173836.1과 같은 뉴클레오티드 383-2599 (종점 포함)를

신장시키는 단백질 코딩 해독틀 (ORF)을 추가로 포함한다. NP-SEBOV-보니파시오 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호:3 (GenBank 등록번호. AF173836.1)에 제시된다.

[0168] NP-EBOV-보니파시오의 아미노산 서열은 서열번호:4 (GenBank 등록번호. AF173836.1의 아미노산 서열)에 제시된다. NP-SEBOV-보니파시오 단백질은 코일드 코일형 도메인(coiled coil domain) (예컨대, UniProtKB/Swiss-Prot 등록번호. Q9QP77 참조)을 포함한다. NP-SEBOV-보니파시오 단백질의 코일드 코일형 도메인은 서열번호:4의 아미노산 334-363으로 구성된다.

[0169] 특정 구체예들에서, 항원 결정인자, 바람직하게는 항원 단백질을 인코딩하는 핵산, 더욱 바람직하게는 상기 또는 하기 언급된 임의의 단백질들의 핵산은 전장 단백질이다.

재조합 MVA 및 FPV

[0171] 본 출원에서는 폭스바이러스 (예컨대, MVA 또는 MVA-BN 또는 FPV) 유전체에서 다양한 삽입 부위들로 흔입되는, EBOV 및/또는 MARV 유래의 이종 또는 외래 핵산 서열들을 포함하는 재조합 폭스바이러스 (예컨대, MVA 또는 MVA-BN 또는 FPV)가 제공된다. 이종 핵산은 예를 들어, 바이러스 항원들을 비롯한 하나 이상의 외래 단백질 및/또는 외래 항원들을 인코딩할 수 있다.

[0172] 일반적으로, 본 출원에 기재된 "재조합" MVA 또는 FPV는 표준 유전 공학적 방법들에 의해 제조된 MVA/FPV를 의미하는데, 즉, 본 발명의 MVA/FPV는 그러므로 유전 공학적으로 가공된 또는 유전적으로 변형된 MVA/FPC이다. 그러므로 용어 "재조합 MVA 또는 FPV"는 이들의 유전체에서 안정하게 통합된 재조합 핵산을 가지는 MVA/FPV를 포함하며, 바람직하게는 이는 전사 단위 형태이다. 전사 단위는 프로모터, 증강인자, 종결인자 및/또는 사일런서 (silencer)를 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 MVA/FPV는 조절 요소들의 유도시 이종 항원 결정인자, 폴리펩티드 또는 단백질들 (항원들)을 발현시킬 수 있다. 본 발명의 임의의 구체예들의 내용에서 용어 "MVA/FPV"는 MVA, FPV 또는 MVA와 FPV에 대하여 이들 각각의 선택사항 및 조합된 선택사항 모두를 포함한다.

[0173] 본 출원에서 사용되는, "이종" 유전자, 핵산, 항원, 또는 단백질은 야생형 폭스바이러스 유전체 (예컨대, MVA 또는 MVA-BN 또는 FPV)에 존재하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열인 것으로 이해하면 된다. 숙련된 기술자는 "이종 유전자"가, 폭스바이러스, 가령, MVA 또는 MVA-BN 또는 FPV에 존재하는 경우, 숙주 세포로 재조합 폭스바이러스 투여 후, 상응하는 이종 유전자 생성물, 즉, "이종 항원" 및/또는 "이종 단백질"로서 발현되도록 폭스바이러스 유전체 내부로 흔입됨을 이해한다. 발현은 통상적으로 폭스바이러스-감염 세포에서의 발현을 가능하게 하는 조절 요소들에 이종 유전자를 작동적으로 연결시킴으로써 구현된다. 바람직하게는, 조절 요소들은 자연 또는 합성 폭스바이러스 프로모터를 포함한다.

[0174] 한 양태에서, 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV 벡터는 에볼라 바이러스 (EBOV) 및/또는 마르부르크 바이러스 (MARV)에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV 벡터는 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV), 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV), 코트디브아르 에볼라 바이러스 (EBOV-CdI, 타이숲 바이러스 또는 TAFV로도 불림), 레스턴 에볼라 바이러스 (REBOV) 및 분디부교 에볼라 바이러스 (BEBOV)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 EBOV 아형들에서 선택되는 필로바이러스 단백질 (예컨대, EBOV 단백질)의 하나 이상의 항원 결정인자(들)의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0175] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV 벡터는 자이르-마잉가, 자이르-키크위트, 자이르-가봉, 코트디브아르 에볼라 바이러스, 수단-보니파시오, 수단-말레오, 수단-굴루, 마르부르크-라븐, 마르부르크-오졸린, 마르부르크-라타이작, 마르부르크-무소케, 마르부르크-앙골라의 군에서 선택된, 필로바이러스 단백질, 바람직하게는 EBOV 단백질, MARV 단백질 또는 이의 전장 단백질의 하나 이상의 항원 결정인자(들)를 포함한다.

[0176] 바람직하게는, (예컨대, 자이르-마잉가, 자이르-키크위트, 자이르-가봉, 코트디브아르 에볼라 바이러스, 수단-보니파시오, 수단-말레오, 수단-굴루, 마르부르크-라븐, 마르부르크-오졸린(Marburg-Ozolin), 마르부르크-라타이작, 마르부르크-무소케, 마르부르크-앙골라의 군에서 선택된) 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자는 외피 당단백질 (GP), 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L)로 구성된 군에서 선택된다.

[0177] 또 다른 구체예에서, 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자는 외피 당단백질 (GP), 바람직하게는, 적어도 외피

당단백질 (GP) 및 비리온 단백질 40 (VP40)이다.

[0178] 또 다른 구체예에서, 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자는 ZEVOV 및 SEBOV의 군에서 선택된 외피 당단백질 (GP), 바람직하게는 적어도 외피 당단백질 (GP) 및 비리온 단백질 40 (VP40)이며, 여기서 GP 및 VP40은 동일한 균주에서 유래되고, 바람직하게는 상기 동일한 균주는 ZEBOV 및 SEBOV의 군에서 선택된다.

[0179] 또 다른 구체예에서, 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자는 적어도 외피 당단백질 (GP) 및 비리온 단백질 40 (VP40)이고, 여기서 GP 및 VP40은 상이한 분리주 또는 동일한 분리주에서 유래되고, 바람직하게는 상이한 또는 동일한 분리주는 자이르-마잉가, 자이르-키크위트, 자이르-가봉, 코트디브아르 에볼라 바이러스, 수단-보니파시오, 수단-말레오, 수단-굴루, 마르부르크-라븐, 마르부르크-오졸린, 마르부르크-라타이작, 마르부르크-무소케 및 마르부르크-양골라의 군에서 선택되고, 바람직하게는 분리주는 자이르-마잉가, 수단-굴루, 마르부르크-무소케 및 마르부르크-양골라의 군에서 선택되고, 가장 바람직하게는 분리주는 자이르-마잉가, 수단-굴루 및 마르부르크-무소케의 군에서 선택된다.

[0180] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 2, 3, 4 또는 그 이상의 에볼라 및/또는 마르부르크 아형들의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0181] 또 다른 바람직한 구체예는 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터를 포함하며, 이러한 백터는 외피 당단백질 (GP), 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L)로 구성된 군에서 선택된 2, 3, 4 또는 그 이상의 필로바이러스 단백질들의 항원 결정인자를 포함한다.

[0182] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0183] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0184] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호: 20으로 구성된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0185] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호: 20 및 서열번호: 34로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0186] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:31 및 서열번호:34로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0187] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호:6, 서열번호: 20, 서열번호:29, 서열번호:31 및 서열번호:34로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0188] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA/FPV 백터는 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.

[0189] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 MVA 백터는 서열번호:29 및/또는 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:31으로 구성된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0190] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 MVA 백터는 서열번호:28 및/또는 서열번호:5, 서열번호:19, 서열번호:30을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0191] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 MVA 백터는 서열번호:33을 포함하는 필로바이러스 비리온 단백질 40 (VP40)의 항원 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호:34를 포함하는 단백질 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0192] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 구체예들에 따른 재조합 MVA 백터는 a) 서열번호:5, 서열번

호:19 및 서열번호:30, b) 서열번호:5, 서열번호:19, 서열번호:28 및 서열번호:30, 그리고 c) 서열번호:19 및 서열번호:33의 군에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0193] 또다른 양태에서, 본 발명은 필로바이러스 당단백질, 특히 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 벡터 또는 FPV 벡터를 포함한다.

[0194] 필로바이러스 당단백질은 GP-MARV 또는 GP-EBOV를 인코딩할 수 있다.

[0195] 본 출원에 기재된 구체예들에 있어서, MARV의 당단백질은 MARV-무소케, 바람직하게는 전장 MARV-무소케에서 유래될 수 있으며, 이는 결국 MARV-무소케의 빅토리아 호(Lake Victoria) 균주 또는 분리주에서 유래될 수 있다. GP-MARV는 또한 MARV-라븐, MARV-오졸린, MARV-라타이작 또는 MARV-앙골라에서 유래될 수 있다. 전장 GP-MARV-무소케를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호:6의 아미노산 1 내지 681 또는 19 내지 681을 인코딩하는 서열번호:5에서 나타난다. 한 바람직한 구체예에서, GP-MARV-무소케는 서열번호:5의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 바람직하게는 이러한 서열은 서열번호:6의 단백질을 인코딩하는 서열이다. 특정 구체예들에서, GP-MARV-무소케는 절두되며, 여기서 절두된 GP-MARV-무소케는 서열번호:6의 아미노산 1 내지 648 또는 아미노산 19 내지 648 (GenBank 등록번호. ABA87127.1)을 포함하는, 외피 당단백질의 세포외 도메인만을 포함할 수 있다. 다른 구체예들에서, 본 출원에 기재된 MARV의 당단백질은 MARV-앙골라, 바람직하게는 전장 GP-MARV-앙골라에서 유래될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, GP-MARV-앙골라는 서열번호:37의 아미노산들을 인코딩하는 서열번호:36의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0196] EBOV의 당단백질은 GP-SEBOV일 수 있거나 또는 GP-ZEBOV에서, 특히 GP-ZEBOV의 마잉가 균주 (GP-ZEBOV-마잉가)에서 유래될 수 있다. 전장 GP-ZEBOV-마잉가는 서열번호:20의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:19의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, GP-ZEBOV-마잉가는 서열번호:19의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이는 바람직하게는 서열번호:20의 단백질을 인코딩하는 서열이다. GP-EBOV는 또한 GP-BEBOV, GP-EBOV-CdI 또는 GP-EBOV-레스턴일 수 있다. GP-ZEBOV는 절두될 수 있으며, 서열번호:20의 아미노산 1-636을 인코딩하기 위해 변형된 또는 서열번호:20의 아미노산 314 내지 464를 신장시키는 뮤신 도메인을 결실하도록 변형된 서열번호:19의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0197] GP-SEBOV는 GP-SEBOV의 굴루 균주(GP-SEBOV-굴루)에서 유래될 수 있다. 특정 구체예들에서, GP-SEBOV는 서열번호:30의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이는 바람직하게는 서열번호:31의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열이다.

[0198] 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV는 또한 파상풍 톡소이드 절편 C 서열을 추가로 포함할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, GP-MARV-무소케, 특히 전장 MARV-무소케 GP는, 파상풍 톡소이드 절편 C를 추가로 포함한다. 파상풍 톡소이드 절편 C는 서열번호:8의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:7의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 절두된 GP-MARV-무소케는 서열번호:8의 아미노산 서열 중 아미노산 760-1213을 인코딩하는 서열번호:7의 뉴클레오티드 서열 중 뉴클레오티드 2281-3642를 포함할 수 있는, 파상풍 톡소이드 절편 C (TTC)를 추가로 포함한다.

[0199] 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV 벡터는 면역자극 또는 공동-자극 분자를 추가로 포함할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, GP-MARV-무소케의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 면역자극 분자들을 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 하나 이상의 면역자극 분자는 서열번호:10의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:9를 포함할 수 있는 인간 CD40 리간드 (hCD40L)이다. 특정 구체예들에서, 하나 이상의 면역자극 분자(들)는 서열번호:12의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:11을 포함할 수 있는, 인간 인터루킨-15 수용체 (hIL15R-Sushi)의 스시 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0200] 하나 이상의 면역자극 분자들은 또한 공동자극 분자들의 트리아드 (즉, 'TRICOM')로서 집합적으로 공지된, 림프구 기능-관련 항원 3 (LFA-3, 또는 CD58), 세포간 부착 분자 1 (ICAM-1, 또는 CD54) 및 B7.1 (CD80)일 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "TRICOM"은, B7-1 (또한 CD80으로도 공지됨), 세포내 부착 분자-1 (ICAM-1, 또한 CD54로도 공지됨) 및 림프구 기능-관련 항원-3 (LFA-3, 또한 CD58로도 공지됨)으로 구성된 공동자극 분자들의 트리아드(Triad of Costimulatory Molecules)에 관한 약어이며, 항원-특이적 면역 반응을 증가시키기 위하여 특이적 항원을 발현시키는 재조합 바이러스 벡터들 (예컨대, 폭스바이러스 벡터들)에 포함된다. TRICOM의 개개 성분들은 동일한 또는 상이한 프로모터들의 제어하에 있을 수 있으며, 특이적 항원을 가진 동일한 벡터 상에 또는 별도의 벡터 상에 제공될 수 있다. 예시적인 벡터들은 예를 들어, Hodge 외., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation," *Cancer Res.* 59:5800-5807 (1999) 및 미국 특허 제

7,211,432 B2에 개시되어 있으며, 두 문현 모두 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. LFA-3은 서열번호:14의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:13의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으며, ICAM-1은 서열번호:16의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:15의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 그리고 B7.1은 서열번호:18의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:17의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0201] 본 발명에 따른 재조합 MVA/FPV는 또한 멤브레인 앵커 (membrane anchor) 서열, 가령, 서열번호:22의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백시니아 바이러스 유전자 B5m을 추가로 포함할 수 있다. 특히, 본 출원에 기재된 항원 결정인자는 바람직하게는 멤브레인 앵커, 가령, B5m에 작동적으로 연결될 수 있다. 그러므로, 본 출원에서 재조합 MVA/FPV가 멤브레인 앵커 서열을 포함하는 경우에 사용될 경우, 재조합 MVA/FPV에 의해 이루어진 항원 결정인자는 바람직하게는 멤브레인 앵커에 작동적으로 연결됨을 의미한다. 멤브레인 앵커는 세포막의 외부면에 이종 폴리펩티드를 고정할 수 있는 임의의 폴리펩티드를 의미한다. 바람직하게는, 멤브레인 앵커는 "B5R 앵커" 또는 "B5m"으로 본 출원에서 명명되는, 백시니아 바이러스 B5R 단백질의 세포질 및 막관통 도메인을 포함한다. 정의된 바와 같이, B5R 앵커는 임의의 유형의 백시니아 바이러스, 예를 들어, WR 균주 (Katz 외. *J Virol.* 71(4):3178-87 (1997)) 또는 더욱 바람직하게는 MVA로부터의 B5R 단백질의 42-아미노산 C-말단 분절을 의미한다. 게다가, 기준 B5R 앵커 서열에 대하여 80% 이상, 가령, 85% 이상, 예를 들어, 90% 이상, 또는 95% 이상, 가령, 98% 이상의 서열 동일성을 가지는 B5R 앵커 변이체 또한 본 발명에 포함된다. 바람직한 앵커 서열은 서열번호: 21에 나타나 있으며, 이의 번역 생성물은 또한 서열번호: 22에 나타나 있다.

[0202] 한 바람직한 구체예에서, 전장 및/또는 절두된 GP-ZEBOV는 백시니아 바이러스 유전자 B5m를 추가로 포함한다.

[0203] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 필로바이러스 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA/FPV 백터를 포함하며, 바이러스-유사 입자들 (VLP)을 형성하는데 필요한 추가 필로바이러스 단백질들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열들을 추가로 포함한다. 한 구체예에서, VLP를 형성하는데 필요한 필로바이러스 단백질을 인코딩하는 추가 이종 뉴클레오티드 서열은 VP40일 수 있다. 특정 구체예들에서, 바이러스-유사 입자들을 형성하는데 필요하거나 VLP의 형성을 증강시키는 추가 필로바이러스 단백질들은 NP-EBOV 및 VP40-EBOV이며, 여기서 이들 단백질들은 상기 지시된 균주들에서 유래될 수 있다. 바람직하게는, 필로바이러스 핵단백질 (예컨대, NP-EBOV) 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (예컨대, VP40-EBOV)은 동일한 필로바이러스 균주에서 유래된다. 비-인간 영장류동물을 (NP 발현에 추가로 또는 NP 발현 없이) GP 및 VP40을 발현시키는 그리고 감염된 세포들로부터 GP-함유하는 EBOV-VLP를 생성할 수 있는 재조합 MVA로 백신접종함으로써 발명자들은 비-인간 영장류동물에서 필로바이러스 시험감염에 대한 보호를 구현할 수 있었다. 백신접종된 동물들에서 바이러스-유사 입자들의 제조는 진정한 필로바이러스 감염에 존재하는 바이러스 입자들을 근접하게 모사하는 추가적인 백신 종류(modality)를 생성한다. 이러한 재조합 MVA 필로 VLP 백신접종은 체액성 및 세포성 면역 반응 모두를 자극하였으며 그리하여 필로바이러스 시험감염에 대해 보호하였다. 필로바이러스 VLP를 제공하는 약독화 MVA 바이러스를 이용한 백신접종의 추가 이점은 접종 및 추가적인 MVA 매개된 면역 자극을 위한 바이러스-유사 입자들의 정제 필요성이 없다는 것이다. 동일한 균주에서 유래된 필로바이러스 핵단백질 (예컨대, NP-EBOV) 및 필로바이러스 비리온 단백질 40 (예컨대, VP40-EBOV)의 이용은 상기 바이러스 입자들을 근접하게 모사하고 필로바이러스 감염에 대한 보호를 개선시키기 위한 VLP의 형성을 증강시킴에 있어, 바람직하게는 균일한 직경을 가진 균질 GP 스파이크 데코레이티드 VLP를 생성함에 있어 유리하다.

[0204] 본 발명은 또한 필로바이러스 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열 및 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA/FPV 백터에 관한 것이다. 또 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 필로바이러스 단백질들을 인코딩할 수 있다. 상기 유전자들 및 단백질들은 각각 상기 하나 이상의 필로바이러스 균주들에서 유래될 수 있다. 특정 구체예들의 NP-EBOV-CdI는 서열번호:29의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:28의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0205] 특정 구체예들에서, VP40은 MARV 또는 EBOV에서 선택되고, 바람직하게는 VP40은 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV), 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV), 코트디브아르 에볼라 바이러스 (EBOV-CdI, 또한 타이숲 바이러스 또는 TAFV로도 불림), 레스턴 에볼라 바이러스 (EBOV-레스턴) 및 분디부교 에볼라 바이러스 (BEBOV)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 EBOV 아형들에서 선택된다. 한 바람직한 구체예에서, VP40은 ZEBOV, SEBOV 및 MARV 중 하나 이상에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 VP40은 동일한 필로바이러스

균주에서 선택된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, VP40 및/또는 필로바이러스 당단백질은 자이르-마잉가, 자이르-키크위트, 자이르-가봉, 코트디브아르 에볼라 바이러스, 수단-보니파시오, 수단-말레오, 수단-굴루, 마르부르크-라븐, 마르부르크-오졸린, 마르부르크-라타이작, 마르부르크-무소케 및 마르부르크-앙골라 중 하나 이상에서, 더욱 바람직하게는 자이르-마잉가 (VP40-ZEBOV-마잉가), 수단-굴루 (VP40-SEBOV-굴루), 마르부르크-무소케 (VP40-MARV-무소케) 및 마르부르크-앙골라 (VP40-MARV-앙골라) 중 하나 이상에서 선택된다. 또 다른 구체예에서, 임의의 구체예들의 MVA 벡터는 필로바이러스 핵단백질 (NP)을 추가로 포함하며, 바람직하게는 여기서 필로바이러스 핵단백질 및 필로바이러스 VP40은 동일한 필로바이러스 균주에서 유래된다. 또 다른 구체예에서, VP40은 VP40-ZEBOV-마잉가 또는 VP40-MARV-무소케를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 그 외 구체예들에서, 필로바이러스 VP40은 서열번호:33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, VP40은 서열번호:34의 단백질 서열을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, VP40은 서열번호:34의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호:33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0206] 또 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 MVA/FPV 벡터는 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 2개의 이종 뉴클레오티드 서열들 및 또 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구체예들에서, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 1 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-MARV를 인코딩하고, 그리고 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 2 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-EBOV를 인코딩한다. 재조합 MVA/FPV 벡터는, 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에 따라, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 3개의 이종 뉴클레오티드 서열들 및 또 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 1 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-MARV를 인코딩하고, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 2 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-EBOV를 인코딩하고, 그리고 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 3 이종 뉴클레오티드 서열은 제 2 이종 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 GP-EBOV와 상이한 EBOV 균주 또는 분리주에서 유래된 GP-EBOV를 인코딩한다. 따라서, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나의 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-SEBOV-굴루를 인코딩하고 또 다른 하나는 GP-ZEBOV-마잉가를 인코딩할 수 있다.

[0207] 또 다른 구체예에서, 재조합 MVA/FPV 벡터는 EBOV 균주 또는 분리주로부터의 GP-EBOV의 항원 결정인자를 인코딩하는 2개의 이종 뉴클레오티드 서열들 및 MARV 균주 또는 분리주로부터의 GP-MARV의 항원 결정인자를 인코딩하는 2개의 이종 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 바람직하게는 MARV 균주는 MARV-앙골라 및 MARV-무소케이고 EBOV 균주는 ZEBOV 및/또는 SEBOV, 바람직하게는 ZEBOV-마잉가 및 SEBOV-굴루이다. 물론, 또 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 또 다른 뉴클레오티드 서열은, 상기 이미 언급한 바와 같이, 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L)로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질들을 또한 인코딩할 수 있으며, 이들은 또한 상기 이미 설명한 바와 같이 상이한 균주들에서 유래될 수도 있다.

[0208] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에 따른 재조합 MVA/FPV 벡터는 GP-MARV 및 GP-EBOV의 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 2개의 이종 뉴클레오티드 서열들 및 VP40의 항원 결정인자를 인코딩하는 제 3 이종 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이러한 VP40은 상기 또는 하기 설명한 바와 같은 임의의 VP40일 수 있다. 따라서, 필로바이러스 외피 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나의 이종 뉴클레오티드 서열은 GP-SEBOV-굴루를 인코딩하고 또 다른 하나는 GP-ZEBOV-마잉가를 인코딩할 수 있으며 제 3 이종 뉴클레오티드 서열은 필로바이러스 단백질 VP40-ZEBOV, VP40-SEBOV 또는 VP40-MARV, 바람직하게는 VP40-ZEBOV-마잉가 또는 VP40-MARV-무소케의 항원 결정인자를 인코딩할 수 있다.

[0209] 또 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 MVA/FPV 벡터는 필로바이러스 외피 당단백질 GP-EBOV, 바람직하게는 GP-ZEBOV 및/또는 GP-SEBOV, 더욱 바람직하게는 GP-ZEBOV-마잉가 및 GP-SEBOV-굴루의 항원 결정인자를 인코딩하는 2개의 이종 뉴클레오티드 서열들, GP-MARV, 바람직하게는 GP-MARV-무소케 또는 GP-MARV-앙골라의 하나의 필로바이러스 외피 당단백질 및 바람직하게는 NP-EBOV-CdI, NP-ZEBOV 및 NP-MARV의 군, 바람직하게는 NP-MARV-무소케 또는 NP-MARV-앙골라에서 선택된 하나 이상의 필로바이러스 핵단백질을 포함한다.

MVA/FPV로의 삽입 부위들

[0210] 필로바이러스 당단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하며, 선택적으로 또 다른 필로바이러스 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 이종 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 이종 뉴클레오티드 서열들은 MVA의 하나 이상의 유전자

간 구역들 (IGR)로 삽입될 수 있다. 특정 구체예들에서, IGR은 IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, 및 IGR 148/149에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 재조합 MVA의 5, 4, 3, 또는 2개 미만의 IGR은 필로바이러스 외피 당단백질 및/또는 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열들을 포함한다. 이종 뉴클레오티드 서열들은, 추가적으로 또는 대안적으로, 자연 발생 결실 부위들 중 하나 이상에, 특히 MVA 유전체의 주요 결실 부위들 I, II, III, IV, V, 또는 VI에 삽입될 수 있다. 특정 구체예들에서, 재조합 MVA의 자연 발생 결실 부위들 중 5, 4, 3, 또는 2개 미만은 필로바이러스 외피 당단백질 및/또는 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열들을 포함한다.

[0212] 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열들을 포함하는 MVA의 삽입 부위들의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상일 수 있다. 특정 구체예들에서, 이종 뉴클레오티드 서열들은 4, 3, 2, 또는 그 보다 적은 삽입 부위들에 삽입된다. 바람직하게는, 2개의 삽입 부위들이 사용된다. 특정 구체예들에서, 3개의 삽입 부위들이 사용된다. 바람직하게는, 재조합 MVA는 2 또는 3개 삽입 부위들에 삽입된 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 이상의 유전자들을 포함한다.

[0213] 필로바이러스 당단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하며, 선택적으로 다른 필로바이러스 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 이종 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 이종 뉴클레오티드 서열들은 FPV의 하나 이상의 유전자 간 구역들 (IGR)에 삽입될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, IGR은 상기 유전체의 1.3-kbp HindIII 절편의 ORF 7과 9 사이에 위치된다 (Drillien 외, *Virology* 160:203-209 (1987) (US 5,180,675) 및 Spehner 외, *J. Virol.* 64:527-533 (1990) 참조). 특정 구체예들에서, 이종 뉴클레오티드 서열들은 본 출원에 참고문헌으로 포함되는 EP 0 538 496 A1 및 WO 05/048957에 기재된 계두 삽입 부위들에 삽입될 수 있다. 또한 본 발명의 바람직한 계두 삽입 부위들은 LUS 삽입 부위, FP14 삽입 부위, 및 43K 삽입 부위이다. 이들 부위들은 또한 종종 FPN006/FPN007 (LUS 삽입 부위), FPN254/FPN255 (LUS 삽입 부위), FPV060/FPV061 (FP14 삽입 부위), 및 FPV107/FPV108 (43K 삽입 부위)로 언급된다.

[0214] 한 바람직한 구체예에서, 계두에서 삽입 부위는 LUS 삽입 부위이다. 계두 바이러스 유전체 (Genbank 등록번호: AF 198100.1)의 각 단부에 2개의 긴 특유의 서열들(LUS)가 존재하므로, 각 유전체에 2개의 LUS 삽입 부위들이 존재한다. 유전체의 좌측 단부에 있는 LUS 삽입 부위는 GenBank 등록번호. AF198100.1에 주석처리된 바와 같이 계두 유전체 서열에서 FPV006의 3' 및 FPV007 125L의 5'에, 바람직하게는 위치 7470과 7475 사이에 놓여있다. 유전체의 우측 단부에 있는 LUS 삽입 부위는 예컨대, GenBank 등록번호. AF198100.1의 계두 유전체 서열에서 FPV254의 3' 및 FPV255의 5'에, 바람직하게는 위치 281065와 281070 사이에 놓여있다. 한 구체예에서, 이종 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티드 위치 281065와 281070 내 임의의 위치에 삽입될 수 있다.

[0215] 또 다른 바람직한 구체예에서, 계두에서 삽입 부위는 FP14 삽입 부위이다. 이 부위는 계두 유전체 서열에서 FPV060의 3' 및 FPV061의 5에, 바람직하게는 예컨대, GenBank 등록번호. AF198100.1의 계두 유전체의 위치 67080과 67097 사이에 놓여있다. 한 구체예에서, DNA 서열의 위치 67080과 67097 사이의 뉴클레오티드들은 재조합 바이러스에서 결실되고 관심 서열을 나타내는 정의된 삽입부로 대체된다. 한 구체예에서, FP14 삽입 부위는 예컨대, AF198100.1의 FPV060 유전자의 상동유전자와 FPV061의 상동유전자 사이에 있다. 용어 "FPV060, FPV061, FPV254" 등은 GenBank 등록번호. AF198100.1에 주석처리 된 바와 같이 5'에서 3'으로 번호가 정해진, 각 유전자의 상응하는 코딩 서열(즉, CDS)의 위치를 의미한다. 한 바람직한 구체예에서, FP14 삽입 부위는 계두 유전체 서열에서 위치 67091과 67092 사이에 있다 (GenBank 등록번호. AF198100.1에 주석처리된 바와 같이 IGR60/61 삽입 부위로도 언급됨).

[0216] 또한 또 다른 바람직한 구체예에서, 계두에서 삽입 부위는 43K 삽입 부위로 지정된다. 이 부위는 FPV107의 3' 및 FPV108의 5'에, 바람직하게는 GenBank 등록번호. AF198100.1에 주석처리된 바와 같은 계두 유전체 서열의 위치 128178에 놓여있다.

[0217] 한 바람직한 구체예에서, 통합 부위는 FP14 (IGR60/61) 및/또는 BamHI J 구역이다. BamH1 J 구역은 본 출원에 참고문헌으로 포함된 S. Jenkins 외. (1991), *Aids Research and Human Retroviruses* 7(12):991:998에 더욱 설명된다.

[0218] 특정 구체예에서, IGR은 IGR BamHI J FPV이다.

[0219] 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열들을 포함하는 FPV의 삽입 부위들의 수는 1 또는 2일 수 있다. 바람직하게는, 2개의 삽입 부위들이 사용된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 재조

합 FPV는 1 또는 2개 삽입 부위들에 삽입된 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 유전자들을 포함한다.

[0220] 본 출원에서 해당 기술분야에 공지된 관례적인 방법들로 생성될 수 있는 재조합 MVA/FPV 바이러스가 제공된다. 재조합 폭스바이러스를 얻기 위한 또는 폭스바이러스 유전체에 외인성 코딩 서열들을 삽입하기 위한 방법들은 해당 기술 분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 표준 분자 생물학 기술들에 관한 방법들, 가령, DNA 클로닝, DNA 및 RNA 단리, 웨스턴 블로트 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭 기법은 Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.) (J. Sambrook 외., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))에 기재되어 있으며, 바이러스의 취급 및 조작에 관한 기술들은 Virology Methods Manual (B.W.J. Mahy 외. (eds.), Academic Press (1996))에 기재되어 있다. 유사하게, MVA의 취급, 조작 및 유전공학적 처리에 관한 기술들 및 노하우는 Molecular Virology: A Practical Approach (A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (예컨대, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors 참조)) 및 Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Son, Inc. (1998) (예컨대, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector) 참조)에 기재되어 있다.

[0221] 본 출원에 개시된 다양한 재조합 MVA/FPV를 생성하기 위해, 상이한 방법들이 사용될 수 있다. 바이러스에 삽입되는 DNA 서열은 MVA/FPV의 DNA 구획에 대해 상동인 DNA가 삽입되어 있는 대장균 플라스미드 구조체 내부에 배치될 수 있다. 별도로, 삽입되는 DNA 서열은 프로모터에 결찰될 수 있다. 프로모터-유전자 링키지가 비-필수 좌위를 함유하는 MVA/FPV DNA 구역을 플랭크하는 DNA 서열에 대해 상동인 DNA에 의하여 양쪽 단부 모두에 플랭크될 수 있도록 프로모터-유전자 링키지는 플라스미드 구조체 내에 배치될 수 있다. 생성된 플라스미드 구조체는 대장균 박테리아 내부에서의 번식에 의해 증폭되어 분리될 수 있다. 삽입될 DNA 유전자 서열을 함유하는 분리된 플라스미드는 세포 배양물, 예컨대, 닭 배아 섬유모세포 (CEF)의 세포 배양물 내로 형질감염될 수 있으며, 동시에 배양물은 MVA로 감염된다. 플라스미드 내 상동 MVA DNA와 바이러스 유전체 간의 재조합은, 각각, 외래 DNA 서열들의 존재에 의해 변형된 MVA를 생성할 수 있다.

[0222] 바람직한 구체예에 따르면, 예컨대, CEF 세포들과 같은, 적합한 세포 배양물의 세포는 폭스바이러스로 감염될 수 있다. 감염된 세포는, 바람직하게는 폭스바이러스 발현 제어 요소의 전사 제어하에, 후속적으로, 외래 또는 이종 유전자 또는 유전자들을 포함하는 제 1 플라스미드 벡터로 감염될 수 있다. 상기 설명한 바와 같이, 플라스미드 벡터는 또한 폭스바이러스 유전체의 선택된 부분으로 외인성 서열의 삽입을 유도할 수 있는 서열들을 포함한다. 선택적으로, 플라스미드 벡터는 또한 폭스바이러스 프로모터에 작동적으로 연결된 표지 및/또는 선별 유전자를 포함하는 카세트를 내포한다. 적합한 표지 또는 선별 유전자들은 예컨대, 녹색 형광 단백질, β -갈락토시다제, 네오마이신-포스포리보실전달효소 또는 그 외 표지들을 인코딩하는 유전자들이다. 선별 또는 표지 카세트들을 사용하면 생성된 재조합 폭스바이러스의 확인 및 분리가 간단해진다. 그러나, 재조합 폭스바이러스는 또한 PCR 기술에 의해 확인될 수도 있다. 후속적으로, 또 다른 세포가 상기와 같이 수득된 재조합 폭스바이러스로 감염되고 제 2 외래 또는 이종 유전자 또는 유전자들을 포함하는 제 2 벡터로 형질감염될 수 있다. 이러한 유전자가 폭스바이러스 유전체의 상이한 삽입 부위로 도입되어야 하는 경우, 폭스바이러스의 유전체로 제 2 외래 유전자 또는 유전자들의 통합을 유도하는 폭스바이러스-상동 서열들에 존재하는 제 2 벡터 또한 상이하다. 상동 재조합이 발생한 후, 둘 이상의 외래 또는 이종 유전자들을 포함하는 재조합 바이러스가 분리될 수 있다. 추가 외래 유전자들을 재조합 바이러스에 도입시키기 위해, 감염을 위한 이전 단계들에서 분리된 재조합 바이러스를 사용하여 그리고 형질감염을 위한 또 다른 외래 유전자 또는 유전자들을 포함하는 또 다른 벡터를 사용하여 감염 및 형질감염 단계들을 반복할 수 있다.

[0223] 대안적으로, 상기 기재된 감염 및 형질감염 단계들은 호환가능, 즉, 적합한 세포는 먼저 외래 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터에 의해 감염된 다음, 폭스바이러스로 감염될 수 있다. 또 다른 대안으로서, 각각의 외래 유전자를 상이한 바이러스에 도입하고, 수득된 재조합 바이러스 모두로 세포를 동시감염시키고 모든 외래 유전자들을 포함하는 재조합에 관해 선별하는 것 또한 가능하다. 세번째 대안은 DNA 유전체 및 외래 서열들의 시험관내 결찰 및 보조 바이러스를 이용하여 재조합된 백시니아 바이러스 DNA 유전체의 재구성이다. 네번째 대안은 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로서 클로닝된 백시니아 바이러스 유전체와 상기 백시니아 바이러스 유전체에서 원하는 통합 부위를 플랭크하는 서열들에 상동성인 DNA 서열들로 플랭크된 선형 외래 서열 사이에서의 대장균 또는 또 다른 박테리아 종들의 상동 재조합이다.

[0224] 이종 필로바이러스 유전자들의 발현

[0225] 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열은 단일 전사 단위로서 발현될 수

있다. 예를 들어, 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열은 폭스바이러스에, 예컨대, 백시니아 바이러스 프로모터에 및/또는 폭스바이러스에, 예컨대, 백시니아 바이러스 전사 중결인자에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0226] 특정 구체예들에서, "전사 단위"는 MVA/FPV 유전체의 삽입 부위로 그 자체로 삽입된다. 특정 구체예들에서, "전사 단위"는 MVA/FPV 유전체의 삽입 부위로 그 외 전사 단위(들)과 함께 삽입된다. "전사 단위"는 MVA/FPV 유전체에서 자연 발생된 것이 아니며 (즉, 이것은 이종, 외인성 또는 외래성임) 감염된 세포들에서 전사가능하다.

[0227] 바람직하게는, 재조합 MVA/FPV는 MVA/FPV 유전체로 삽입된 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상의 전사 단위들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 재조합 MVA/FPV는 안정하게 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상의 전사 단위들에 의해 인코딩되는 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 이종 뉴클레오티드 서열을 발현시킨다. 특정 구체예들에서, 재조합 MVA/FPV는 MVA/FPV 유전체의 1, 2, 3, 또는 그 이상의 삽입 부위들에서 MVA/FPV 유전체로 삽입되는 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상의 전사 단위들을 포함한다.

[0228] 특정 구체예들에서, 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자들을 인코딩하는 하나, 그 이상, 또는 모든 이종 뉴클레오티드 서열들의 발현은 하나 이상의 폭스바이러스 프로모터들의 제어하에 있다. 특정 구체예들에서, 폭스바이러스 프로모터는 Pr7.5 프로모터, 하이브리드 초기/후기 프로모터, PrS 프로모터, PrS5E 프로모터, 합성 또는 자연 초기 또는 후기 프로모터, 또는 우두 바이러스 ATI 프로모터이다. 적합한 프로모터들이 본 출원에 참고문헌으로 온전히 포함되는 WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 및 WO 2014/063832에 추가로 기재되어 있다. 특정 구체예들에서, 폭스바이러스 프로모터는 PrS 프로모터 (서열번호:23), PrS5E 프로모터 (서열번호:24), Pr7.5 (서열번호:25), PrLE1 프로모터 (서열번호:27), Pr13.5 길이(long) 프로모터 (서열번호:35) 및 FPV-40K 프로모터 (서열번호:26)로 구성된 군에서 선택되며, 더욱 바람직하게는 PrS 프로모터 (서열번호:23), PrS5E 프로모터 (서열번호:24), Pr7.5 (서열번호:25) 및 PrLE1 프로모터 (서열번호:27)로 구성된 군에서 선택된다.

[0229] 특정 구체예들에서, 필로바이러스 단백질, 바람직하게는 ZEBOV, SEBOV, EBOV-CdI, MARV 및 NP-ZEBOV 단백질, 더욱 바람직하게는 GP-ZEBOV-마잉가, GP-SEBOV-굴루, GP-MARV 및 NP-ZEBOV, 가장 바람직하게는 GP-MARV-무소케 또는 GP-MARV-앙골라의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 PrS, PrLE1 및 Pr7.5로 구성된 군에서 선택된 프로모터의 제어하에 있다. 한 바람직한 구체예에서, 필로바이러스 단백질 GP-SEBOV 및 GP-MARV-무소케의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 PrS 프로모터 (예컨대, 서열번호:23)의 제어하에 발현되며, NP-EBOV-CdI는 PrLE1 또는 변형된 PrLE1 프로모터 (예컨대, 서열번호:27 및 서열번호:32)의 제어하에 발현되고, 그리고 GP-ZEBOV-마잉가는 Pr7.5 프로모터 (예컨대, 서열번호:25)의 제어하에 발현된다.

[0230] 또 다른 바람직한 구체예에서, 임의의 구체예들의 FPV의 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터, 바람직하게는 서열번호:26을 포함하거나 가지는 프로모터의 제어하에 있다.

필로바이러스 백신 및 제약학적 조성물

[0232] 본 출원에 기재된 재조합 MVA 바이러스들은 매우 복제 제한적이고, 그리하여 매우 약독화되어 있기 때문에, 이들은 인간 그리고 심지어 면역이 순상된 인간들을 비롯한 광범위한 포유동물의 치료에 이상적인 후보들이다. 그러므로, 본 출원은 인간을 비롯하여 살아있는 동물 신체에서 면역 반응을 유도하기 위한 제약학적 조성물 및 백신을 제공한다. 추가적으로 필로바이러스-유발 질병의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 필로바이러스 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 MVA 백터를 제공한다.

[0233] 이 백신은 바람직하게는 10^4 내지 10^9 TCID₅₀/mL, 10^5 내지 5×10^8 TCID₅₀/mL, 10^6 내지 10^8 TCID₅₀/mL, 또는 10^7 내지 10^8 TCID₅₀/mL 농도 범위의 용액으로 제제화된 본 출원에 기재된 임의의 재조합 MVA 바이러스를 포함한다. 인간에 있어 바람직한 백신접종 용량은 10^6 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀, 또는 10^8 TCID₅₀의 용량을 비롯하여 10^6 내지 10^9 TCID₅₀ 사이를 포함한다.

[0234] 본 출원에 제공되는 제약학적 조성물은 일반적으로 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 보존제, 보조제, 희석제 및/또는 안정화제를 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질들은 물, 염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤 또는 유화제, pH 완충 물질 등이 될 수 있다. 적합한 담체는 통상적으로 크고, 서서히 대사되는 분자들, 가령, 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리머 아미노산, 아미노산 코폴리머, 지질 응집체 등이 있다.

- [0235] 백신의 제조를 위해, 본 출원은 생리학적으로 허용가능한 형태로 전환될 수 있는 재조합 MVA 바이러스를 제공한다. 이는 H. Stickl 외., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974)에 의해 기재된 바와 같이 천연두에 대한 백신접종을 위해 사용되는 폭스바이러스 백신들의 제조에서의 경험에 기반하여 이루어질 수 있다.
- [0236] 예를 들어, 정제된 바이러스는 약 10 mM Tris, 140 mM NaCl pH 7.4에서 5×10^8 TCID₅₀/m1의 역가로 제제화되어 -80°C에서 보관될 수 있다. 백신 주사를 제조하기 위하여, 예컨대, 상기 바이러스의 10^2 - 10^8 또는 10^2 - 10^9 개 입자들은 앰플, 바람직하게는 유리 앰플에서 2% 웨튼 및 1% 인간 알부민이 존재하는 100 m1의 인산-완충 식염수 (PBS)에서 냉동건조 될 수 있다. 대안적으로, 백신 주사는 제제 내 바이러스의 단계적 동결-건조에 의해 제조될 수 있다. 이러한 제형은 생체내 투여에 적합한 추가적인 첨가제들, 가령, 만니톨, 엑스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐파이롤리돈 또는 그 외 보조제들, 가령, 항산화제 또는 비활성 기체, 안정화제 또는 재조합 단백질들 (예컨대, 인간 혈청 알부민)을 내포할 수 있다. 그 후 유리 앰플은 밀봉되어 몇달 간 4°C 내지 실온에 보관될 수 있다. 그러나, 수요가 없는 한, 앰플은 바람직하게는 -20°C 미만의 온도에서 보관된다.
- [0237] 백신접종 또는 치료요법을 위해, 동결건조물은 수용액에, 바람직하게는 생리식염수 또는 Tris 완충액에 용해되어, 전신으로 또는 국소로, 즉, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비강내, 또는 숙련된 기술자에게 공지된 임의의 그 외 투여 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식, 투여용량 및 회수는 공지된 방식으로 해당 분야의 숙련된 기술자에 의해 최적화될 수 있다. 그러나 가장 통상적으로 환자는 첫번째 백신접종 주사 후 약 1개월 내지 6주에 두번째 주사로 백신접종된다.
- [0238] **상동/이종 프라임-부스트 요법을 이용한 조합 백신**
- [0239] 본 출원에 기재된 조합 백신 및 방법들은 또한 상동 프라임-부스트 요법의 일부로서 사용될 수도 있다. 상동 프라임-부스트에서, 제 1 프라이밍 백신접종은 하나 이상의 후속 부스팅 백신접종을 수반한다. 부스팅 백신접종은 제 1 백신접종에서 사용되었던 동일한 재조합 폭스바이러스의 투여에 의하여 제 1 백신접종에서 생성된 면역 반응을 부스트하도록 설정된다.
- [0240] 한 예시적 구체예에서 본 출원에 정의된 MVA 바이러스 벡터가 제 1 투여량으로 투여되는 상동 프라임-부스트 요법이 이용될 수 있다. 제 1 투여에서 제공되는 면역 반응을 부스트시키기 위하여 본 출원에 정의된 MVA 바이러스 벡터의 1회 또는 그 이상의 후속 투여가 제공될 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 항원 결정인자들은 제 1 투여의 항원 결정인자들과 동일하거나 유사하다.
- [0241] 본 발명에 따른 MVA 및 FPV 재조합 바이러스 벡터들은 또한 본 출원에 정의된 MVA 또는 FPV 벡터를 이용한 1회 이상의 초기 프라임 백신접종이 실시되고 프라임 백신접종에서 사용되지 않은 폭스바이러스 벡터를 이용한 1회 이상의 후속 부스팅 백신접종이 실시되는 이종 프라임-부스트 요법에서 사용될 수 있는데, 예컨대, 본 출원에 정의된 MVA 벡터가 프라임 부스트로 제공되면, 후속 부스팅 백신접종은 FPV 벡터들이 될 것이고 그 역도 가능하다.
- [0242] 한 바람직한 구체예에서 프라임 백신접종은 MVA 벡터로 실시되고 부스팅 백신접종은 FPV로 실시된다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:
- [0243] a) 하나 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및
- [0244] b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;
- [0245] 여기서 제 1 조성물은 프라이밍 조성물이고 제 2 조성물은 부스팅 조성물이며, 바람직하게는 부스팅 조성물은 2회 이상 용량의 부스팅 조성물의 벡터를 포함한다.
- [0246] **재조합 MVA 및 FPV 바이러스를 포함하는 백신 및 키트**
- [0247] 본 출원은 본 출원에 기재된 임의의 재조합 FPV 및/또는 MVA를 하나 이상 포함하는 백신 및 키트를 제공한다. 키트는 하나 또는 다수의 재조합 MVA 또는 FPV 용기 또는 바이얼들을, 필로바이러스 감염 위험이 있는 개체에 재조합 MVA 및 FPV를 투여하는 것에 관한 지시사항들과 함께 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 개체는 인간이다. 특정 구체예들에서, 지시사항은 재조합 MVA가 단회 투여, 또는 다회 (즉, 2, 3, 4 등) 투여로 개체에 투여됨을 나타낸다. 특정 구체예들에서, 지시사항은 재조합 MVA 또는 FPV 바이러스가 경험 또는 무-경험 개체들에 제 1 (프라이밍) 및 제 2 (부스팅) 투여로 투여됨을 나타낸다. 바람직하게는, 키트는 제 1 바이얼/용기에 제 1

접종 ("프라이밍 접종")용으로 그리고 제 2 및/또는 추가 바이얼/용기에 적어도 제 2 및/또는 제 3 및/또는 추가 접종 ("부스팅 접종")용으로 본 출원에 기재된 재조합 MVA를 포함하는 프라임/부스트 면역화를 위한 둘 이상의 바이얼들을 포함한다.

- [0248] 한 바람직한 구체예에서 본 출원에서 제공되는 백신 및 키트는 제 2 필로바이러스 아형, 제 3 필로바이러스 아형 또는 4가지 이상의 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함한다.
- [0249] 한 바람직한 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 백신 및 키트는 제 1 조성물에 MVA 벡터를 포함하고, 제 1 조성물은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37으로 구성된 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0250] 또 다른 구체예에서 본 출원에서 제공되는 백신 및 키트는 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29 및 서열번호:31을 가지는 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 바람직하게는 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29 및 서열번호:31을 가지는 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 조성물을 포함한다.
- [0251] 또 다른 구체예에서 본 출원에서 제공되는 백신 및 키트는 4개 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하며, 바람직하게는 상기 4개의 상이한 필로바이러스 아형들은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37을 가지는 군에서 선택된다.
- [0252] 또 다른 바람직한 구체예에서 본 출원에서 제공되는 백신 및 키트는 하나 이상의 필로바이러스 아형에 대한 보호면역 반응을 생성함에 사용하기 위한 것이고, 여기서 제 1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하기 위하여 사용되고 제 2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하기 위하여 또는 하나 이상의 필로바이러스 아형에 대한 보호면역 반응을 생성함에 사용하기 위하여 사용되며, 제 2 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하기 위하여 사용되고 제 1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하기 위하여 사용된다. 본 출원에서 제공되는 임의의 백신 및 키트에서 부스팅 조성물은 2회 이상 용량의 부스팅 조성물의 벡터를 포함할 수 있다.
- [0253] 상기 이미 논의한 바와 같이, 본 발명은 또한 2가지 상이한 비-복제성 바이러스 벡터들을 사용하는 이종 백신접종 요법들에 관한 것이다.
- [0254] 이종 백신 프로그램에 관하여, 본 발명은 다음을 포함하는 조합 백신 및/또는 백신접종 키트를 제공한다:
- [0255] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및
- [0256] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;
- [0257] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.
- [0258] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 조합 백신 및/또는 백신접종 키트를 제공한다:
- [0259] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및
- [0260] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;
- [0261] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.
- [0262] 본 구체예에서, 조합 백신 및/또는 키트는 제 1 바이얼/용기에 제 1 접종 ("프라이밍 접종")용으로 그리고 제 2 및/또는 추가 바이얼/용기에 적어도 제 2 및/또는 제 3 및/또는 추가 접종 ("부스팅 접종")용으로 본 출원에 기재된 재조합 MVA/FPV를 포함하는 프라임/부스트 면역화를 위한 둘 이상의 바이얼들을 포함한다.
- [0263] 조합 백신 및/또는 키트는 다수의 재조합 MVA/FPV 용기 또는 바이얼들을, 필로바이러스 감염 위협이 있는 개체에 재조합 MVA/FPV를 투여하는 것에 관한 지시사항들과 함께 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 개체는 인간이다. 특정 구체예들에서, 지시사항은 재조합 MVA/FPV가 단회 투여, 또는 다회 (즉, 2, 3, 4 등)투여로 개체에 투여됨을 나타낸다. 특정 구체예들에서, 지시사항은 재조합 MVA/FPV 바이러스가 경험 또는 무-경험 개체들에 제

1 (프라이밍) 및 제 2 (부스팅) 투여로 투여됨을 나타낸다.

- [0264] 본 발명의 임의의 조합 백신, 백신접종 키트 및/또는 임의의 이종 백신 프로그램의 제 1 및/또는 제 2 조성물 또는 MVA 및/또는 FPV는 본 출원에 기재된 또는 "재조합 MVA 및 FPV"하에 추가로 정의된 임의의 MVA 및/또는 FPV 벡터 및 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0265] 한 바람직한 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 제 2 필로바이러스 아형의 항원 단백질, 제 3 필로바이러스 아형의 항원 결정인자, 4가지 필로바이러스 아형들의 항원 결정인자 또는 4가지 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 결정인자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함한다.
- [0266] 또 다른 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 에볼라 바이러스 (EBOV) 또는 마르부르크 바이러스 (MARV)에서 선택된 필로바이러스 아형을 포함한다.
- [0267] 또 다른 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV), 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV), 코트디브아르 에볼라 바이러스 (EBOV-CdI), 레스턴 에볼라 바이러스 (EBOV-레스턴) 및 분디부교 에볼라 바이러스 (BEBOV)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 EBOV 아형들로부터의 항원 결정인자를 포함한다.
- [0268] 또 다른 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 외피 당단백질 (GP), 핵단백질 (NP), 비리온 단백질 35 (VP35), 비리온 단백질 40 (VP40), 비리온 단백질 30 (VP30), 비리온 단백질 24 (VP24), 및 RNA-유도(RNA-directed) RNA 중합효소 단백질 (L)로 구성된 군에서 선택된 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 포함한다.
- [0269] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호: 20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 조성물에 MVA 벡터를 포함한다.
- [0270] 또 다른 구체예에서 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 4가지 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함하며, 바람직하게는 상기 4가지 상이한 필로바이러스 아형들은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호: 20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37을 가지는 군에서 선택된다.
- [0271] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29 및 서열번호:31을 가지는 군에서 선택된 4가지 상이한 필로바이러스 아형들로부터 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함한다.
- [0272] 또 다른 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 조합 백신은 하나 이상의 필로바이러스 아형, 바람직하게는 둘 이상의, 더욱 바람직하게는 4가지 이상의 필로바이러스 아형에 대한 보호 면역 반응을 생성함에 사용하기 위한 것이다.
- [0273] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명은 하나 이상의 필로바이러스 아형, 둘 이상의 필로바이러스 아형, 셋 이상의 또는 4가지 이상의 필로바이러스 아형들에 대한 보호 면역 반응을 생성하기 위한 또는 증강된 면역 반응을 유도하기 위한 약물 또는 백신으로서 사용하는 것에 관한 임의의 구체예들의 조합 백신 또는 재조합 MVA에 관한 것이며, 여기서 MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성할 수 있으며, 바람직하게는, MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성한다.
- [0274] **재조합 MVA/FPV 바이러스의 방법 및 용도**
- [0275] 또한 본 출원은 대상 동물을 면역화시키는 방법에 사용하기 위한 또는 개체에서 면역 반응을 일으키는데 사용하기 위한 본 출원에 기재된 방법들 및/또는 임의의 재조합 MVA/FPV를 제공한다. 대상 동물의 면역화를 위한 약물 또는 약제의 제조에 있어, 특히 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신 제조에 있어 본 출원에 기재된 재조합 MVA/FPV의 용도 또한 포함된다. 또한 필로바이러스에 대한 면역 반응을 프라이밍 또는 부스팅하는데 사용하기 위한 본 출원의 임의의 구체예에 따른 재조합 MVA/FPV가 제공되는데, 바람직하게는 재조합 MVA 및/또는 재조합 FPV는 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여된다.
- [0276] 본 출원은 필로바이러스 감염에 대한 증강된 면역 반응을 유도하기 위한 약물 또는 백신으로서 사용하기 위한 임의의 구체예들의 백신 조합물 또는 재조합 MVA를 추가로 포함하며, 여기서 MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성할 수 있으며, 바람직하게는, MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성한다. 또한 필로바이러스 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약물 또는 백신으로서 사용하기 위한 임의의 구체예들의 백신 조합물 또는 재조합 MVA가 포함되며, 여기서 MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성

할 수 있고, 바람직하게는, MVA는 치료될 개체에서 필로바이러스-유사 입자들을 생성한다.

[0277] 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은 개체에서 필로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 개체에 다음을 투여하는 것을 포함한다:

[0278] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0279] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 계두 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0280] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0281] 또다른 구체예에서, 본 발명은 개체에 필로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 다음을 개체에 투여하는 것을 포함한다:

[0282] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0283] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0284] 여기서 상기 조성물들 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나는 부스팅 조성물이다.

[0285] 또다른 구체예에서, 본 출원에 제공된, 필로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법, 대상 동물의 면역화를 위한 약물의 제조에 있어, 특히, 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신을 제조함에 있어 본 출원에 기재된 재조합 MVA/FPV의 사용, 또는 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 반응을 제공하는데 사용하기 위한 임의의 구체예들의 조합 백신은, 제 2 필로바이러스 아형의, 제 3 필로바이러스 아형의 또는 4가지 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함한다.

[0286] 또다른 구체예에서, 본 출원에 제공된, 필로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법, 대상 동물의 면역화를 위한 약물의 제조에 있어, 특히, 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신을 제조함에 있어 본 출원에 기재된 재조합 MVA/FPV의 사용, 또는 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 반응을 제공하는데 사용하기 위한 임의의 구체예들의 조합 백신은, 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 제 1 조성물 내 MVA 벡터를 포함한다.

[0287] 또다른 구체예에서, 본 출원에 제공된, 필로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법, 대상 동물의 면역화를 위한 약물의 제조, 특히 개체에서 필로바이러스-유발 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물 또는 백신의 제조에 있어 본 출원에 기재된 재조합 MVAs/FPV의 사용 또는 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 반응을 제공하는데 사용하기 위한 임의의 구체예들의 조합 백신은 4가지 이상의 필로바이러스 아형들의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 포함하는 제 1 조성물을 포함하며, 바람직하게는 4가지 상이한 필로바이러스 아형들은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37을 가지는 군에서 선택된다.

[0288] 또다른 구체예에서, 본 발명은 개체에서 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 및/또는 보호 면역 반응을 제공하는 방법을 제공한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 개체에서 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 및/또는 보호 면역 반응을 제공하는 방법을 제공한다:

[0289] (a) 둘 이상의 필로바이러스 아형들, 바람직하게는 셋 이상의 또는 4가지 이상의 상이한 필로바이러스 아형들의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 MVA 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 1 조성물; 및

[0290] (b) 제 1 필로바이러스 아형의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역학적 유효량의 FPV 벡터를, 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제 2 조성물;

[0291] 상기 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 하나의 조성물은 부스팅 조성물이며, 바람직하게는 제 2 조성물이 부스팅 조성물이고, 바람직하게는 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여되는 부스팅 조성물이다.

- [0292] 또 다른 구체예에서, 임의의 구체예들의 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 및/또는 보호 면역 반응을 제공하는 방법은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37로 구성된 군에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 조성을 내 MVA 벡터를 포함한다.
- [0293] 또 다른 구체예에서, 임의의 구체예들의 필로바이러스 감염에 대한 보호 면역 및/또는 보호 면역 반응을 제공하는 방법은 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:20, 서열번호:29, 서열번호:31, 서열번호:34 및 서열번호:37을 가지는 4가지 상이한 필로바이러스 아형들로부터의 항원 단백질들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 조성을 내 MVA 벡터를 포함한다.
- [0294] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 필로바이러스-유사 입자들을 생성하는 방법 또는 개체에서 필로바이러스에 대한 증강된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 개체에서 임의의 구체예들의 필로바이러스-유사 입자들의 생성을 포함하며, 여기서 필로바이러스 VP40은 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV), 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV), 코트디브아르 에볼라 바이러스 (EBOV-CdI), 레스턴 에볼라 바이러스 (EBOV-레스턴) 및 분디부교 에볼라 바이러스 (BEBOV)로 구성된 군에서 선택되고, 바람직하게는 필로바이러스 VP40은 하나 이상의 ZEBOV, SEBOV 및 MARV에서 선택된다.
- [0295] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 필로바이러스-유사 입자들의 생성 방법 또는 개체에서 필로바이러스에 대한 증강된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 개체에서 임의의 구체예들의 필로바이러스-유사 입자들의 생성을 포함하며, 여기서 필로바이러스 당단백질 및 필로바이러스 VP40은 동일한 필로바이러스 균주에서 선택된다.
- [0296] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 필로바이러스-유사 입자들의 생성 방법 또는 개체에서 필로바이러스에 대한 증강된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 개체에서 임의의 구체예들의 필로바이러스-유사 입자들의 생성을 포함하고, 여기서 MVA 벡터는 필로바이러스 핵단백질 (NP)을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함하고, 바람직하게는 필로바이러스 핵단백질 및 필로바이러스 VP40은 동일한 필로바이러스 균주에서 유래된다.
- [0297] 또 다른 구체예에서, 임의의 상기 방법들의 필로바이러스 균주는 자이르-마잉가, 자이르-키크위트, 자이르-가봉, 코트디브아르 에볼라 바이러스, 수단-보니파시오, 수단-말레오, 수단-굴루, 마르부르크-라븐, 마르부르크-오졸린, 마르부르크-라타이작, 마르부르크-무소케, 마르부르크-앙골라, 바람직하게는 자이르-마잉가 또는 코트디브아르 에볼라 바이러스의 군에서 선택되고, 바람직하게는 필로바이러스 VP40은 자이르-마잉가 또는 마르부르크-무소케의 군에서 선택되고, 더욱 바람직하게는 필로바이러스 VP40은 서열번호:34의 단백질 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하거나 필로바이러스 VP40의 항원 단백질을 인코딩하는 핵산은 서열번호:33을 포함한다.
- [0298] 본 출원에서 사용되는, 용어 "보호 면역" 또는 "보호 면역 반응"은 백신접종된 개체가 백신접종이 이루어졌던 병원성 제제의 감염을 제어할 수 있음을 의미한다. 통상적으로, "보호 면역 반응"이 발생한 개체는 단순히 가벼운 내지 보통의 임상 증상들만을 발생시키거나 증상들을 전혀 발생시키지 않는다. 통상적으로, 특정 제제에 대한 "보호 면역 반응" 또는 "보호 면역"을 가지는 개체는 상기 제제의 감염 결과로 사망하지 않을 것이다. 특정 구체예들에서, 개체 동물은 포유동물이다. 포유동물은 성체 암소, 송아지, 특히, 어린 송아지, 래트(rat), 토끼, 돼지, 마우스일 수 있으나, 바람직하게는 인간일 수 있고, 상기 방법은 본 출원에서 제공된 임의의 하나 이상의 재조합 MVA/FPV의 용량을 상기 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0299] 특정 구체예들에서, 개체는 인간이다. 특정 구체예들에서, 개체는 성인이다. 특정 구체예들에서, 성인은 면역-손상되어 있다. 특정 구체예들에서, 성인은 10, 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 또는 85세 이상이다. 특정 구체예들에서, 개체의 연령은 5세 미만, 3세 미만, 2세 미만, 15개월 미만, 12개월 미만, 9개월 미만, 6개월 미만, 또는 3개월 미만이다. 특정 구체예들에서, 개체의 연령은 0-3개월, 3-6개월, 6-9개월, 9-12개월, 1-2세, 또는 2-5세이다.
- [0300] 본 출원에서 제공되는 임의의 재조합 MVA/FPV는 10^6 내지 10^{10} TCID₅₀ 바람직하게는 10^6 내지 10^9 TCID₅₀의 용량, 예컨대, 10^6 내지 10^9 TCID₅₀, 10^6 내지 5×10^8 TCID₅₀, 10^7 내지 10^8 TCID₅₀, 5×10^7 TCID₅₀ 내지 5×10^8 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀ 또는 10^8 TCID₅₀의 용량으로 개체에 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 재조합 MVA/FPV 벡터는 1×10^8 TCID₅₀ 내지 1×10^{10} TCID₅₀의 양으로 투여된다. 또 다른 구체예에서, 재조합 MVA/FPV는 1×10^8 TCID₅₀ 내지 5×10^9 의

양, 바람직하게는 5×10^8 TCID₅₀ 내지 6×10^9 의 양으로 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 임의의 재조합 MVA는 인간 개체에 10^7 TCID₅₀ 또는 10^8 TCID₅₀ 또는 5×10^8 TCID₅₀의 용량으로 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 임의의 재조합 FPV는 인간 개체에 5×10^8 , 6.3×10^8 또는 1×10^9 TCID₅₀의 용량으로 투여된다.

[0301] 또 다른 구체예에서, 본 출원에서 제공되는 재조합 MVA는 재조합 FPV 보다 적은 용량으로 인간 개체에 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 임의의 재조합 MVA/FPV는 필로바이러스 노출에 앞서, 예컨대, 필로바이러스 노출 전 1, 2, 3, 또는 4주 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월에 본 출원에서 제공되는 임의의 용량으로 개체에 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 임의의 재조합 MVA/FPV는 필로바이러스 노출 후, 예컨대, 필로바이러스 노출 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일에 본 출원에서 제공되는 임의의 용량으로 개체에 투여된다.

[0302] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 재조합 MVA/FPV는 단회 투여, 또는 다회 (즉, 2, 3, 4 등) 투여로 개체에 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 재조합 MVA/FPV는 제 1 (프라이밍) 및 제 2 (부스팅) 투여로 투여된다. 제 1 용량은 10^7 내지 10^8 TCID₅₀의 재조합 MVA/FPV 바이러스를 포함할 수 있으며 제 2 용량은 10^7 내지 10^8 TCID₅₀의 재조합 MVA/FPV 바이러스를 포함할 수 있다.

[0303] 부스팅 조성물은 일반적으로 프라이밍 조성물 투여 후 수주 또는 수개월, 예를 들어, 약 1 또는 2주 또는 3주, 또는 4주, 또는 6주, 또는 8주, 또는 16주, 또는 20주, 또는 24주, 또는 28주, 또는 32주 또는 1 내지 2년에 1회 또는 다회 투여된다.

[0304] 바람직하게는, 초기 부스팅 접종은 프라이밍 후 1-12주 또는 2-12주에, 더욱 바람직하게는 프라이밍 후 1, 2, 4 또는 8주에 투여된다. 한 바람직한 구체예에서, 초기 부스팅 접종은 프라이밍 후 4 또는 8주에 투여된다. 추가적인 바람직한 구체예들에서, 초기 부스팅은 프라이밍 후 2주 이상 또는 4주 이상에 수행된다. 또한 또 다른 바람직한 구체예에서, 초기 부스팅은 프라이밍 후 4-12주 또는 4-8주에 수행된다.

[0305] 본 출원에서 제공되는 재조합 MVA/FPV는 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 특정 구체예들에서, 재조합 MVA/FPV는 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 또는 비강내, 특히 피하 투여된다. 바람직하게는, 재조합 MVA/FPV는 비강내 투여된다. 그 외 구체예들에서, 재조합 MVA/FPV는 숙련된 기술자에게 공지된 임의의 그 외 투여 경로에 의해 투여된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 MVA/FPV는 근육내 투여되며, 바람직하게는 재조합 MVA/FPV는 약 $100 \mu\text{l}$ 내지 약 10 ml 범위의 부피로, 바람직하게는 예컨대, 약 10^4 내지 10^{10} 개 바이러스 입자/ ml 농도를 함유하는 부피로 근육내 투여된다. 바람직하게는, 재조합 MVA/FPV 백터는 0.25 내지 1.0 ml 범위의 부피로 투여된다. 더욱 바람직하게는, 재조합 MVA/FPV 백터는 약 0.5 ml 의 부피로 투여된다.

재조합 MVA/FPV 백터의 제조 방법

[0307] 또 다른 구체예들은 다음 단계들을 포함하는, 본 발명의 임의의 구체예들의 재조합 MVA 백터 또는 상기 재조합 MVA 백터의 유전체로부터 발현된 항원 결정인자를 제조하는 방법을 포함한다:

[0308] (a) 바람직하게는 MVA 바이러스 입자들의 생성을 위한 보조 바이러스가 추가된, 임의의 구체예들의 재조합 MVA 바이러스로 숙주 세포를 감염 또는 임의의 구체예들의 재조합 MVA 바이러스의 재조합 DNA로 세포를 형질감염시키는 단계,

[0309] (b) 감염 또는 형질감염 세포를 배양하는 단계, 및

[0310] (c) 상기 세포로부터 MVA 바이러스 및/또는 항원 결정인자를 분리하는 단계.

[0311] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 재조합 백터의 제조 방법으로부터 수득된 재조합 MVA 바이러스 및/또는 항원 결정인자에 관한 것이다.

[0312] 또 다른 구체예들은 다음 단계들을 포함하는, 본 발명의 임의의 구체예들의 재조합 FPV 백터 또는 상기 재조합 FPV 백터의 유전체로부터 발현된 항원 결정인자를 제조하는 방법을 포함한다:

[0313] (a) 바람직하게는 FPV 바이러스 입자들의 생성을 위한 보조 바이러스가 추가된, 임의의 구체예들의 재조합 FPV

바이러스로 숙주 세포를 감염 또는 임의의 구체예들의 재조합 FPV 바이러스의 재조합 DNA로 세포를 형질감염시키는 단계,

[0314] (b) 감염 또는 형질감염 세포를 배양하는 단계, 및

[0315] (c) 상기 세포로부터 FPV 바이러스 및/또는 항원 결정인자를 분리하는 단계.

[0316] 또다른 구체예에서, 본 발명은 재조합 벡터의 제조 방법으로부터 수득된 재조합 FPV 바이러스 및/또는 항원 결정인자에 관한 것이다.

[0317] 또다른 구체예에서, 본 발명은 다음 단계들을 포함하는 재조합 MVA 벡터의 생성방법에 관한 것이다:

[0318] (a) 숙주 세포를 MVA 바이러스로 감염시키는 단계,

[0319] (b) 감염된 세포를 임의의 단백질들의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질감염시키는 단계, 상기 핵산 서열은 MVA 바이러스 유전체로 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 통합을 유도할 수 있는 유전체 MVA 바이러스 서열을 추가로 포함하며, 그리고

[0320] (c) 생성된 재조합 MVA 바이러스의 식별, 분리 및 선택적 정제단계.

[0321] 또다른 구체예에서, 본 발명은 다음 단계들을 포함하는 재조합 FPV 벡터의 생성방법에 관한 것이다:

[0322] (a) 숙주 세포를 FPV 바이러스로 감염시키는 단계,

[0323] (b) 감염된 세포를 임의의 단백질들의 항원 결정인자를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질감염시키는 단계, 상기 핵산 서열은 FPV 바이러스 유전체로 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 통합을 유도할 수 있는 유전체 FPV 바이러스 서열을 추가로 포함하며, 그리고

[0324] (c) 생성된 재조합 FPV 바이러스의 식별, 분리 및 선택적 정제단계.

[0325] 본 발명의 그 외 구체예들은 본 출원에 개시된 본 발명의 상세한 설명 및 실시예를 고려하여 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들에게 자명해질 것이다. 상세한 설명 및 실시예는 오직 예시적인 것으로 고려되어야 하며, 본 발명의 진정한 범위 및 사상은 첨부된 청구범위에 나타내고자 한다.

[0326]

실시예

[0327]

[0328] 하기 상세한 실시예들은 본 발명을 보다 잘 이해하기 위한 것이다. 그러나 본 발명은 실시예에 의해 제한되지 않는다. 본 발명의 그 외 구체예들은 본 출원에 개시된 본 발명의 상세한 설명 및 실시예를 고려하여 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들에게 자명해질 것이다.

[0329]

실시예 1: 재조합 MVA의 작제

[0330]

하기 부분은 필로바이러스 외피 당단백질 및/또는 다른 필로바이러스 단백질의 항원 결정인자를 발현시키는 하나 이상의 이종 핵산들을 포함하는 재조합 MVA의 작제를 기재한다. 본 출원에 기재된 모든 그 외 작제는 유사한 방법을 이용하여 이루어진다.

[0331]

MVA-mBN252B (PrS-GP-MARV-무소케)의 작제

[0332]

자연-발생 GP-MARV-무소케 유전자 (빅토리아 호 분리주)의 전장 DNA 서열은 MARV 백신 후보 MVA-mBN252B의 작제를 위한 기준 서열로 사용되었다. 전장 GP-MARV-무소케를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인간에서의 발현에 그리고 내부적인 상동 재조합 발생을 최소화하거나 방지하는데 최적화된 코돈을 사용하여 Geneart AG사 (Regensburg, 독일)에 의해 합성되었다. 코돈 최적화가 야생형 DNA 서열을 변화시켰다 하더라도, 코돈-최적화 서열은 야생형 GP-MARV-무소케와 동일한 아미노산 서열을 인코딩한다 (서열번호:6; NCBI 등록 번호 ABA87127.1). GP-MARV-무소케의 발현은 백시니아 바이러스 프로모터의 초기 및 후기 요소들로부터 설계된 합성 프로모터인 프로모터 PrS에 의해 추진된다 (서열번호:23; S. Chakrabarti 외., "Compact, Synthetic Vaccinia Virus Early/Late Promoter for Protein Expression", *BioTechniques* 23(6):1094-1097 (1997) 참조). 코돈-최적화 GP-MARV-무소케 유전자는 결실 부위들 또는 유전자간 (비-코딩) 구역들 (IGR)을 비롯한, MVA-BN 유전체의 상이한 특정 구역들을 표적화하는 몇가지 맞춤형 재조합 플라스미드 중 하나를 사용하는 표준 방법들 (하기 참조)에 의해 MVA-BN 유전체 내부로 삽입되었다.

- [0333] 코돈-최적화 GP-MARV-무소케 유전자를 MVA-BN 유전체 내부로 삽입하기 위하여, 닫 배아 섬유모세포 (CEF 세포)를 MVA-BN로 감염시키고 후속적으로 재조합 플라스미드 pBN433 (도 5A)으로 형질감염시켰다. pBN433은 BspEI/NheI 제한을 통해 플라스미드 pBNX197(도 4B)로 삽입된 힙성 PrS 프로모터의 제어하에 코돈-최적화 GP-MARV-무소케 유전자 (서열번호:6 (아미노산)을 인코딩하는 서열번호:5 (DNA))를 내포한다. 플라스미드 pBN433은 또한 loxP 부위들에 의해 플랭크된 선별 카세트 및 MVA-BN 유전체 내 IGR 148/149를 플랭크시키는 MVA-BN DNA 서열들을 내포하며, 이는 Cre 재조합효소-매개 재조합에 의한 선별 카세트의 차후 제거를 가능하게 한다. MVA-BN 유전체 내의 원하는 삽입 부위에서 (즉, IGR 148/149) 상동 서열들과 플라스미드 내 플랭킹 서열들 간의 상동 재조합 후, 상기 플라스미드의 코딩 부분은 MVA-BN 유전체 내 원하는 부위로 삽입되었다.
- [0334] 선택적 조건들 하에서 (마이코페놀산/잔틴 및 하이포잔틴) 증폭 및 플라크 정제 (9회 계대; 이들 중 3회는 플라크 정제 포함) 후, GP-MARV-무소케에 관한 유전자를 내포하는, MVA-mBN252A (프리마스터 A, PreMaster A)로 표기된 재조합 MVA-BN 생성물이 수득되었다. 재조합 MVA-mBN252A 프리마스터 바이러스 스톡을 MVA-BN의 제거 (부모 바이러스; 데이터 도시되지 않음), 삽입 플랭킹 구역들과 함께 삽입된 유전자의 올바른 서열 (내부에 외래 유전자가 삽입되었던 MVA-BN 유전체 서열에 특이적인 프라이머를 사용하는 유전자-특이적 PCR에 의함; 데이터 도시되지 않음), 미생물의 부재 (멸균 테스트; 데이터 도시되지 않음), 및 인서트의 존재 및 올바른 크기 (서열 분석에 의함; 데이터 도시되지 않음)에 관하여 시험하였다. MVA-mBN252A 프리마스터 바이러스 스톡의 역가 또한 결정되었다.
- [0335] 삽입된 서열 내 선별 카세트의 존재는 배양에서 재조합 MVA-BN 바이러스에 관한 양성 선별을 가능하게 한다. 최종 재조합 MVA-mBN252B를 생성하기 위하여, 선별 카세트를 Cre/loxP 시스템을 이용하여 MVA-mBN252A 프리마스터 바이러스 스톡으로부터 제거하였다. 선별 카세트를 제거하기 위하여, 플라스미드 pBN433의 인서트 (즉, loxP 부위들에 의하여 플랭크된 선별 카세트에 더하여, PrS 프로모터의 제어하에 있는 GP-MARV-무소케)를 함유하는 재조합 MVA-BN으로 감염된 CEF 세포들을 CRE 재조합효소를 인코딩하는 발현 플라스미드인 pBN274 (도 4C)로 추가 형질감염시켰다. 부위-특이적 Cre-재조합효소는 표적 loxP 서열에 의하여 플랭크된 선별 카세트 DNA 서열들의 정확한 절제를 촉매화하여, 선별 카세트를 완전히 제거하였다. 생성된 바이러스는 비-선택적 조건들 하에서 플라크 정제되었으며 (27회 계대; 이들 중 9회는 플라크 정제 포함), 선별 카세트가 없는 재조합 바이러스 MVA-mBN252B가 분리되었다. 선별 카세트의 완전한 제거를 네스티드 PCR로 확인하였다 (데이터 도시되지 않음). 마지막으로, 재조합 MVA-mBN252B에 의한 GP-MARV-Musok의 발현을 역전사효소 PCR로 확인하였다 (RT-PCR; 데이터 도시되지 않음).
- [0336] **MVA-mBN226B의 작제 (다수-항원 MVA-Filo)**
- [0337] MVA-mBN226B로부터 발현되는 모든 이식유전자들에 관하여, 자연-발생 유전자들의 전장 DNA 서열들이 기준 서열들로 사용되었다. 이들은 인간에서의 발현에 그리고 내부적인 상동 재조합 발생을 최소화하거나 방지하는데 최적화된 코돈을 사용하여 Geneart AG사 (Regensburg, 독일)에 의해 합성되었다. 코돈 최적화는 아미노산 서열을 변화시키지 않고 야생형 DNA 서열을 변화시켰다. MVA-mBN226B는 하기 필로바이러스 유전자들을 내포한다: GP-SEBOV (서열번호:30); NP-EBOV-CdI (서열번호:28); GP-ZEBOV, 마잉가 균주 (GP-ZEBOV-마잉가, 서열번호:19) 및 GP-MARV-무소케 (서열번호:5). GP-SEBOV 및 GP-MARV-무소케는 PrS 프로모터 (서열번호:23)의 제어하에 발현되고, NP-EBOV-CdI는 PrLE1 또는 변형된 PrLE1 프로모터 (서열번호:27 및 서열번호:32)의 제어하에 발현되며, 그리고 GP-ZEBOV-마잉가는 Pr7.5 프로모터 (서열번호:25)의 제어하에 발현된다.
- [0338] PrS 프로모터는 백시니아 바이러스 프로모터의 초기 및 후기 요소들로부터 설계된 합성 프로모터이며, 이는 유전자 발현의 초기 및 후기 단계 모두 동안 반드시 이식유전자를 발현시킨다. 유사하게, 백시니아 바이러스 7.5 kDa 유전자로부터의 Pr7.5 프로모터는 강력한 초기 및 후기 프로모터이며, 이는 그 제어하에 있는 이식유전자들 또한 유전자 발현의 초기 및 후기 단계들 모두 동안 발현될 것임을 의미한다 (서열번호:25; see also M.A. Cochran 외., "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals", *J. Virol.* 54(1):30-37 (1985)). 프로모터 PrLE1은 Pr7.5로부터 유래된 5개의 최적화된 초기 요소들에 융합된 우두 바이러스(ATI)의 A-형 봉입체 프로모터로 구성된 합성 프로모터이다 (서열번호:27; 또한 K. Baur 외., "Immediate-Early Expression of a Recombinant Antigen by Modified Vaccinia Virus Ankara Breaks the Immunodominance of Strong Vector-Specific B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T-Cell Responses", *J. Virol.* 84(17):8743-8752 (2010) 참조). 결과적으로, NP-EBOV-CdI는 초기 및 후기 발현 단계들 모두 동안 발현될 것이다. 더욱이, PrLE1은 특히 강력한 세포-매개 면역 반응들을 유도하는 것으로 나타났다. MVA-mBN226B의 계대 동안, Pr7.5로부터 유래된 5개의 초기 요소들 중 하나는 상동 재조합에 의해 손실되었을 수 있다; 분석은 NP-EBOV-CdI의 충분한 발현 수준을 보여주었으나 (데이터 도시

되지 않음), 이렇게 변형된 구조체는 변형된 PrLE1 프로모터를 대체하지 않고 사용되었다.

[0339] MVA-BN 유전체로 외래 유전자들을 삽입하기 위해 MVA-BN 유전체의 상이한 결실 및 유전자간 구역들(IGR)을 표적하는 몇가지 재조합 플라스미드가 생성되었다. 재조합 MVA-BN 생성물들을 생성하기 위하여, 관심 외래 서열들은 통상적으로 이용가능한 제한 효소들 및 종래의 분자 생물학 기법들을 사용하여 임의의 이러한 기본 벡터들, 예컨대, IGR 88/89를 표적하는 pBNX186 (도 4A 참조) 또는 IGR 148/149를 표적하는 pBNX197 (도 4B 참조)로 삽입될 수 있다. 원하는 이식유전자들을 발현시키는 재조합 MVA-BN 분리주를 제조하기 위하여, 그 후 CEF 세포들을 MVA-BN으로 감염시키고 후속하여 원하는 이식유전자 또는 이식유전자들을 발현시키며 재조합 바이러스에 대한 양성 선별을 가능하게 하는 선별 카세트를 포함하는 하나 이상의 재조합 플라스미드로 형질감염시킨다. 상동 재조합 동안, 플라스미드 플랭킹 서열들은 MVA-BN 바이러스 유전체에서 삽입 부위의 상동 서열들과 재조합한다. 이것은 플라스미드 서열들을 MVA-BN 유전체에서 출발 물질로 사용되는 기본 벡터에 의하여 표적되는 부위로 삽입시킨다 (예컨대, IGR 148/149, IGR 88/89, 등). pBNX197은 IGR 148/149 (도 4B)를 표적하여 최종 재조합 플라스미드 pBN384 (도 5B)의 작제를 위한 출발 플라스미드로서 사용되었다. 플라스미드 pBN384는 GP-ZEBOV-마잉가 및 GP-MARV-무소케를 발현시킨다. pBNX 186은 IGR 88/89 (도 4A)를 표적하여 최종 재조합 플라스미드 pBN385 (도 5C)의 작제를 위한 출발 플라스미드로서 사용되었다. 플라스미드 pBN385는 GP-SEBOV 및 NP-EBOV-CdI를 발현시킨다.

[0340] GP-SEBOV, NP-EBOV-CdI, GP-ZEBOV-마잉가, 및 GP-MARV-무소케 이식유전자들을 MVA-BN에 삽입하기 위하여, CEF 세포들을 MVA-BN으로 감염시켰고 후속하여 재조합 플라스미드 pBN384 및 pBN385로 형질감염시켰다. 이중 선택적 조건들 하에서 (마이코페놀산/잔틴 및 하이포잔틴 뿐만 아니라 Geneticin) 증폭 및 플라크 정제 (10회 계대; 3회는 플라크 정제 포함) 후, 3개의 당단백질, 1개의 핵단백질 및 2개의 선별 카세트에 관한 유전자들을 내포하는 MVA-mBN226A (Interim 프리마스터)를 지정하는 재조합 MVA-BN 생성물이 수득되었다. 재조합 MVA-mBN226A 프리마스터 바이러스 스톡을 MVA-BN의 제거 (부모 바이러스; 데이터 도시되지 않음), 삽입 플랭킹 구역들과 함께 삽입된 유전자들의 올바른 서열 (내부에 외래 유전자가 삽입되었던 MVA-BN 유전체 서열에 특이적인 프라이머를 사용하는 유전자-특이적 PCR에 의함; 데이터 도시되지 않음), 미생물의 부재 (멸균 테스트; 데이터 도시되지 않음), 및 인서트의 존재 및 올바른 크기 (서열분석에 의함; 데이터 도시되지 않음)에 관하여 시험하였다. MVA-mBN252A 프리마스터 바이러스 스톡의 역가 또한 결정되었다.

[0341] 비-선택적 조건들하에 추가 증폭, 선별 카세트의 제거 및 플라크 정제 (20회 계대; 6회는 플라크 정제 포함) 후 선별 카세트가 없는 재조합 바이러스 MVA-mBN226B가 분리되었다. 선별 카세트의 완전한 제거를 네스티드 PCR로 확인하였다 (데이터 도시되지 않음). 마지막으로, 재조합 MVA-mBN226B에 의한 이식유전자의 발현을 역전사효소 PCR로 확인하였다 (RT-PCR; 데이터 도시되지 않음).

MVA-mBN254A (MVA-GP-ZEBOV)의 작제

[0343] MVA-mBN254A로부터 발현되는 GP-ZEBOV 이식유전자에 관하여, 자연-발생 유전자의 전장 DNA 서열이 기준 서열들로 사용되었다. GP-ZEBOV 유전자는 "MVA-mBN226B의 작제"에서 기재된 바와 같이 인간에서의 발현에 그리고 내부적인 상동 재조합 발생을 최소화하거나 방지하는데 최적화된 코돈을 사용하여 Geneart AG사 (Regensburg, 독일)에 의해 합성되었다. 코돈 최적화는 아미노산 서열을 변화시키지 않고 야생형 DNA 서열을 변화시켰다. GP-ZEBOV-마잉가는 PrS5E 프로모터 (서열번호:24)의 제어하에 발현된다.

[0344] PrS5E (서열번호:24)는 합성의 초기 및 후기 프로모터로부터 설계된 강력한 합성 초기 및 후기 프로모터이며 (Chakrabarti 외., 1997), 백시니아 바이러스 7.5 kDa 유전자로부터의 Pr7.5 프로모터의 5개 초기 요소들을 수반한다 (서열번호:25; 또한 M.A. Cochran 외., "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals", *J. Virol.* 54(1):30-37 (1985) 참조). PrS5E 프로모터는 특히 출원 WO 2013/189611A1에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0345] MVA-BN 유전체로 외래 유전자들을 삽입하기 위해 MVA-BN 유전체의 상이한 결실 및 유전자간 구역들(IGR)을 표적하는 몇가지 재조합 플라스미드가 작제되었다. 재조합 MVA-BN 생성물들을 생성하기 위하여, 관심 외래 서열들은 통상적으로 이용가능한 제한 효소들 및 종래의 분자 생물학 기법들을 사용하여 임의의 이러한 기본 벡터들, 예컨대, IGR 148/149를 표적하는 pBNX197 (도 4B 참조)로 삽입될 수 있다. 원하는 이식유전자들을 발현시키는 재조합 MVA-BN 분리주를 제조하기 위하여, 그 후 CEF 세포들을 MVA-BN으로 감염시키고 후속하여 원하는 이식유전자 또는 이식유전자들을 발현시키며 재조합 바이러스에 대한 양성 선별을 가능하게 하는 선별 카세트를 포함하는 하나 이상의 재조합 플라스미드로 형질감염시킨다. 상동 재조합 동안, 플라스미드 플랭킹 서열들은 MVA-BN 바이러스 유전체에서 삽입 부위의 상동 서열들과 재조합한다. 이것은 표적 서열들을 MVA-BN 유전체에서 출발 물

질로 사용되는 기본 벡터에 의하여 표적되는 부위(예컨대, IGR 148/149)로 삽입시킨다. pBNX197은 IGR 148/149(도 4B)를 표적하여 최종 재조합 플라스미드 pBN436(도 5D)의 작제를 위한 출발 플라스미드로서 사용되었다. 플라스미드 pBN436은 GP-ZEBOV-마잉가를 내포한다.

[0346] GP-ZEBOV-마잉가 이식유전자를 MVA-BN에 삽입하기 위하여, CEF 세포들을 MVA-BN로 감염시켰고 후속하여 재조합 플라스미드 pBN436(도 5D)로 형질감염시켰다. 선택적 조건들하에서(마이코페놀산/잔틴 및 하이포잔틴) 증폭 및 플라크 정제(9회 계대; 3회 플라크 정제 포함) 후, GP-ZEBOV-마잉가에 관한 유전자 및 선별 표지 GPT-RFP 융합 유전자(도 3C)를 내포하는, MVA-mBN254A(프리마스터)를 지정하는 재조합 MVA-BN 생성물이 수득되었다. 재조합 MVA-mBN254A 프리마스터 바이러스 스톱을 MVA-BN의 제거(부모 바이러스; 데이터 도시되지 않음), 삽입 플랭킹 구역들과 함께 삽입된 유전자들의 올바른 서열(내부에 외래 유전자가 삽입되었던 MVA-BN 유전체 서열에 특이적인 프라이머를 사용하는 유전자-특이적 PCR에 의함; 데이터 도시되지 않음), 미생물의 부재(멸균 테스트; 데이터 도시되지 않음), 및 인서트의 존재 및 올바른 크기(서열분석에 의함; 데이터 도시되지 않음)에 관하여 시험하였다. MVA-mBN254A 프리마스터 바이러스 스톱의 역가 또한 결정되었다. 마지막으로, 재조합 MVA-mBN254A에 의한 이식유전자의 발현을 역전사효소 PCR로 확인하였다(RT-PCR; 데이터 도시되지 않음).

[0347] 그 외 구조체들이 이에 따라 생성되었다. 특히, MVA-mBN255는 IGR 88/99에 통합된 PrS 프로모터의 제어하에 NP-EBOV-CdI(서열번호:28)를, IGR 136/137 내 PrS 프로모터의 제어하에 VP40 ZEBOV(서열번호:33)를 그리고 IGR 148/149 내 PrS5E 프로모터의 제어하에 GP-ZEBOV(서열번호:19)를 발현시켰다(도 13).

FPV-mBN368A (FPV-GP-ZEBOV) 및 FPV-mBN391 (FPV-multi-filo)의 작제

[0349] FPV-mBN368A로부터 발현되는 GP-ZEBOV 이식유전자에 관하여, 자연-발생 유전자의 전장 DNA 서열이 기준 서열들로 사용되었다. GP-ZEBOV 유전자는 "MVA-mBN226B의 작제"에 기재된 바와 같이 인간에서의 발현에 최적화된 코돈을 사용하여 Geneart AG사(Regensburg, Germany)에 의해 합성되었다. 코돈 최적화는 아미노산 서열을 변화시키지 않고 야생형 DNA 서열을 변화시켰다. GP-ZEBOV-마잉가는 FPV-40K 프로모터(서열번호:26)의 제어하에 발현된다. FPV-40K 프로모터는 FPV에서의 40K 단백질 코딩 서열의 FPV 프로모터 서열이다.

[0350] 외래 유전자들의 FPV 유전체로의 삽입을 위해, FPV 유전체로의 상이한 통합 부위들을 표적하는 몇 가지 재조합 플라스미드가 작제되었다. 재조합 FPV 생성물들을 생성하기 위하여, 관심 외래 서열들은 통상적으로 이용 가능한 제한 효소들 및 종래의 분자 생물학 기법들을 사용하여 임의의 이러한 기본 벡터들, 예컨대, 삽입 부위 BamHI J를 표적하는 pBNX221(도 4D 참조)로 삽입될 수 있다. 원하는 이식유전자들을 발현시키는 재조합 FPV 분리주를 제조하기 위하여, 그 후 CEF 세포들을 FPV으로 감염시키고 후속하여 원하는 이식유전자 또는 이식유전자들을 발현시키며 재조합 바이러스에 대한 양성 선별을 가능하게 하는 선별 카세트를 포함하는 하나 이상의 재조합 플라스미드로 형질감염시킨다. 상동 재조합 동안, 플라스미드 플랭킹 서열들은 FPV 바이러스 유전체에서 삽입 부위의 상동 서열들과 재조합한다. 이것은 표적 서열들을 FPV 유전체에서 출발 물질로 사용되는 기본 벡터에 의하여 표적되는 부위(예컨대, 삽입 부위 BamHI J)로 삽입시킨다. pBNX221은 삽입 부위 BamHI J(도 4D)를 표적하여 최종 재조합 플라스미드 pBN555(도 5E)의 작제를 위한 출발 플라스미드로서 사용되었다. 플라스미드 pBN555는 FPV-40K 프로모터의 제어하에 GP-ZEBOV-마잉가를 내포한다.

[0351] GP-ZEBOV-마잉가 이식유전자를 FPV에 삽입하기 위하여, CEF 세포들을 FPV로 감염시켰고 후속하여 재조합 플라스미드 pBN555(도 5E)로 형질감염시켰다. 선택적 조건들하에서(마이코페놀산/잔틴 및 하이포잔틴) 증폭 및 플라크 정제(13회 계대; 4회 플라크 정제 포함) 후, GP-ZEBOV-마잉가에 관한 유전자 및 선별 표지 GPT-RFP 융합 유전자(도 3D)를 내포하는, FPV-mBN368A(프리마스터)를 지정하는 재조합 MVA-BN 생성물이 수득되었다. 재조합 FPV-mBN368A 프리마스터 바이러스 스톱을 FPV의 제거(부모 바이러스; 데이터 도시되지 않음), 삽입 플랭킹 구역들과 함께 삽입된 유전자들의 올바른 서열(내부에 외래 유전자가 삽입되었던 FPV 유전체 플랭킹 서열에 특이적인 프라이머를 사용하는 유전자-특이적 PCR에 의함; 데이터 도시되지 않음), 미생물의 부재(멸균 테스트; 데이터 도시되지 않음), 및 인서트의 존재 및 올바른 크기(서열분석에 의함; 데이터 도시되지 않음)에 관하여 시험하였다. FPV-mBN368A 프리마스터 바이러스 스톱의 역가 또한 결정되었다. 마지막으로, 재조합 FPV-mBN368A에 의한 이식유전자의 발현을 역전사효소 PCR로 확인하였다(RT-PCR; 데이터 도시되지 않음).

[0352] 상기 기재된 방법에 따라 통합을 위한 BamHI J 구역 및 FP14(IGR 60/61)를 사용하여 또 다른 계두 구조체들이 생성되었다. FPV-mBN391은 FPV-40K 프로모터(서열번호:26)의 제어하에 GP-ZEBOV(서열번호:19 및 20)를, 두 FP14 부위 모두에서 PrS 프로모터(서열번호:23)하에 GP-MARV-무소케(서열번호:5 및 6)를 및 Pr13.5 길이 프로모터(서열번호:35)하에 GP-MARV-앙골라(서열번호:36 및 37)를, FPV-40K 프로모터하에 GP-SEBOV(서열번호:30 및 31)를, 그리고 PrLE1 프로모터(서열번호:27)하에 NP-EBOV-CdI(서열번호:28 및 29)를 발현시켰으며, 3가지

모두는 언급된 순서대로 BamHI J 구역에 삽입되었다.

[0353] **실시예 2: 비-인간 영장류동물에서 MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B)**

[0354] MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B)의 면역원성 및 보호 효능을 시노몰구스 마카크에서의 에볼라 및 마르부르크 시험감염 모델에서 분석하였다. 연구 동물들의 관리 및 급식에 관한 적절한 기관 지침들에 따라 원숭이들을 수용하고 급식하였다.

[0355] 실험 설계는 하기 표 1에 제시된다.

표 1: 시노몰구스 마카크에서 MVA-BN-Filo에 대한 백신접종 프로토콜.

		테스트/기준 물질 투여				시험감염 바이러스 투여	
그룹	그룹 크기	백신접종	투여당 용량	경로	일정 (일)	바이러스	일정 (일)
1	1	운반체 대조군 (TBS)	-	s.c.	0 및 28	EBOV	42
2	1	운반체 대조군 (TBS)	-	s.c.	0 및 28	MARV	42
3	3	MVA-BN®-Filo	5×10^8 TCID ₅₀	s.c.	0 및 28	EBOV	42
4	3	MVA-BN®-Filo	5×10^8 TCID ₅₀	s.c.	0 및 28	MARV	42

[0357]

[0358] EBOV 자이르 균주 또는 MARV 무소케 균주로 근육내 시험감염 (1,000 pfu); 생존 동물들을 63일에 안락사시켰다

[0359] 투여 부피는 운반체 대조군 및 백신접종 그룹들 모두에 대하여 0.5 mL이었으며; 모든 백신접종들은 피하 주사로 전달되었다. 제 1 백신접종일은 0일로 표기한다. 모든 동물들에게 1,000 pfu 시험감염 용량의 ZEBOV (그룹 1 및 3) 또는 MARV-무소케 (그룹 2 및 4)를 42일에 근육내 주사하였다. 모든 생존 동물들을 63일에 안락사시켰다.

[0360]

GP-특이적 항체들을 ELISA로 측정하였다. 예상했던 대로, MARV-무소케로 시험감염된 비-백신접종 대조군 동물에서는 시험감염 전 임의의 시기에서 GP-MARV-특이적 항체들을 전혀 검출할 수 없었으며 (즉, 0일, 28일, 및 36일 (데이터 도시되지 않음)) 병으로 쓰러졌다. 대조적으로, MVA-BN-Filo로 백신접종된 3마리 중 2마리 동물들 (동물 번호 30766 및 30768)은 제 1 백신접종 이후 28일에 낮은 GP-MARV 항체 역가를 가졌으며 (제 1 백신접종 후; 또한 도 6 참조) 백신접종된 3마리 동물들 모두 제 2 백신접종 이후 8일에 명확한 부스트 반응을 보였다 (부스터 백신접종 후; 도 6 참조). 3마리 동물들 모두 MARV-무소케를 이용한 다른 방식의 치사 근육내 시험감염시 생존하였다.

[0361]

유사하게, ZEBOV로 시험감염된 비-백신접종 대조군 동물은 모든 테스트 시점들에서 GP-ZEBOV-특이적 항체들에 음성이었다 (데이터 도시되지 않음). 대조군 동물, 뿐만 아니라 모든 백신접종 동물들은 근육내 주사에 의한 ZEBOV로 시험감염 후 감염되어 쓰러졌다. 놀랍게도, 3마리 백신접종 동물들 모두는 ZEBOV-GP로 백신접종한 비-인간 영장류동물에서 생성된 고면역 혈청에서 측정된 수준보다 더 큰 규모의 수준으로 시험감염에 앞서 GP-ZEBOV-특이적 항체들을 생성하였다. 사망시 10% 중성 완충 포르말린에 수집된 조직에 대한 철저한 부검이 실시되었다. 조직 절단은 관례적인 방법들에 의해 처리되었으며, 5 μm로 절단되었고, 조직학적 평가를 위해 해마톡실린과 에오신으로 염색되었다. 관찰결과를 하기 표 2에 요약한다.

[0362]

표 2: 백신접종 및 대조군 동물들의 조직학적 평가

동물 번호	30763	30766	30765	30768	30764	30770	30769	30767
부검 번호 시험감염 실험 그룹 생존	N11-05 마르부르크 대조군 9d €	N11-04 마르부르크 백신 21d	N11-06 마르부르크 백신 21d	N11-10 마르부르크 백신 21d	N11-07 에볼라 대조군 5d (E)	N11-08 에볼라 대조군 7d (SD)	N11-09 에볼라 대조군 6d (E)	N11-03 에볼라 대조군 6d (E)
간: 다발성 간 괴사 혈관염	++ +	- ++*	- -	- ++*	+	++ -	++ -	- -
폐: 폐 내부 부종 폐 중격 부종 출혈 간질성 폐렴	+- + + -	- - - -	- - - -	- - - -	+- + + -	+- + + -	+- + + -	- - - -
비장: 비장 종양 림프 고갈 적색 속질 섬유소 침착 비장 혈관염	- ++ +++ +++	++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	- ++ ++ ++	- +++ ++ +	- +++ ++ +	- ++ ++ ++
서해부 림프절: 대식세포 침투 림프 고갈	++ +++	- -	++ -	- -	+- +++	+- +++	+- ++	+++ -
액와 림프절: 대식세포 침투 림프 고갈	- + ++	- - -	- - -	- - -	- ++ ++	- ++ ++	- ++ +	- + +
장간막 림프절: 대식세포 침투 림프 고갈	- ++	- - <td>- -</td> <td>- -</td> <td>- ++ ++</td> <td>- ++ ++</td> <td>- ++ ++</td> <td>- - +</td>	- -	- -	- ++ ++	- ++ ++	- ++ ++	- - +
부신 괴사	- -	- -	- -	- -	+++ ++	++ -	- -	- -

[0363]

* 동물 30766 및 30768에서의 혈관염은 기존 병태인 것으로 보인다.

[0364]

E- 안락사시킴; SD- 자발적 사망

[0365]

MARV-무소케-시험감염, 비-백신접종 대조군 동물들, 뿐만 아니라 모든 ZEBOV-시험감염 동물들에서 전형적인 출혈
열 증상들이 분석으로 확인되었고, 반면 MARV-무소케로 시험감염된 백신접종 동물들은 시험감염-후 면역 반응
및 B-세포 과다형성과 일관되는 비장 과다형성을 제외하고 조직학적 변화를 거의 보이지 않았다.

[0366]

실험 결과들은 도 7에 요약되어 있다. 도 7A는 MVA-BN-Filo를 이용한 백신접종이 MARV-무소케로의 시험감염으로부터 동물들을 100% 보호하였음을 보여준다. 도 7B는 시험감염-후 임상 점수를 보여주는데; MARV-무소케로 시
험감염된 백신접종 동물들은 출혈열과 관련된 조직학적 변화 또는 증상들을 전혀 보이지 않았으며 간, 비장, 부
신, 림프절, 또는 폐에 바이러스가 전혀 번식하지 않았다.

[0367]

실시예 3: 비-인간 영장류동물에서 MVA-BN-Filo

[0368]

이 실험은 또 다른 마르부르크 바이러스 균주, 즉, 실시예 2의 마르부르크 무소케 대신 마르부르크 앙골라로 시
험감염시킨 것을 제외하고 실시예 2에 기재된 것과 유사한 연구 프로토콜하에 MVA-BN-Filo 비-인간 영장류동물을
테스트하였다.

[0370]

표 3: 비-인간 영장류동물에서 MVA-BN-Filo에 관한 연구 설계 및 결과.

그룹	N	테스트/대조군 제품 투여			시험감염	생존
		백신접종	용량	일정		
1	2	MVA-BN® Filo	5×10^8 TCID ₅₀	0, 28 마르부르크 양골라 56 일	2/2 2/3 3/3 2/3 0/1	2/2
2	3	MVA-BN® MARV-IL15sushi	1×10^8 TCID ₅₀			2/3
3	3	MVA-BN® MARV-CD40L	1×10^8 TCID ₅₀			3/3
4	3	MVA-BN® MARV-TRICOM	1×10^8 TCID ₅₀			2/3
5	1	TBS	n/a			0/1

[0371]

MARV 양골라 균주로 근육내 시험감염 (1,000 pfu) ; 생존 동물들을 70일에 안락사시켰다.

[0372]

표 3은 MVA-BN-Filo가 마르부르크 바이러스의 양골라 균주에 대하여 비-인간 영장류동물을 철저히 보호함을 보여준다. 대조적으로, 그룹 5의 비-백신접종 동물을 감염으로 쓰러졌다. 표 3은 또한 보호 효능이 용량 의존성임을 보여주는데, 왜냐하면 마르부르크 바이러스의 GP를 또한 인코딩하는 MVA-BN-MARV를 이용한 5-배 낮은 용량은, CD40L을 공동-자극 분자로서 공동-발현시키지 않는 한 단지 부분적으로 보호성이기 때문이다. 표 4에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 모든 백신 후보들은 MVA 벡터에 특이적인 항체들 (백시니아 특이적 항체들), 뿐만 아니라 MARV GP 인서트에 특이적인 항체들을 생성한다.

[0373]

표 4: 비-인간 영장류동물에서 MVA-BN-Filo에 의해 유도된 항체들.

35일	MVA-다가	MVA-MARV IL-15	MVA-MARV CD40L	MVA-MARV TRICOM
Vaccinia-Elisa	21596	17838	6560	3246
Vaccinia-PRNT	1735	507	94	85
MARV/GP-ELISA	298959	285187	199132	409941

[0374]

실시예 4: 이종 프라임/부스트

[0375]

이 실험은 프라임/부스트 면역화에 있어 재조합 MVA와 재조합 계두 FPV의 조합을 테스트하였다.

[0376]

H-2K^k B6CBA F1 마우스 (Janvier Labs, 프랑스)를 5×10^7 TCID₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN254A, 도 3C) 또는 FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPVmBN368A, 도 3D)로 피하 (s.c.) 면역화시켰다. 상기 바이러스 용량을 100 μl/플랭크의 총 부피로 두 플랭크 모두에 주사하였다.

[0377]

ZEBOV-GP-특이적 IgG의 검출을 위해, 96-웰의 플레이트 (Corning, MA, USA)를 4°C에서 하룻밤동안 ZEBOV GP 항원 (IBT Bioservices, MD, USA)으로 코팅하였다. 2배 혈청 회석한 복제물을 세척 및 블로킹한 플레이트에 부가하였으며 양 항-마우스 IgG-HRP (AbD Serotec, UK)를 검출 항체로서 사용하였다. TMB 기질을 RT에서 30분간 부가하였으며 1M H₂SO₄를 부가하여 반응을 중단시켰다. 흡광도를 450nm에서 측정하였다. 쥐과 모노클로날 항체 13F6을 ZEBOV-GP IgG의 혈청 농도를 계산하기 위한 표준으로서 사용하였다.

[0378]

마우스 립프구를 부드럽게 분쇄하고 70 μm 세포 스크린 (BD Bioscience, CA, USA)를 통해 조직을 통과시켜 비장으로부터 새로이 분리하였다. 분리 후, 세포들을 5 μg/ml ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ 펩티드 (TELRTFSI) (GenScript,

NJ, USA)로 $10 \mu\text{g/ml}$ 브레펠딘 A 및 CD107a-FITC의 존재하에 철저한 RPMI에서 37°C 에서 6시간 동안 배양하였다. 생/사 식별을 위해, 세포들을 Zombie AquaTM Fixable Viability 키트 (BioLegend, CA, USA)를 이용하여 염색하였다. 제조업자의 지시사항(BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences)에 따라 IFN-γ 및 TNF-α의 세포내 염색은 CD4-BV605, CD8 α-BV421 (BioLegend, CA, USA) 및 CD44-APC-eFluor780 (eBioscience, CA, USA)을 이용한 표면 염색 및 고정/투과 후 실시되었다. 모든 세포들을 디지털 유세포 분석기 (LSR II, BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 획득하였으며 데이터는 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, OR, USA)로 분석하였다.

[0381] 제조합 MVA와 FPV 프라임/부스트 면역화의 4가지 가능한 조합물을 H-2K^{k+} CBAB6 F1 마우스에서 테스트하였는데, 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV) 당단백질 (GP)로부터의 강력한 CD8 T 세포 에피토프는 이러한 MHC 클래스 I 하플로타입, 즉, GP₅₇₇₋₅₈₄ (TELRTFSI)에 관하여 기재되어 있었기 때문이다 (Rao 외., *Vaccine* 17(23-24):2991-8 (1999)). 0일 및 21일에 s.c. 면역화 한 후 21일 및 41일에 ZEBOV-GP-특이적 IgG의 혈청 농도를 분석하였다. 21일에 모든 MVA-면역화 마우스가 강건한 IgG 역가를 가졌던 반면, FPV-면역화 마우스 중 단 20% 만이 혈청전환되었다. 제 2 면역화 후, 모든 동물들은 ZEBOV-GP-특이적 IgG에 대하여 혈청반응양성이었다. 가장 낮은 역가들은 FPV로 상동 면역화 후 관찰되었다. MVA로 2회 면역화된 동물들과 FPV로 프라이밍되고 MVA로 부스트된 동물들 간 GP-특이적 IgG의 농도 차이는 41일에 전혀 검출될 수 없었다. 그러나 MVA로 프라이밍되고 FPV로 부스트된 마우스는 41일에 모든 그 외 그룹들 보다 약간 더 높은 역가를 가졌다 (도 8A).

[0382] 흥미롭게도, 가장 강한 항체 반응을 가져왔던 것과 동일한 조합은 또한 가장 강한 CD8 T 세포 반응을 유도하였다. 또한, FPV를 이용한 상동 면역화는 가장 약한 CTL 반응을 생성하고, MVA-MVA 및 FPV-MVA 면역화를 수반하였다. MVA로 프라이밍 후 FPV로 부스트하는 것은 $2 \times$ MVA의 상동성 조합보다 ~5-배 더 많은 세포독성 CD8 T 세포들을 유도하였다 (도 8B).

[0383] 종합하면, 매우 기능적인 CD8 T 세포들의 존재에 의해 나타내어지는 바와 같이, 이들 데이터는 MVA 1차 및 FPV 2차를 이용한 이종 면역화가 가장 강한 ZEBOV-GP-특이적 항체 반응, 그리고 또한 가장 강한 CTL 반응을 유도함을 의미한다.

실시예 5: 증강된 ZEBOV-GP 특이적 CD8 T 세포 반응

[0385] H-2K^{k+} CBA 마우스는 0일 및 21일에 5×10^7 TCID₅₀ MVA 또는 FPV로 s.c. 면역화되었다. 마우스 (각 그룹 당 5 마리)를 비장세포의 세포내 시토카인 염색에 의한 T 세포 분석을 위해 42일에 사망시켰다. 하기 프라임/부스트 요법이 사용되었다: 1: MVA-ZEBOV-GP (mBN254)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 2: MVA-multi-filo (MVA-mBN226)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 3: MVA- ZEBOV-GP-VP40 (mBN255)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368). 데이터는 도 9에 요약되어 있다.

[0386] 42일에 $10 \mu\text{g/ml}$ 브레펠딘 A 및 항-CD107a-FITC의 존재하에서 $5 \mu\text{g/ml}$ ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ 펩티드 (TELRTFSI)로시험관내 재-자극하고 표준 6시간 후 비장 CD8 T 세포 반응들을 분석하였다. 세포들을 항-CD4-BV605, 항-CD8-BV421, CD44-APC-eFluor780으로 표면 염색 및 항-IFN-γ-PECy7 및 항-TNF-α-PerCP-eFluor710으로 세포내 염색하였다. 제조업자의 지시사항 (Life Technologies)에 따라 LIVE/DEAD® 픽서블 아쿠아 데드 셀 스테인 키트 (Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit)로 생/사 식별을 실시하였다. 막대 그래프는 CD107a+, IFN-γ+ 및 TNF-α+ CD8 T 세포들의 총 수를 보여준다. 5마리 마우스/그룹에 대한 평균±SEM 형태를 나타낸다. ZEBOV-GP-유래 펩티드 TELFRTSI에 대한 CD8 T 세포 반응은 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40이 MVA-FPV 이종 프라임-부스트 요법에서 프라이밍 구조체로 사용되었을 때 MVA-ZEBOV-GP (mBN254) 또는 MVA-multi-filo (MVA-mBN226)가 프라이밍 구조체들로 사용될 때에 비해 대략 2-배 증강되었다 (도 9).

실시예 6: MVA-GP-VP40로 백신접종 후 ZEBOV에 대한 NHP의 증강된 보호

[0388] 시노몰구스 마카크 (*Macaca fascicularis*)에 MVA-BN-ZEBOV/GP (n=3), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (n=3)을 5×10^8 TCID₅₀ 용량으로 2회 (0일 및 28일) 피하 백신접종하거나, 음성 대조군으로서 Tris-완충 식염수 (TBS) (위약 그룹, n=2)를 주었다. 면역화 이전 및 시험감염 전 매주마다 (7, 14, 21, 28, 35 및 40일) 에볼라 바이러스 자이르 당단백질 (GP)-특이적 및 MVA-콜격-특이적 ELISA에 의한 분석을 위해 혈청을 수집하였다. 부스터 백신접종 이후 4주 후, 동물들을 대략 1000 pfu의 근육내 투여에 의해 에볼라 바이러스 자이르 (키크위트 균주)로 시험감염시켰다.

[0389]

표 5: 연구 설계:

그룹	백신접종			시험감염		생존
	백신	용량	일정 (경로)	바이러스	일정	
1	MVA-BN-ZEBOV/GP	5×10^8 TCID ₅₀	0 + 28일 (s.c.)	ZEBOV 키크위트 대략. 1000 pfu i.m.		0/3
2	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 TCID ₅₀	0 + 28일 (s.c.)		마지막 백신 접종 후 4주	2/3
3	TBS 대조군	n/a	0 + 28일 (s.c.)			0/2

[0390]

자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)-특이적 ELISA

[0392]

재조합 ZEBOV/GP에 의해 고정화되고 NHP IgG에 대한 호스 래디쉬 페옥시다제 (HRP)-공액 항체에 의해 검출되는 ZEBOV/GP-특이적 항체들을 결정하는 ELISA를 실시하였다. 기질 반응 후 결합된 HRP-표지 항체의 양을 450 nm에서의 광학 밀도 (OD) 값으로 판독하였다. 4번수 회귀 분석에 따라 그리고 모노클로날 마우스 항체를 사용한 표준 곡선에 기초하여 항체 농도를 계산하였다.

[0393]

ELISA 결과는 도 10에 도시되어 있다. MVA-BN-ZEBOV/GP 또는 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 구조체로 백신접종한 모든 동물들은 프라임 백신접종 후 이미 검출가능한 골격- 및 ZEBOV-특이적 항체들을 가졌으며 항체 반응들은 제 2 백신접종에 의해 부스트되었다.

[0394]

두번째 연구에서 시노몰구스 마카크 (*Macaca fascicularis*)에 MVA-BN-multi-filo (MVA-mBN226, n=2), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255, n=2)을 5×10^8 TCID₅₀, 용량으로 3회 (0, 28 및 56일) 피하 백신접종하거나, 음성 대조군으로서 Tris-완충 식염수 (TBS) (위약 그룹, n=2)를 주었다. 면역화 이전 및 시험감염 전 매주마다 (0, 27, 41 55, 35 및 67) 에볼라 바이러스 자이르 당단백질 (GP)-특이적 중성화 검정을 위해 혈청을 수집하였다 (도 11). 마지막 백신접종 이후 4주 후, 동물들을 대략 100 pfu의 근육내 투여에 의해 에볼라 바이러스 자이르 (키크위트 균주)로 시험감염시켰다.

[0395]

표 6: 연구 설계:

그룹	백신접종				시험감염 일정	생존
	백신	용량	일정	바이러스		
1	음성 대조군	n/a	0 + 56 일			0/2
2	MVA-BN-multi-filo	5×10^8 TCID ₅₀	0 + 28 + 56 일	ZEBOV 키크위트 대략. 100 pfu IM	4 주 마지막 백신접종 후	0/2
3	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 TCID ₅₀	0 + 28 + 56 일			2/2

[0396]

MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40으로의 백신접종은 프라임 백신접종 후 이미 검출가능한 중성화 항체들을 생성하였으나, MVA-BN-multi-filo는 27일에 프라임 백신접종 후 검출가능한 중성화 항체들을 유도하지 못했다 (도 11). MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40으로 백신접종된 동물들은 모든 분석 시점들 전반에 걸쳐 MVA-BN-multi-filo 백신접종 동물들 보다 더 높은 중성화 항체 역가를 가졌다. ZEBOV 시험감염 후 MVA-BN-multi-filo는 시험감염 후 7일에 쓰러졌던 반면 MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 백신접종 동물들은 증상들 또는 일과성 열 발생이 전혀 없이 생존하였다.

[0398]

실시예 7: VLP 형성 및 GP 및 VP40의 단백질 발현

[0399] HeLa 세포들을 10 MOI의 지시된 바이러스로 감염시켰다. 감염 2일 후, 상청액을 수집한 다음 맑아진 상청액 (SNs)에서의 VLP를 초원심분리에 의한 20% 수크로스 쿠션(UC-SN)를 통해 페럿화시켰다. 세포 용해물은 1x Laemmli 완충액에 세포들을 직접 용해시켜 준비되었다. 세포 용해물은 면역탁본 분석을 위한 SDS-PAGE 분리에 앞서 1:5로 회석되었다. UC-SN은 SDS-PAGE에 앞서 회석되지 않았다. ZEBOV-GP는 USAMRIID사의 모노클로날 마우스 항체 (클론 6D8)를 사용하여 검출되었으며, ZEBOV-VP40은 IBT Bioservices사의 정제된 토키 폴리클로날 항체를 사용하여 검출되었다.

[0400] GP 및 VP40의 발현은 면역탁본법에 의한 새로운 제조물(preparations)에서 확인되었다. 두 단백질 모두 세포 용해물에 존재하였으며 또한 UC-SN에 농후하였다 (도 12C). 매트릭스 단백질 VP40의 발현은 VLP를 형성하기에 충분한 것으로 공지되어 있으며 VP40 및 GP 단백질의 직접적인 상호작용은 전혀 보고된 바 없다. GP가 VP40와 함께 실제로 VLP에 혼입되어 있음을 보여주기 위하여, GP를 감염된 세포들의 SN으로부터 면역침강시켰다. 이를 위하여, HeLa 세포들을 MVA-ZEBOV/GP-VP40으로, 그리고 대조군 세포들을 MVA-ZEBOV/GP 및 BAC-유래 MVA wt으로 감염시켰다. BAC-유래 MVA wt는 Meisinger-Henschel 외의 문헌에 이미 기재된 바 있다 (Meisinger-Henschel 외. (2010), *J Virol.* 84(19):9907-9919). 감염된 세포들로부터의 SN을 항-GP-특이적 항체를 이용하여 면역침강 (IP) 시켰다. SN 분취량을 면역침강에 앞서 1% Triton X-100 (TX-100)로 30분간 처리하였으며, 이러한 처리는 쥐과 백혈병 바이러스의 성숙 외피 VLP 다수를 교란시키는 것으로 이미 밝혀져있다 (Davidoff 외. (2012), *Virology* 433(2):401-409).

[0401] 그 후 IP-복합체들을 GP 및 공-침강된 VP40의 존재에 관하여 면역탁본법으로 분석하였다. 면역침강 (IP)에 있어, 맑아진 SNs는 단백질 G-아가로스 (10 μl)와 함께 항-ZEBOV-GP (클론 6D8, USAMRIID) 항체로 4°C에서 하룻밤동안 배양되었다. 그 후 면역침강물의 면역탁본을 ZEBOV-GP (모노클로날 항체 6D8) 및 ZEBOV-VP40 (IBT사)에 대한 항체들로 배양시켰다. GP 단백질은 오직 GP만을 발현시키는 세포들의 SN으로부터 충분히 면역침강되었으며 (도 12D, 상부 패널) 이는 VP40의 존재와 무관하였다. 중요하게는, VP40이 TX-100의 부재에서만 MVA-ZEBOV/GP-VP40 감염된 세포들의 상청액으로부터 GP와 함께 공-침강되었으며 (도 12D, 하부 패널, 레인 2), 이는 GP가 VLP 내부에 실제 혼입되어 있었음을 의미하는 것이다. TX-100이 VLP를 교란시킨 것으로 추정되고 직접적인 GP-VP40 상호작용이 전혀 없었기 때문에, 어떠한 VP40도 TX-100 처리된 샘플들에서 공-침강될 수 없었다 (도 12D, 하부 패널, 레인 4). 그러므로, 실제로 GP가 존재하는 VLP가 재조합 MVA로 감염시 생성되었음이 밝혀졌다.

0402] 실시예 8: 293T/17에서 VLP 형성

[0403] 세포 감염 후 더 높은 VLP 농도를 얻을 수 있게 하기 위한, 새로운 VLP의 제조용 293T/17 세포들. 제조물의 단백질 함량을 GP 및 VP40에 관하여 웨스턴 블로트법으로 분석하였다.

[0404] T175 배양 접시의 293T/17 세포들을 10 MOI의 지시된 바이러스로 감염시켰다. 상청액들을 감염 후 24h에 수집하였으며 3x 부하 완충액/loading buffer)과 직접 혼합하거나 (미정제 SN) 또는 20% 수크로스 쿠션을 통해 원심분리하였다 (UZ-prep). 세포 용해물 (CL)은 1x 주입 완충액에서 준비되었다. 단백질을 SDS-PAGE 변성에 의한 크기에 따라 분리하였다. 면역탁본들을 항-GP 항체 (클론 6D8, 1:2500, USAMRIID사) 또는 항-VP40 항체 (폴리클로날, 1:1000, IBT사)와 함께 배양시켰으며 화학발광 기질을 사용하여 성장시켰다.

[0405] EBOV 당단백질 (GP)의 발현은 MVA-ZEBOV/GP 및 MVA-filo-VLP 감염 후의 VP40인 MVA-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-filo-VLP)로 세포 감염 후 감염된 세포들의 세포 용해물 (CL) 및 상청액 (SN) 모두에서 용이하게 검출가능하였다. 놀랍게도, MVA-ZEBOV/GP-감염된 세포들은 MVA-filo-VLP로 감염된 세포들에 비해 더 많은 GP를 발현시키는 것으로 보이는 반면, MVA-filo-VLP로 감염된 세포들은 더 많은 GP가 SN에서 발견되었다. 이는 가능하게는 MVA-filo-VLP로 감염된 세포들은, GP 및 VP40의 공동-발현이 감염된 세포들로부터 GP 방출 (VLP의 형태로)을 증강시킨다는 사실을 반영한다. GP 및 VP40 단백질들 모두 UZ-prep에 존재하였으며, 이는 GP 및 VP40이 UZ에 의해 수집되었음을 의미한다. 일부 GP 및 또한 VP40은 미정제 SN에서에 비해 더 적긴 하였으나, 여전히 UZ 이후의 SN에 존재하였으며, VP40는 특히 더 적게 존재하였다. 그러므로 VP40 - GP와 함께 주로 VLP의 형태로 존재 -은 SN에서 대부분 소모되는 반면, GP 풀(pool) 부분들은 (가능하게는 다형 입자들의 형태로) UZ 이후 SN에서 유지된다 .

[0406] 293T/17 세포들로부터의 VLP에 관한 투과 전자 현미경 (TEM) 및 면역-전자 현미경 분석은 각각의 MVA 재조합에 의해 생성된 MVA-filo-VLP에 GP가 치밀하게 부여되어 있으며, GP 돌기가 filo-VLP의 전체 표면을 라이닝하고 있음을 보여주었다. 또한, MVA-wt 또는 MVA-ZEBOV/GP로 감염된 세포들로부터 얻은 제조물들은 면역-EM으로 분석하였으며; 이를 샘플들에서는 VLP가 전혀 검출되지 않았다.

0407] 실시예 9: NHP에서 이종 프라임-부스트 면역화의 면역원성

[0408] 4마리의 시노몰구스 마카크를 0일 및 28일에 백신접종(s.c.)하였다. 2마리 동물들에게는 0일에 프라임으로 5×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN226를 그리고 28일에 부스트로 1×10^9 TCID₅₀ FPV-mBN368을 제공하였다. 1마리 동물에게는 0일에 프라임으로 1×10^9 TCID₅₀ FPV-mBN368을 그리고 부스트로 5×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN226을 제공하였다. 1마리 대조군 동물에게는 TBS만을 제공하였다. 0, 7, 28, 35 및 49일에 PBMC를 분리하였다. 바이러스 부하 분석을 위한, 그리고 T 세포 및 항체 반응들 각각의 분석을 위한 혈청 또는 PBMC의 분리, 응고 매개변수, 임상 화학, 혈액학을 위해 0, 28 및 49일에 혈액을 수집하였다. 혈청 샘플들을 에볼라 특이적 체액성 반응들에 관하여 ELISA 및 FRNT로 분석하였다. GP- 및 Vaccinia- 특이적 T 세포들을 Vaccinia Wyeth를 보유한 ZEBOV/GP 웨티드 라이브러리로 PBMC를 시험관내 재-자극하여 분석하고, IFN-γ 분비 세포들을 ELISPOT으로 검출하였다. 모든 동물들에게 56일에 EBOV 키크위트-9510621을 근육내 (i.m.) 시험감염 (100 pfu) 시켰다. MVA 및 FPV의 이종 프라임 부스트가 제공된 3마리 동물들 모두 생존하였다. 프라임 이후 이미 완전한 혈청전환이 수득되었으며 부스트에 의해 추가로 개선되었다.

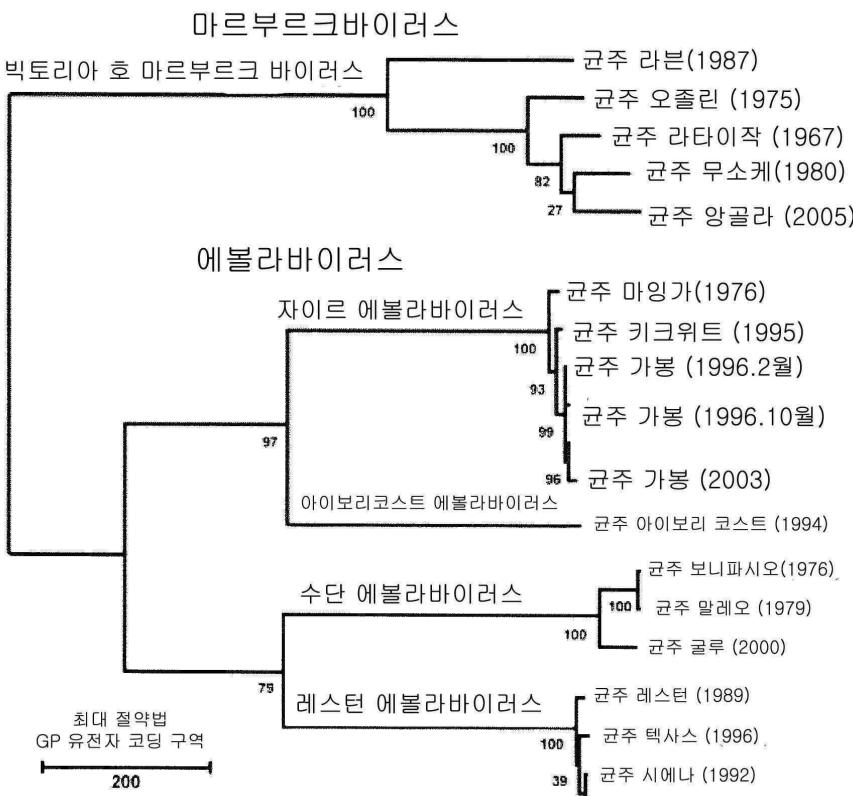
[0409] 서열 리스트의 설명

- [0410] 서열번호:1 [GP-SEBOV-말레오를 인코딩하는 DNA 서열(Genbank 등록번호. U23069.1)]
- [0411] 서열번호:2 [GP-SEBOV-말레오를 인코딩하는 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. U23069.1)]
- [0412] 서열번호:3 [NP-SEBOV-보니파시오를 인코딩하는 DNA 서열 (GenBank 등록번호. AF173836 .1)]
- [0413] 서열번호:4 [NP-SEBOV-보니파시오를 인코딩하는 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. AF173836)]
- [0414] 서열번호:5 [GP-MARV-무소케를 인코딩하는 코돈-최적화된 DNA 서열(단백질 서열에 대해 GenBank 등록번호. ABA87127.1)]
- [0415] 서열번호:6 [GP-MARV-무소케의 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. ABA87127.1)]
- [0416] 서열번호:7 [TTC를 인코딩하는 DNA 서열]
- [0417] 서열번호:8 [TTC의 아미노산 서열]
- [0418] 서열번호:9 [hCD40L을 인코딩하는 DNA 서열]
- [0419] 서열번호:10 [hCD40L의 아미노산 서열]
- [0420] 서열번호:11 [hIL15R-Sushi를 인코딩하는 DNA 서열]
- [0421] 서열번호:12 [hIL15R-Sushi의 아미노산 서열]
- [0422] 서열번호:13 [인간 LFA-3/CD58을 인코딩하는 DNA 서열 (EMBL-CDS 등록 번호. CAA75083.1)]
- [0423] 서열번호:14 [인간 LFA-3/CD58의 아미노산 서열 (UniProtKB/SwissProt 등록번호. P19256)]
- [0424] 서열번호:15 [인간 ICAM-1/CD54의 DNA 서열 (GenBank 등록번호. BT006854)]
- [0425] 서열번호:16 [인간 ICAM-1/CD54의 아미노산 서열 (UniProtKB/SwissProt 등록번호. P05362)]
- [0426] 서열번호:17 [인간 B7.1/CD80을 인코딩하는 DNA 서열 (EMBL-CDS 등록번호. AAA58390.1)]
- [0427] 서열번호:18 [인간 B7.1/CD80의 아미노산 서열 (UniProtKB/SwissProt 등록번호. P33681)]
- [0428] 서열번호:19 [GP-ZEBOV-마잉가를 인코딩하는 코돈-최적화된 DNA (GenBank 등록번호. ABX75367.1)]
- [0429] 서열번호:20 [GP-ZEBOV-마잉가의 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. ABX75367.1)]
- [0430] 서열번호:21 [VV B5R 엔커를 인코딩하는 DNA 서열]
- [0431] 서열번호:22 [VV B5R 엔커의 아미노산 서열]
- [0432] 서열번호:23 [PrS 프로모터의 DNA 서열]
- [0433] 서열번호:24 [PrS5E 프로모터: 1x (PrS) + 5x (Pr7.5e)의 DNA 서열]
- [0434] 서열번호:25 [Pr7.5 프로모터의 DNA 서열]

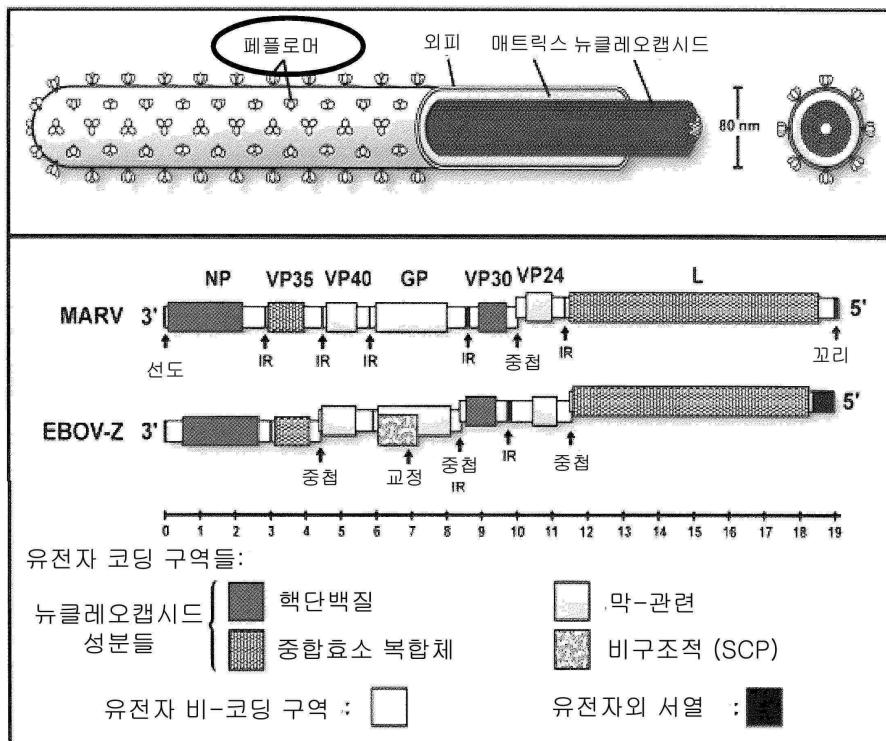
- [0435] 서열번호:26 [FPV의 FPV-40K 프로모터의 DNA 서열]
- [0436] 서열번호:27 [PrLE1 프로모터 - 1x (ATI) + 5x (Pr7.5e)의 DNA 서열]
- [0437] 서열번호:28 [NP-EBOV-CdI를 인코딩하는 코돈-최적화된 DNA 서열 (GenBank 등록번호. ACI28629.1)]
- [0438] 서열번호:29 [NP-EBOV-CdI의 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. ACI28629.1)]
- [0439] 서열번호:30 [GP-SEBOV-굴루를 인코딩하는 코돈 최적화된 DNA 서열 (GenBank 등록번호. AAU43887.1)]
- [0440] 서열번호:31 [GP-SEBOV-굴루의 아미노산 서열 (GenBank 등록번호. AAU43887.1)]
- [0441] 서열번호:32 [PrLE1 프로모터 - 1x (ATI) + 4x (Pr7.5e)의 DNA 서열]
- [0442] 서열번호:33 [VP40-ZEBOV-마잉가 서열을 인코딩하는 코돈 최적화된 DNA 서열]
- [0443] 서열번호:34 [VP40-ZEBOV-마잉가 서열의 아미노산 서열]
- [0444] 서열번호:35 [Pr13.5 프로모터 서열]
- [0445] 서열번호:36 [GP-MARV-양골라를 인코딩하는 코돈 최적화된 DNA 서열]
- [0446] 서열번호:37 [GP-MARV-양골라의 아미노산 서열]

도면

도면1

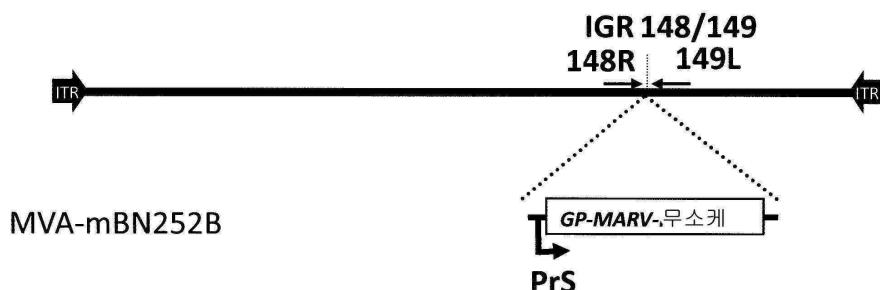


도면2

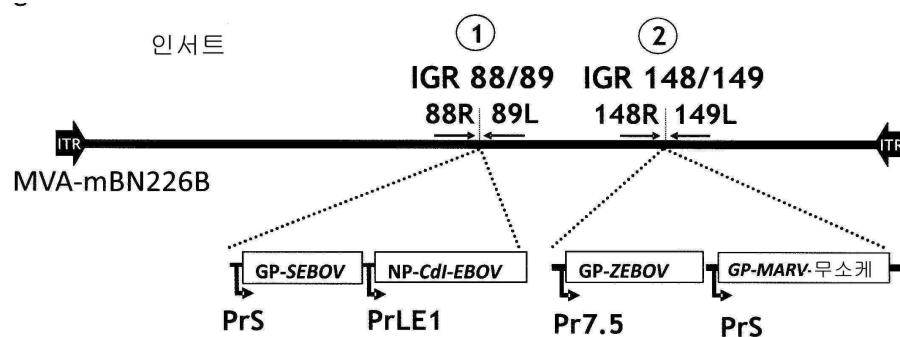


Fields ed.: Virology

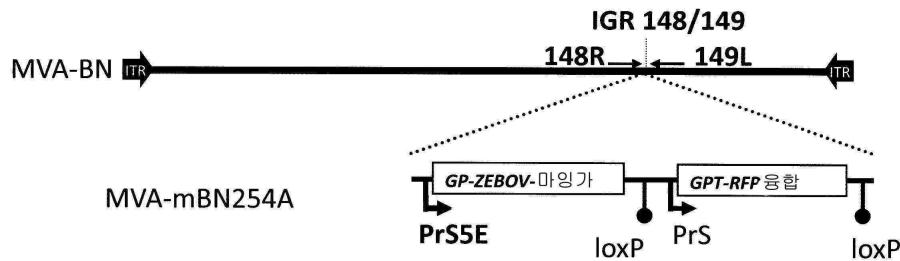
도면3a



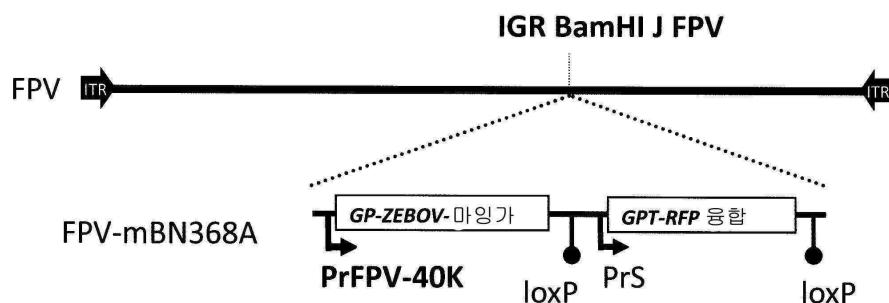
도면3b



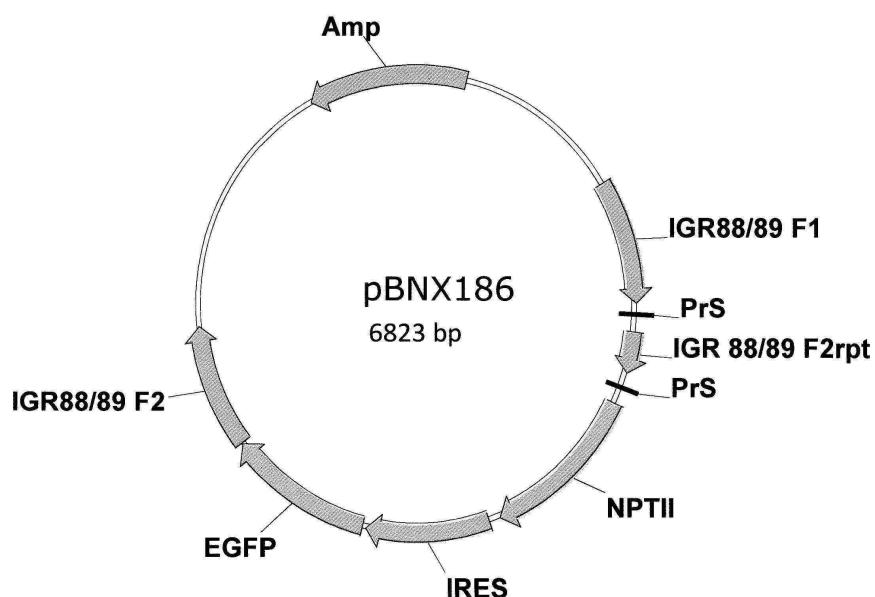
도면3c



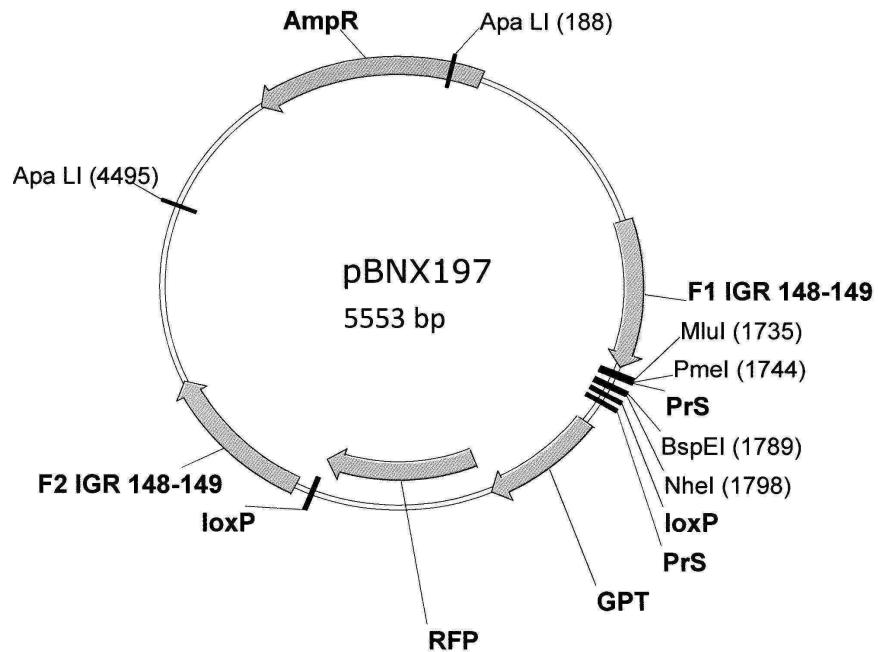
도면3d



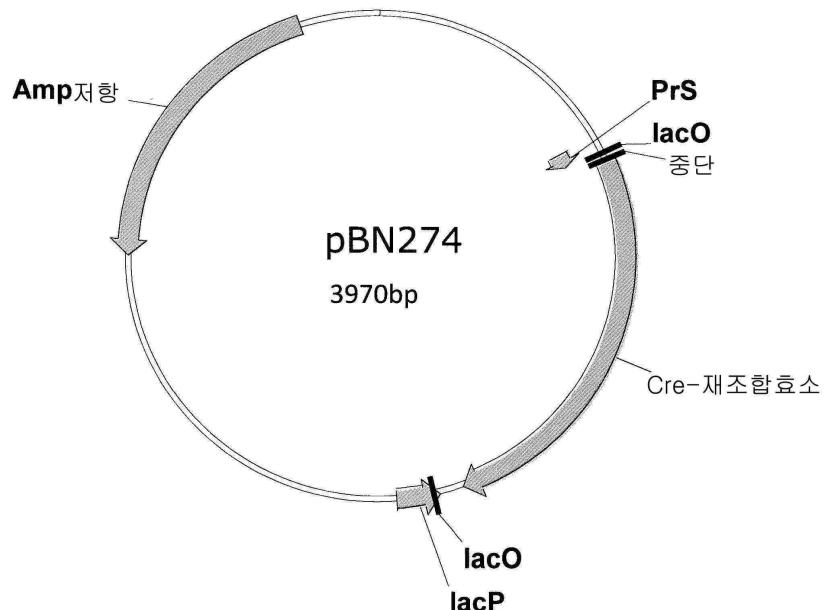
도면4a



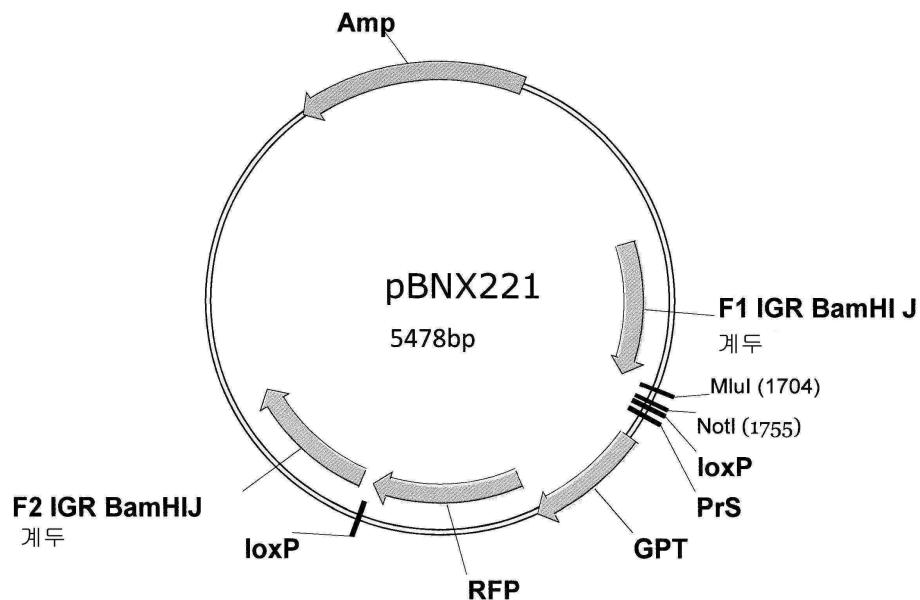
도면4b



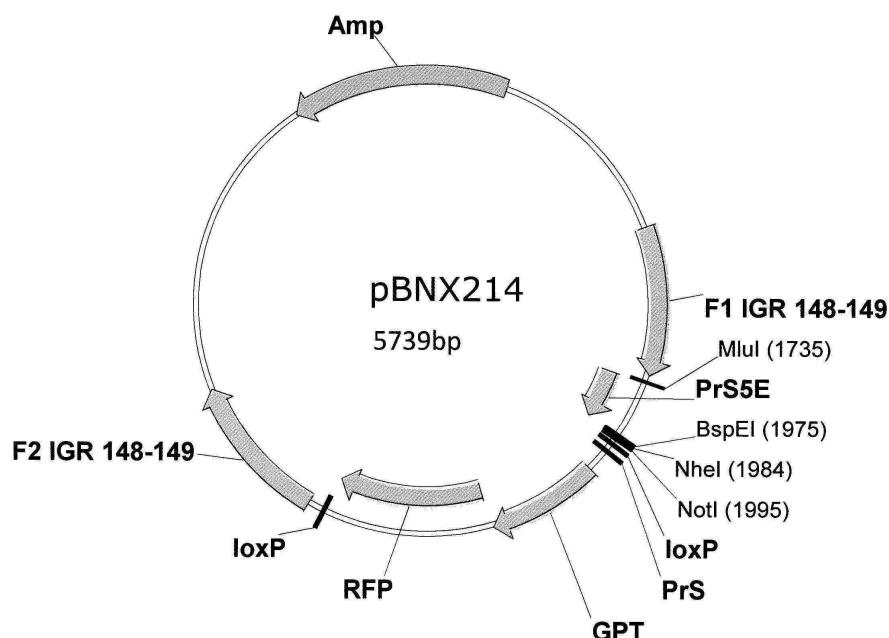
도면4c



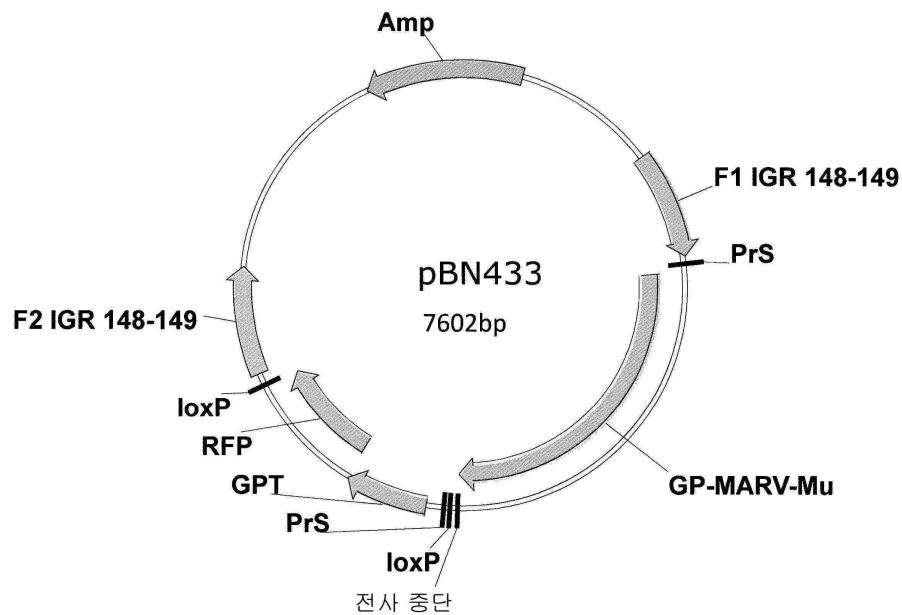
도면4d



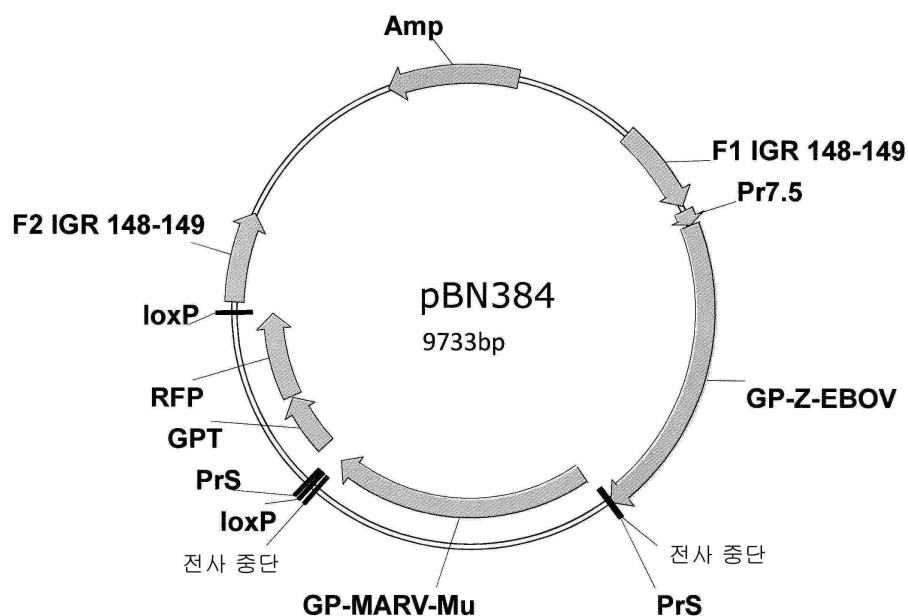
도면4e



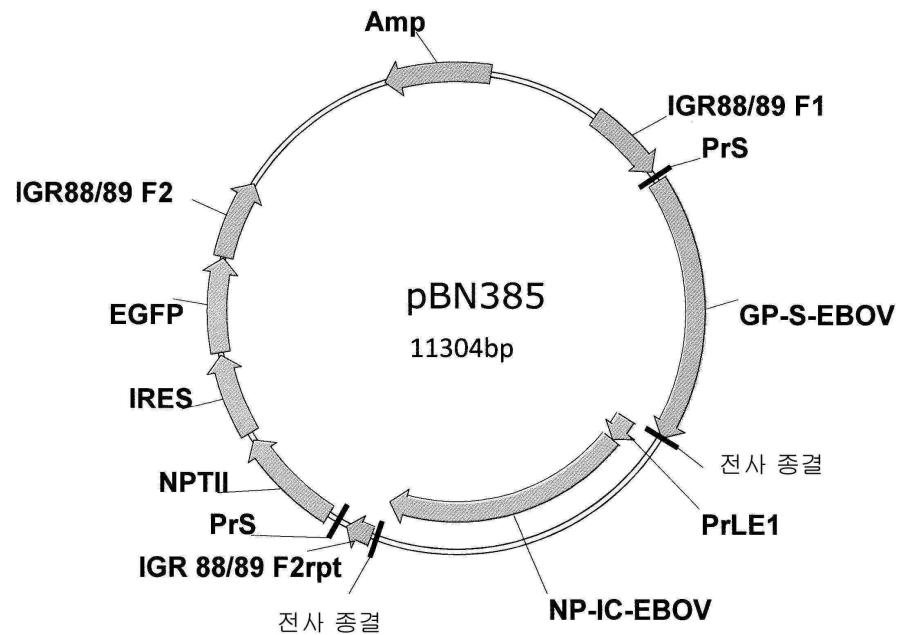
도면5a



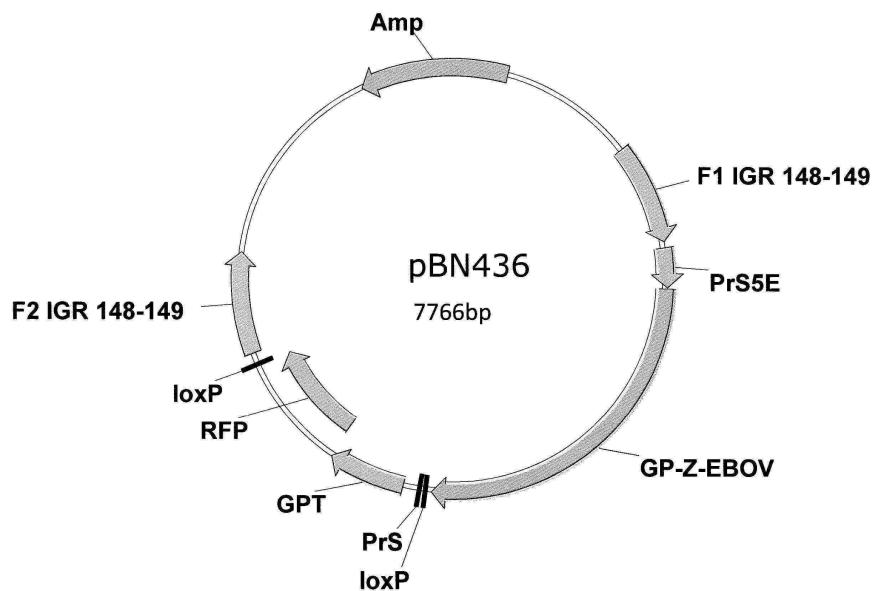
도면5b



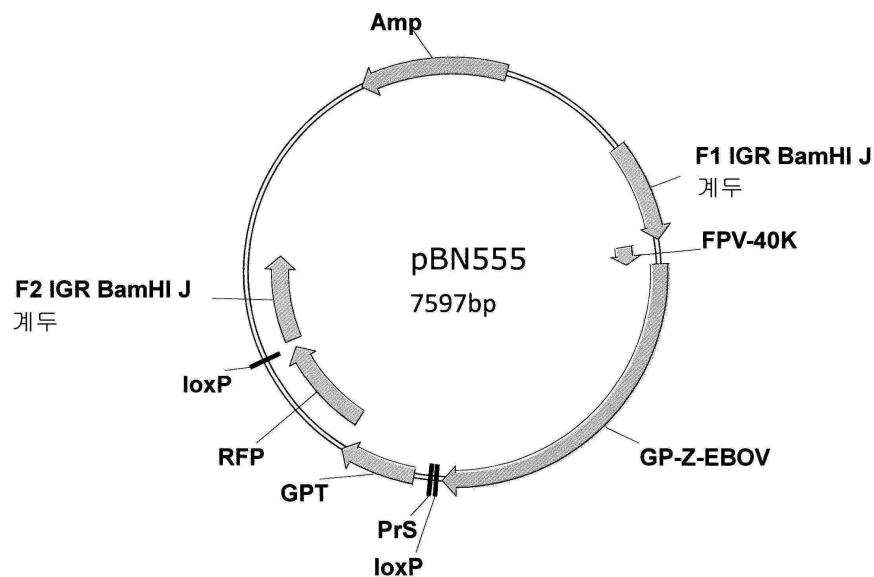
도면5c



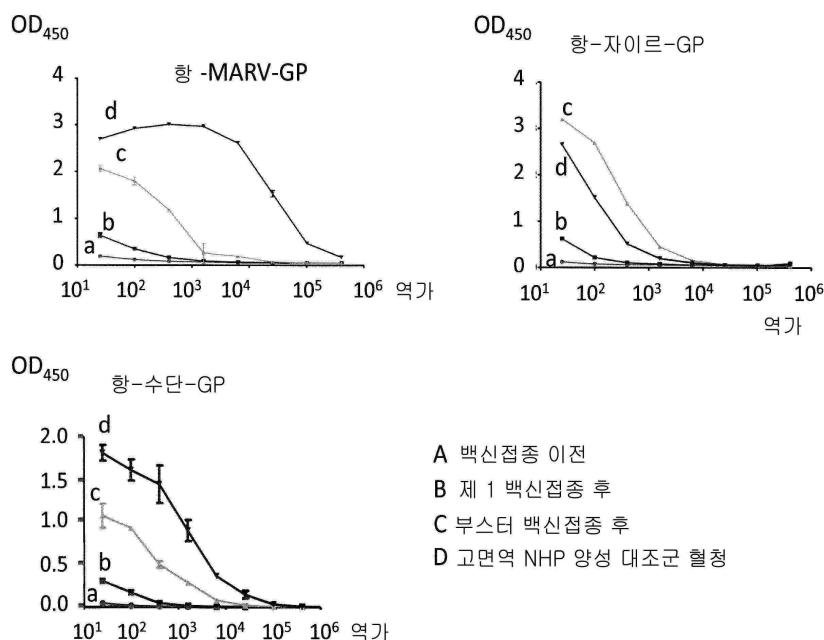
도면5d



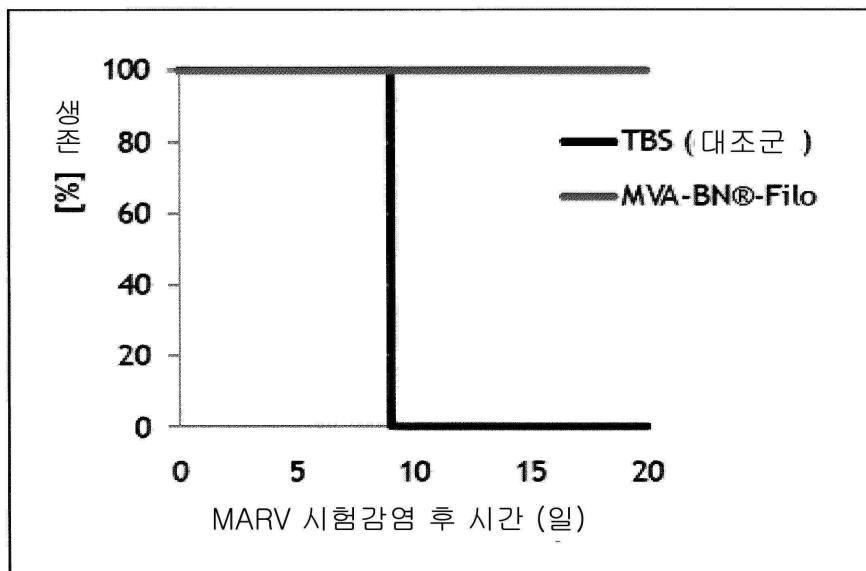
도면5e



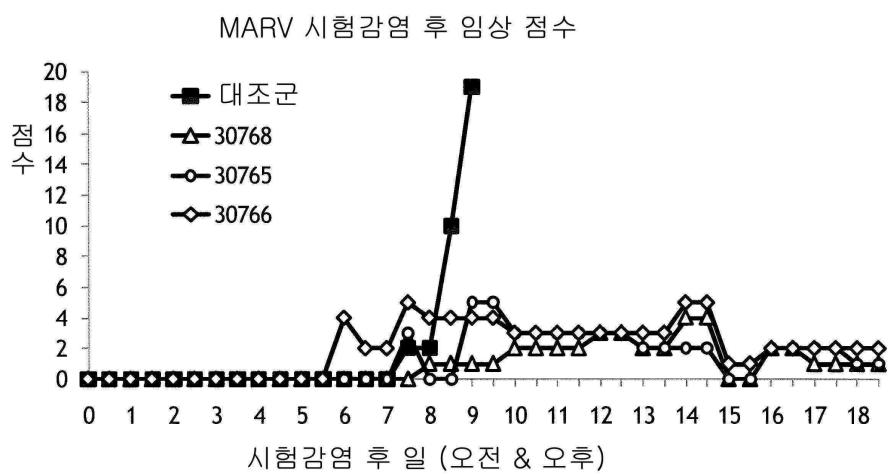
도면6



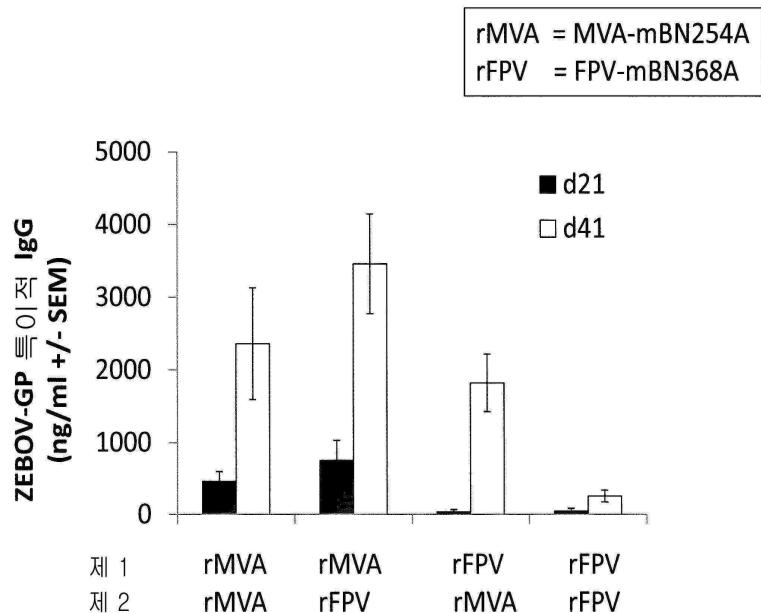
도면7a



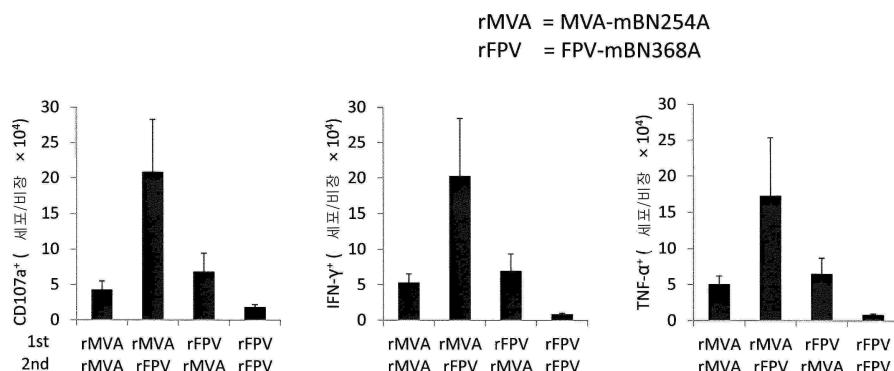
도면7b



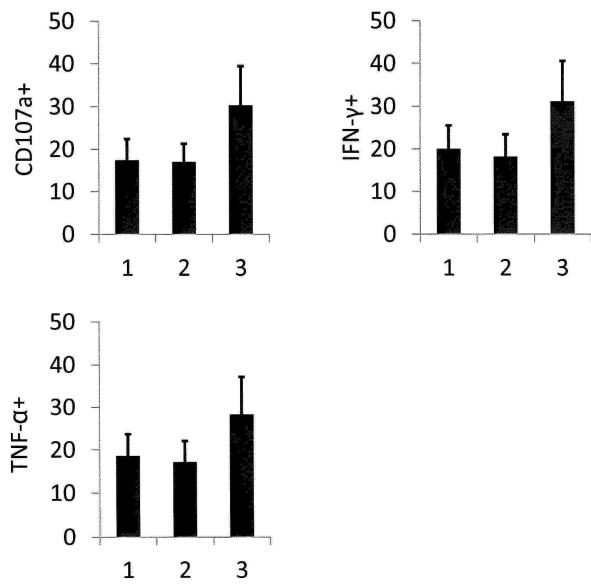
도면8a



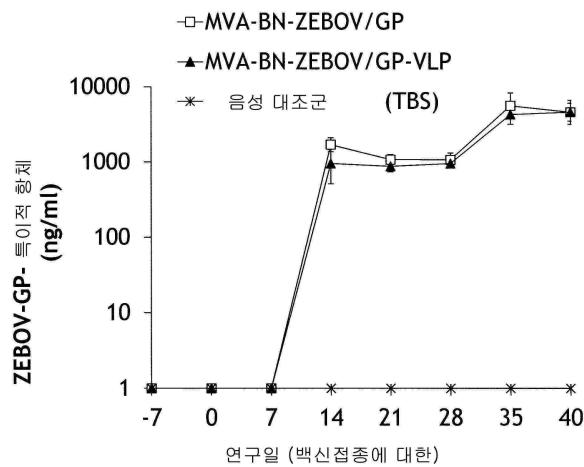
도면8b



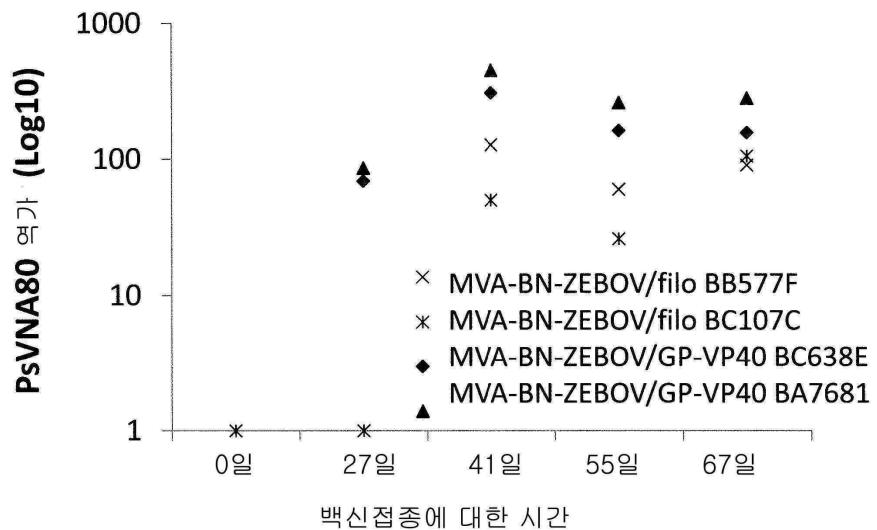
도면9



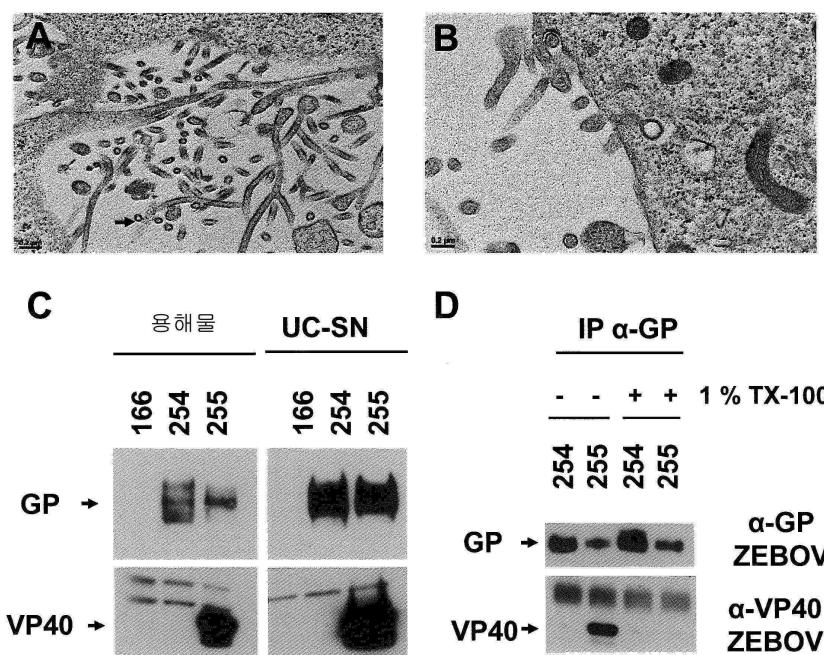
도면10



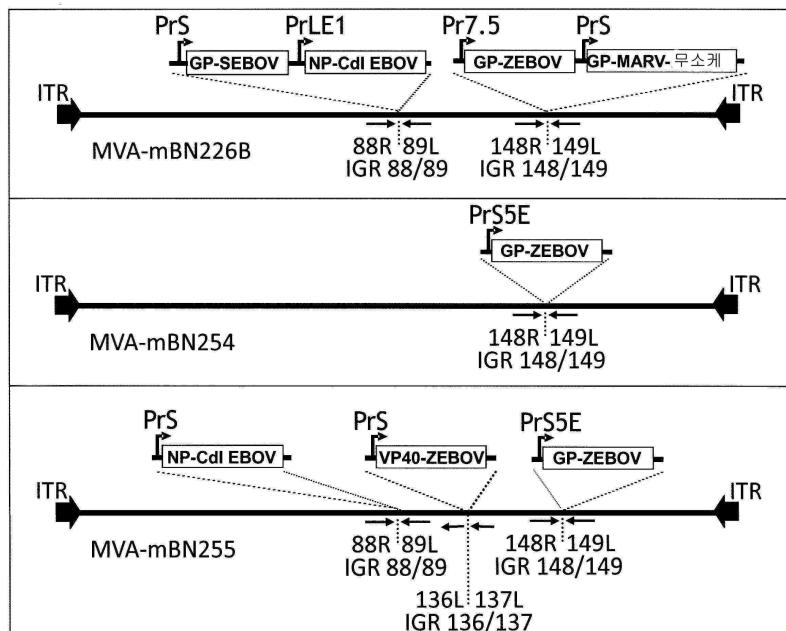
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> RECOMBINANT MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA (MVA) FILOVIRUS
VACCINE

<130> BN89PCT

<150> US 62/045,538

<151> 2014-09-03

<150> US 62/055,154

<151> 2014-09-25

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2362

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DNA sequence encoding GP-SEBOV-Maleo (GenBank Accession No.
U23069.1)

<400> 1

atttgatgaa gattaaggct gattaaggcc caacccat cttttacca taatcttgc	60
ctcaatacca ttaataggg gtataacttc caaagcgccc ccatcttcag gatctcgaa	120
tggagggctc tagctactc caattgcccc gagataaatt tcgaaaaagc tcttcttgc	180
tttgggtcat catcttattt caaaaaggct tttccatgcc tttgggtgtt gtgaccaaca	240
gcactttaga agtaacagag attgaccagc tagtctgcaa ggatcatctt gcatcaactg	300
accagctgaa atcagtttgt ctcaacctcg aggggagcgg agtatctact gatatccat	360
ctgcgacaaa gcgttgggc ttcatgtctg gtgtgcctcc ccaagtggc agctatgaag	420
caggagaatg ggctgaaaat tgctacaatc ttgaaataaa gaaaccggac gggagcgaat	480
gcattacccc accgcggat ggtgtcagag gcttccaag gtgcgcstat gttcacaaag	540
cccaaggaac cggccctgc cgggtgact atgccttca caaggatgga gcttcttcc	600
tctatgacag gctggcttca actgtatattt acagaggagt caatttgtt gagggggtaa	660
tcgcattctt gatattggct aaaccaaagg aaacgttctt tcaatcaccc cccattcag	720
aggcagcaaa ctacactgaa aatacatcaa gttactatgc cacatctac ttggagtacg	780
aatcgaaaa ttgggtgtt caacactcca cgacccttt caaaattaac aataatactt	840
ttgttcttctt ggacaggccc cacacgcctc agttccctt ccagctgaat gataccattc	900
aacttcacca acagttgagc aacacaactg ggaaactaat ttggacacta gatgctaata	960
tcaatgtga tattggtaa tggctttt gggaaaataa aaaaatctt ccgaacaact	1020
acgtggagaa gagctgttctt tcgaaacttt atcgctcaac gagacagaag acgatgtgc	1080
gacatcgctg agaactacaa aggaaagaat ctccgacgg gccaccagga agtattcgga	1140
cctggttcca aaggattccc ctggatggt ttcatgtcac gtaccagaag gggaaacaac	1200
atggcgctt cagaattcga cagaaggctg aagagttagt gtgaatactc aggaaactat	1260
cacagagaca actgcaacaa tcataggcac taacggtaac aacatgcaga tctccaccat	1320
cgggacagga ctgagctcca gccaatctt gagttctca cggaccatgg caccaagccc	1380
ttagactcag acctccacaa cctacacacc aaaactacca gtgtgacca cggaggaacc	1440
aacaacacca ccgagaaact ctcctggctc aacaacagaa gcacccactc tcaccacccc	1500
agagaatata acaacagcgg taaaactgt ttggcacaa gagtcccacaa gcaacggct	1560
aataacttca acagtaaacag gtattcttgg gagccttgaa ctgcggaaac gcagcagaag	1620
acaagttAAC accagggcca cggtaaaatg caatccaaac ttacactact ggactgcaca	1680
agaacaacat aatgctgctg ggattgcctg gatccgtac ttggacccgg gtgcagaagg	1740
catataact gaaggctta tgcacaacca aaatgcctt gtcgtggac tcagacaact	1800

tgcaaatgaa acaactcaag ctctgcagct ttcttaagg gccacgacgg agctgcggac	1860
ataaccata ctaaatagga aggccataga ttccctctg cgacgatggg gcgggacatg	1920
taggatcctg ggaccagatt gttgcattga gccacatgtat tgaccaaaa acatcactga	1980
taaaatcaac caaatcatcc atgatttcat cgacaaccct ttaaccaatc aggataatga	2040
tgataattgg tgacgggct ggagacagtg gatccctgca ggaataggca ttactggat	2100
tattattgca atcattgctc ttcttgctg ctgcaagctg ctttgtgaa tatcaacttg	2160

aatcattaat taaaagttga tacatttcta acattataaa ttataatctg atattaatac	2220
ttgaaaataa ggctaattgcc aaattctgtg ccaaacttga aagtaggttt accaaaatcc	2280
tttgaactgg aatgtttaa tgctcttct caatactata taagttcctt cccaaaataa	2340
tattgatgaa gattaagaaaa aa	2362

<210> 2

<211> 676

<212> PRT

<213> SEBOV-MALEO

<400> 2

Met Glu Gly Leu Ser Leu Leu Gln Leu Pro Arg Asp Lys Phe Arg Lys

1 5 10 15

Ser Ser Phe Phe Val Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe Ser

20 25 30

Met Pro Leu Gly Val Val Thr Asn Ser Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile

35 40 45

Asp Gln Leu Val Cys Lys Asp His Leu Ala Ser Thr Asp Gln Leu Lys

50 55 60

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser Thr Asp Ile Pro

65 70 75 80

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Gln Val

85 90 95

Val Ser Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu

100 105 110

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Pro Pro Asp Gly

115 120 125

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Ala Gln Gly Thr

130	135	140
Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe His Lys Asp Gly Ala Phe Phe		
145	150	155
Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Val Asn Phe		
165	170	175
Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro Lys Glu Thr		
180	185	190
Phe Leu Gln Ser Pro Pro Ile Arg Glu Ala Ala Asn Tyr Thr Glu Asn		
195	200	205
Thr Ser Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn		
210	215	220
Phe Gly Ala Gln His Ser Thr Thr Leu Phe Lys Ile Asn Asn Asn Thr		
225	230	235
Phe Val Leu Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln Leu		
245	250	255
Asn Asp Thr Ile Gln Leu His Gln Gln Leu Ser Asn Thr Thr Gly Lys		
260	265	270
Leu Ile Trp Thr Leu Asp Ala Asn Ile Asn Ala Asp Ile Gly Glu Trp		
275	280	285
Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Leu Ser Glu Gln Leu Arg Gly Glu		
290	295	300
Glu Leu Ser Phe Glu Thr Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asp Asp Asp		
305	310	315
Ala Thr Ser Ser Arg Thr Thr Lys Gly Arg Ile Ser Asp Arg Ala Thr		
325	330	335
Arg Lys Tyr Ser Asp Leu Val Pro Lys Asp Ser Pro Gly Met Val Ser		
340	345	350
Leu His Val Pro Glu Gly Glu Thr Thr Leu Pro Ser Gln Asn Ser Thr		
355	360	365
Glu Gly Arg Arg Val Asp Val Asn Thr Gln Glu Thr Ile Thr Glu Thr		
370	375	380

Thr Ala Thr Ile Ile Gly Thr Asn Gly Asn Asn Met Gln Ile Ser Thr
 385 390 395 400
 Ile Gly Thr Gly Leu Ser Ser Ser Gln Ile Leu Ser Ser Ser Pro Thr
 405 410 415
 Met Ala Pro Ser Pro Glu Thr Gln Thr Ser Thr Thr Tyr Thr Pro Lys
 420 425 430
 Leu Pro Val Met Thr Thr Glu Glu Pro Thr Thr Pro Pro Arg Asn Ser
 435 440 445
 Pro Gly Ser Thr Thr Glu Ala Pro Thr Leu Thr Thr Pro Glu Asn Ile
 450 455 460
 Thr Thr Ala Val Lys Thr Val Trp Ala Gln Glu Ser Thr Ser Asn Gly
 465 470 475 480
 Leu Ile Thr Ser Thr Val Thr Gly Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg
 485 490 495
 Lys Arg Ser Arg Arg Gln Val Asn Thr Arg Ala Thr Gly Lys Cys Asn
 500 505 510
 Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Ala Gln Glu Gln His Asn Ala Ala Gly
 515 520 525
 Ile Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Gly Ala Glu Gly Ile Tyr Thr
 530 535 540
 Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asn Ala Leu Val Cys Gly Leu Arg Gln
 545 550 555 560
 Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr
 565 570 575
 Thr Glu Leu Arg Thr Tyr Thr Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
 580 585 590
 Leu Leu Arg Arg Trp Gly Gly Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Asp Cys
 595 600 605
 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asn
 610 615 620
 Gln Ile Ile His Asp Phe Ile Asp Asn Pro Leu Pro Asn Gln Asp Asn

625	630	635	640
Asp Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile			
645	650	655	
Gly Ile Thr Gly Ile Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu Cys Val Cys			
660	665	670	
Lys Leu Leu Cys			
675			
<210> 3			
<211> 2926			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> DNA sequence encoding NP-SEBOV-Boniface (GenBank Accession No.			
AF173836.1)			
<400> 3			
ctcaaactca aactaatatt gacattgaga ttgatctcat catttaccaa ttggagacaa	60		
ttaactagt taatccccca tttggggca ttccctaaagt gttgcgaagg tatgtggtc	120		
gtattgttg gcctttcct aacctggctc ctccataat tctaaccctc ttgataagtg	180		
tggttaccag agtaatagac taaatttgc ctggtagtta gcattttcta gtaagaccga	240		
tactatccca agtctcaaga gagggtgaga ggagggcccc gaggtatccc tttagtcac	300		
aaaatcttagc caattttagc taagtggact gattacctc atcacacgct atctactaag	360		
ggtttacctg agagcctaca acatggataa acgggtgaga gttcatggg ccctgggagg	420		
acaatctgag gttgatcttg actaccacaa gatattaaca gccgggctt cagtccaaca	480		
ggggatttgt cgacagagag tcatcccggt atatgtcgta aatgatcttg aggatatttg	540		
tcaacatatc attcaggctt ttgaagcagg tgttagatttc caggataatg ctgatagctt	600		
cctttactt ttatgtttac atcatgccta ccaaggagat cataggctct tcctcaaag	660		
tgtatgcagtt caatatttag agggccatgg cttcagggtt gaggtccgag aaaaggagaa	720		
tgtgcaccgt ctggatgaat tttgcacca ttttaccgg gaaaaaaatc tcaggagaac	780		
atggctgct atgcccgaag aggagacaac ggaagctaat gctggtcagt ttctatcctt	840		
tgccagtttgc ttctaccca aacttgcgt tggtggagaaa gctgcctgg aaaaagtaca	900		
aaggcaatt caggtccatg cagaacaagg gtcattcaa tatccaactt cctggcaatc	960		
agttggacac atgatggtga tttccgtt gatgaggaca aacttttaa tcaagttct	1020		

actaatacat caaggatgc acatggttgc aggtcatgat gcgaatgaca cagtaatatc	1080
taattctgtt gcccaggcaa ggttctctgg tcttctgatt gtaaagactg ttctggatca	1140
cacccatcaa aaaacagatc tcggagtacg acttcatcca ctggccagga cagcaaaagt	1200
gaagaatgag gtcagttcat tcaaggcggc tcttggttca ctgccaaagc atggagaata	1260
tgcctcgtt gcacgtctcc ttaatcttc tggagtcaac aacttggAAC atggcTTA	1320
tccacaactt tcagccatcg ctttgggtgt tgcaactgcc cacggagta cgcttgctgg	1380
tgtgaatgta ggggagcaat atcagcaact gcgtgaggct gctactgagg ctgaaaagca	1440
actccaaaca tatgctgaaa cacgtgagtt ggataaccTT gggcttgatg aacaggagaa	1500
gaagattctc atgagcttcc accagaagaa gaatgagatc agttccAGC agactaatgc	1560
aatggtaacc ttaaggaaag aacggctggc taaattgacc gaagccatca cgactgcATC	1620
gaagatcaag gttggagacc gttatcCTGA tgacaatgat attccattTC ccggggCGAT	1680
ctatgatgac actcacCCCA atccctCTGA tgacaatCCT gatgattCAC gtgataACAC	1740
tattccaggt ggtgttgtt acccgatgatgatgaggt aataattatc ctgactacgatgatg	1800
ggattcggct gaaggcacca caggagatct tgatctttc aatttggacg acgacgatgatg	1860
tgacagccga ccaggaccac cagacaggGGG gcagaacaag gagagggcgg cccggacata	1920
tggcctccaa gatccgacct tggacggagc gaaaaaggtg ccggagttGA ccccaggTT	1980
ccatcaacca ggcAACCTCC acatcacCAA gtcgggttCA aacaccaACC aaccacaAGG	2040
caatatgtca tctactctcc atagtatgac ccctatacAG gaagaatcAG agcccgatgA	2100
tcaaaaAGAT aatgtatgacg agagtctcac atcccttgac tctgaaggTG acgaagatgg	2160
tgagagcatc tctgaggaga acacCCCAAC tgtagtcCA ccagcaccAG tctacAAAGA	2220
cactggagta gacactaatc agcagaatgg accaAGCAGT actgttagata gtcaaggTT	2280
tgaaagtgaa gctctccaa tcaactctaa aaagagtTCC gcactagaAG aaacatatta	2340
tcatctcta aaaacacagg gtccatttgA ggcaatcaat tattatcacc taatgagtGA	2400
tgaacccatt gcttttagca ctgaaagtgg caaggaatat atctttccAG actcccttgA	2460
agaagcctac cgcgcgtggT tgagtgagaa ggaggcCTTA gagaaggAAA atcgTTatCT	2520
ggtcattgat gGCCAGCAAT tcctctggCC ggtaatgagc ctacgggACA agttcCTTGC	2580
cgttcttcaa catgactgag gacctatgat tggtgatct tggTTattCC gagcctgatt	2640
ataattgttc tgataattca agtataagca cctacCCGA aatataAAACc ctatCTTAGT	2700
tataaggAAA ttaaataaat aacctgtAAAG ttataggACT acgaagAGCT gcttGTgtCA	2760

atttatcatg	ggttataacc	cgtaccgcaa	gaatcattat	ttagtagttt	tggtcagctt	2820										
ctgatatgt	ccaataagaa	aacattatag	cattaaaaca	taaggtatct	ttcaatgagc	2880										
ttaggaggat	aatatcctga	taaattctat	agaacttaag	attaag		2926										
<210>	4															
<211>	738															
<212>	PRT															
<213>	SEBOV-Boniface															
<400>	4															
Met	Asp	Lys	Arg	Val	Arg	Gly	Ser	Trp	Ala	Leu	Gly	Gly	Gln	Ser	Glu	
1																
	5															15
Val	Asp	Leu	Asp	Tyr	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Gln	
	20															30
Gln	Gly	Ile	Val	Arg	Gln	Arg	Val	Ile	Pro	Val	Tyr	Val	Val	Asn	Asp	
	35															45
Leu	Glu	Gly	Ile	Cys	Gln	His	Ile	Ile	Gln	Ala	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	
	50															60
Asp	Phe	Gln	Asp	Asn	Ala	Asp	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	His		
	65															80
His	Ala	Tyr	Gln	Gly	Asp	His	Arg	Leu	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	
	85															95
Gln	Tyr	Leu	Glu	Gly	His	Gly	Phe	Arg	Phe	Glu	Val	Arg	Glu	Lys	Glu	
	100															110
Asn	Val	His	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Lys	
	115															125
Asn	Leu	Arg	Arg	Thr	Leu	Ala	Ala	Met	Pro	Glu	Glu	Glu	Thr	Thr	Glu	
	130															140
Ala	Asn	Ala	Gly	Gln	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Lys	
	145															160
Leu	Val	Val	Gly	Glu	Lys	Ala	Cys	Leu	Glu	Lys	Val	Gln	Arg	Gln	Ile	
	165															175
Gln	Val	His	Ala	Glu	Gln	Gly	Leu	Ile	Gln	Tyr	Pro	Thr	Ser	Trp	Gln	
	180															190

Ser Val Gly His Met Met Val Ile Phe Arg Leu Met Arg Thr Asn Phe
 195 200 205
 Leu Ile Lys Phe Leu Leu Ile His Gln Gly Met His Met Val Ala Gly
 210 215 220

His Asp Ala Asn Asp Thr Val Ile Ser Asn Ser Val Ala Gln Ala Arg
 225 230 235 240
 Phe Ser Gly Leu Leu Ile Val Lys Thr Val Leu Asp His Ile Leu Gln
 245 250 255
 Lys Thr Asp Leu Gly Val Arg Leu His Pro Leu Ala Arg Thr Ala Lys
 260 265 270
 Val Lys Asn Glu Val Ser Ser Phe Lys Ala Ala Leu Gly Ser Leu Ala
 275 280 285

Lys His Gly Glu Tyr Ala Pro Phe Ala Arg Leu Leu Asn Leu Ser Gly
 290 295 300
 Val Asn Asn Leu Glu His Gly Leu Tyr Pro Gln Leu Ser Ala Ile Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Val Ala Thr Ala His Gly Ser Thr Leu Ala Gly Val Asn Val
 325 330 335
 Gly Glu Gln Tyr Gln Gln Leu Arg Glu Ala Ala Thr Glu Ala Glu Lys
 340 345 350

Gln Leu Gln Gln Tyr Ala Glu Thr Arg Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu
 355 360 365
 Asp Glu Gln Glu Lys Lys Ile Leu Met Ser Phe His Gln Lys Lys Asn
 370 375 380
 Glu Ile Ser Phe Gln Gln Thr Asn Ala Met Val Thr Leu Arg Lys Glu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Leu Thr Glu Ala Ile Thr Thr Ala Ser Lys Ile Lys
 405 410 415

Val Gly Asp Arg Tyr Pro Asp Asp Asn Asp Ile Pro Phe Pro Gly Pro
 420 425 430
 Ile Tyr Asp Asp Thr His Pro Asn Pro Ser Asp Asp Asn Pro Asp Asp

435	440	445
Ser Arg Asp Thr Thr Ile Pro Gly Gly Val Val Asp Pro Tyr Asp Asp		
450	455	460
Glu Ser Asn Asn Tyr Pro Asp Tyr Glu Asp Ser Ala Glu Gly Thr Thr		
465	470	475
Gly Asp Leu Asp Leu Phe Asn Leu Asp Asp Asp Asp Asp Ser Arg		
485	490	495
Pro Gly Pro Pro Asp Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr		
500	505	510
Tyr Gly Leu Gln Asp Pro Thr Leu Asp Gly Ala Lys Lys Val Pro Glu		
515	520	525
Leu Thr Pro Gly Ser His Gln Pro Gly Asn Leu His Ile Thr Lys Ser		
530	535	540
Gly Ser Asn Thr Asn Gln Pro Gln Gly Asn Met Ser Ser Thr Leu His		
545	550	555
Ser Met Thr Pro Ile Gln Glu Glu Ser Glu Pro Asp Asp Gln Lys Asp		
565	570	575
Asn Asp Asp Glu Ser Leu Thr Ser Leu Asp Ser Glu Gly Asp Glu Asp		
580	585	590
Gly Glu Ser Ile Ser Glu Glu Asn Thr Pro Thr Val Ala Pro Pro Ala		
595	600	605
Pro Val Tyr Lys Asp Thr Gly Val Asp Thr Asn Gln Gln Asn Gly Pro		
610	615	620
Ser Ser Thr Val Asp Ser Gln Gly Ser Glu Ser Glu Ala Leu Pro Ile		
625	630	635
Asn Ser Lys Lys Ser Ser Ala Leu Glu Glu Thr Tyr Tyr His Leu Leu		
645	650	655
Lys Thr Gln Gly Pro Phe Glu Ala Ile Asn Tyr Tyr His Leu Met Ser		
660	665	670
Asp Glu Pro Ile Ala Phe Ser Thr Glu Ser Gly Lys Glu Tyr Ile Phe		
675	680	685

Pro Asp Ser Leu Glu Glu Ala Tyr Pro Pro Trp Leu Ser Glu Lys Glu
 690 695 700
 Ala Leu Glu Lys Glu Asn Arg Tyr Leu Val Ile Asp Gly Gln Gln Phe
 705 710 715 720
 Leu Trp Pro Val Met Ser Leu Arg Asp Lys Phe Leu Ala Val Leu Gln
 725 730 735

His Asp

<210> 5

<211> 2046

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> codon-optimized DNA sequence encoding GP-MARV-Musoke (GenBank

Accession No. ABA87127.1 for protein sequence)

<400> 5

atgaaaacaa cctgtttcct gatcagcctg atcctgatcc agggcaccaa gaacctgcc	60
atcctggaaa tcgcaggcaa caaccagccc cagaacgtgg atagcgtgtg cagcggcacc	120
ctgcagaaaa ccgaggacgt gcacctgatg ggcttcacac tgagcggcca gaaggtggcc	180
gatagcccccc tggaaagccag caagcgctgg gccttcagaa cagggtgcc acctaagaac	240

gtggagtaca cagagggcga ggaagccaag acctgtaca acatcagcgt gaccgacccc	300
agcggcaagt ccctgctgct ggacccccc accaacatca gagactaccc taagtgcag	360
accatccacc acatccaggg ccagaatctt cacgctcagg gcattgtct gcacctgtgg	420
ggcgcattct tcctgttatga cagaatcgcc tccaccacca tgtaccggg caaggtgttc	480
acagagggca atatcgccgc catgatcgtg aacaagaccc tgcaacaagat gatcttcagc	540
agacagggcc agggctaccg gcacatgaac ctgaccagca ccaacaagta ctggaccagc	600
agcaacggca cccagaccaa cgacaccggc tgcttggcg ccctgcagga atacaacagc	660

accaagaatc agacctgcgc ccccagcaag atcccttcctc ccctgcctac cgccagaccc	720
gagatcaagc tgacaagcac ccccaccgac gccaccaagc tgaacaccac cgacccctcc	780
agcgacgatg aggacctggc aactagtggt agcggcagcg gagagagaga gccccacacc	840
acctccgatg ccgtgaccaa gcagggcctg agcagcacaa tgccccctac ccccagccct	900
cagcctagca cacccagca gggcggcaat aacaccaacc actcccagga cgccgtgacc	960
gagctggaca agaacaatac caccgcccag cctagcatgc ccccccacaa cactactacc	1020

atctccacca acaataccag caagcacaac ttcagcaccc tgagcgcccc tctgcagaac 1080

accaccaacg acaacaccca gagcaccatc acagagaacg agcagaccag cgcccattcc 1140

atcaccaccc tgcccccac cggcaatctt accacccca agagcaccag ctccaagaag 1200

ggtcctgcaa ctacccccc caacacaacc aacgaggact tcaccagccc tcccccaacc 1260

cctagctcca cageccagca cctgggtgtac ttccggcgga agcggccat cctgtggcg 1320

gagggcgaca tttccctt tctggacggc ctgattaacg ccccatcga ctgcaccc 1380

gtgccaata ccaagaccat ctgcgacgag agtagttcat caggtgcac agccgaagag 1440

gatcagcact ccagcccaa catctccctg accctgagct acttcccaa catcaatgag 1500

aacaccgcct acagcggcga gaacgagaac gactgcgacg ccgagctgag aatttggac 1560

gtgcaggaag atgacctggc cgctggcctg agttggatac cattcttcgg cccaggcatc 1620

gagggtctgt acaccgcgt gctgatcaag aaccagaaca acctcggtg cagactgcgg 1680

agactggcca accagaccgc caagtccctg gaactgcgtc tgagagtgc caccgaagag 1740

agaaccttct ccctgatcaa cggcacgccc attgatttc tgctgacccg ctggggcgga 1800

acatgcaagg tcctgggtcc agactgttgt atcggcatcg aggacctcg caagaacatc 1860

agcgaacaga ttgaccagat caagaaggac gagcagaaag agggcacagg ctggggcctg 1920

ggcggcaagt ggtggaccag cgactggggc gtgctgacaa acctggcat cctgctgctg 1980

ctgtctatcg ctgtgtatgat tgccctgagc tgcatctgc ggatcttcac caagtacatc 2040

ggctga 2046

<210> 6

<211> 681

<212> PRT

<213> MARV-Musoke

<400> 6

Met Lys Thr Thr Cys Phe Leu Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Thr

1 5 10 15

Lys Asn Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn Asn Gln Pro Gln Asn

20 25 30

Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His

35 40 45

Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu

50 55 60

Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Thr Gly Val Pro Pro Lys Asn
 65 70 75 80
 Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser
 85 90 95

 Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn
 100 105 110
 Ile Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln
 115 120 125
 Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe
 130 135 140
 Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe
 145 150 155 160

 Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys
 165 170 175
 Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr
 180 185 190
 Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp
 195 200 205
 Thr Gly Cys Phe Gly Ala Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln
 210 215 220

 Thr Cys Ala Pro Ser Lys Ile Pro Pro Leu Pro Thr Ala Arg Pro
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Leu Thr Ser Thr Pro Thr Asp Ala Thr Lys Leu Asn Thr
 245 250 255
 Thr Asp Pro Ser Ser Asp Asp Glu Asp Leu Ala Thr Ser Gly Ser Gly
 260 265 270
 Ser Gly Glu Arg Glu Pro His Thr Ser Asp Ala Val Thr Lys Gln
 275 280 285

 Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Pro Ser Pro Gln Pro Ser Thr
 290 295 300
 Pro Gln Gln Gly Gly Asn Asn Thr Asn His Ser Gln Asp Ala Val Thr

305	310	315	320
Glu Leu Asp Lys Asn Asn Thr Thr Ala Gln Pro Ser Met Pro Pro His			
325	330	335	
Asn Thr Thr Thr Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Phe Ser			
340	345	350	
Thr Leu Ser Ala Pro Leu Gln Asn Thr Thr Asn Asp Asn Thr Gln Ser			
355	360	365	
Thr Ile Thr Glu Asn Glu Gln Thr Ser Ala Pro Ser Ile Thr Thr Leu			
370	375	380	
Pro Pro Thr Gly Asn Pro Thr Thr Ala Lys Ser Thr Ser Ser Lys Lys			
385	390	395	400
Gly Pro Ala Thr Thr Ala Pro Asn Thr Thr Asn Glu His Phe Thr Ser			
405	410	415	
Pro Pro Pro Thr Pro Ser Ser Thr Ala Gln His Leu Val Tyr Phe Arg			
420	425	430	
Arg Lys Arg Ser Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu			
435	440	445	
Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr			
450	455	460	
Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu			
465	470	475	480
Asp Gln His Ala Ser Pro Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Phe Pro			
485	490	495	
Asn Ile Asn Glu Asn Thr Ala Tyr Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys			
500	505	510	
Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala			
515	520	525	
Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr			
530	535	540	
Thr Ala Val Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg			
545	550	555	560

Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val
 565 570 575

Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp
 580 585 590

Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp
 595 600 605

Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Lys Asn Ile Ser Glu Gln Ile
 610 615 620

Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu
 625 630 635 640

Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly
 645 650 655

Ile Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile
 660 665 670

Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly

675 680

<210> 7

<211> 3642

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DNA sequence encoding TTC

<400> 7

atggagacg acaccctgct gctgtgggtc ctgctcctgt gggtgcccg cagcacccgc	60
gacgaagtga agcaggaaaa ccggctgctg aacgagagcg agagcagcag ccagggctg	120
ctgggctact acttcagcga cctgaacttc caggccccca tggtggtgac cagcagcacc	180
accggcgacc tgagcatccc cagcagcag ctggaaaaca tccccagcga gaaccagtac	240
ttccagagcg ccatttggag cggtttcatc aaagtgaaga agtccgacga gtacacctc	300

gccacacctcg ccgacaacca cgtgaccatg tgggtggacg accaggaagt gatcaacaag	360
gccagcaaca gcaacaagat ccggctggaa aaggccggc tgtaccagat caagatccag	420
taccagagag agaacccac cgagaaggc ctggacttca agctgtactg gaccgacagc	480
cagaacaaga aagaagtgtat cagcagcagc aacctgcagc tgcccgagct gaagcagaag	540
tccagcaact cccggaagaa gcggagcacc agcgccggac ccaccgtgcc cgaccggac	600

aacgacggca tccccgacag cctggaagt gagggctaca ccgtggacgt gaagaacaag	660
cggacccccc tgagccctg gatcagcaac atccacgaga agaagggct gaccaagtac	720
aagagcagcc ccgagaagtg gaggaccgcg agcgaccct acagcgactt cgagaaagt	780
accggccgga tcgacaagaa cgtgtcccc gaggccagac accctctggt ggccgcctac	840
cccatcgtgc acgtggacat gaaaaatatc atcctgagca agaacgagga ccagagcacc	900
cagaacacccg actcccgac ccggaccatc agcaagaaca ccagcaccag cagaacccac	960
acaaggcgaag tgcacggcaa cgccgaagt gacgcccact tttcgacat cggagggagc	1020
gtgtccgccc gttcagcaa ctccaacagc agcaccgtgg ccatcgacca cagcctgagc	1080
ctggccggcg agagaacctg ggccgagaca atggcctga acaccggca caccggcaga	1140
ctgaacgcca acatccgcta cgtgaacacc ggcaccgccc ccatctacaa cgtgctgccc	1200
accacccccc tgggtctggg caagaaccag accctggcca ccatcaaggc caaagagaac	1260
cagctgtccc agatcctggc ccccaacaac tactaccca gcaagaacct ggccctatc	1320
gccctgaacg cccaggacga cttcttttcc accccatca ccatgaacta caaccagtt	1380
ctggaaactgg aaaagaccaa gcagctgcgg ctggacaccc accaggtgt a cggcaatatc	1440
gccacctaca acttcgagaa cggcagatgt cgcgtggaca cggcagcaa ttggagcgag	1500
gtgctgcctc agatccagga aaccaccgca cggatcatct tcaacggcaa ggacctgaac	1560
ctggtgagc ggcggatcgc cgccgtgaac ccctccgacc ccctggaaac caccaagecc	1620
gacatgaccc taaaagagggc cctgaagatc gccttcggct tcaacgagcc caacggcaac	1680
ctgcagtacc agggcaagga catcaccgag ttgcacttca acttcgacca gcagaccc	1740
cagaacatca agaatcagct ggccgaactg aacgtgacca acatctacac agtgcgtggac	1800
aagatcaagg tgaatgcca gatgaacatc ctgatccggg acaagcggtt ccactacgac	1860
cggaacaata tcgccgtggg cgccgacgag agcgtggta aagaagccca cgggaaagtc	1920
attaaacagct ccaccgaggg gctgctgtcg aacatcgaca aggacatccg caagatcccg	1980
agcggtaca tcgtggagat cgaggacacc gaggcctga aagaagtcat taacgaccgc	2040
tacgacatgc tgaatatcag cagcctgcgg caggacggca agacccatc cgacttcaag	2100
aagtacaacg acaagctgcc cctgtacatc agcaacccca actacaaagt gaacgtgtac	2160
gccgtgacca aagagaatac catcatcaac cctagcgaga acggcgcacac ctccaccaac	2220
ggcatcaaga agatcctgat cttcagcaag aaggctacg agatcggcgg accccggccct	2280
aagaacctgg actgctgggt ggacaacgaa gaggacatcg acgtgtatct gaagaagtct	2340

accatcctga atctggacat caacaacgac atcatcagcg acatctccgg cttcaacagc 2400

agcgtgtatca cctaccccga cgcccagctg gtgcctggca tcaatggcaa ggccatccac 2460
 ctggtaaca acgagagcag cgaagtgtac gtgcacaagg ccatggacat cgagtacaac 2520
 gatatgttca acaacttcac cgtgtcctt tggctgcggg tgcccaaggt gtccgccagc 2580
 caccttggaa acgtacggcac caacgagttac agcatcatca gcagcatgaa gaagcacagc 2640
 ctgtccatcg gcagcgggtg gagcgtgtcc ctgaaggca acaacctgtat ctggaccctg 2700
 aaggactctg ccggcgaagt gcggcagatc accttcccgac acctgcccga caagttcaac 2760
 gcctacctgg ccaataagtgg tttttcatc accatcacca acgacagact gtccagcgcc 2820

aacctgtata tcaacggcgt gctgatggc agcggcaga tcacaggcct ggggccatc 2880
 cgggaggaca acaacatcac cctgaagctg gaccgggtgca acaacaacaa ccagtacgt 2940
 tccatcgaca agttccgcat cttctgcaag gccctgaatc ccaaagagat cgagaagctg 3000
 tacaccagct acctgtccat caccttctg cgggatttct gggcaaccc tctgagatac 3060
 gacaccgagt actacctgtat cccctggcc agcagetcca aggacgtgca gctgaagaac 3120
 atcaccgact acatgtaccc gaccaacgccc cccagctaca ccaatggcaa gctgaacatc 3180
 tactaccggc ggctgtacaa cggcctgaag ttcatcatca agcggtacac ccccaacaat 3240

gagatcgaca gttcgtgaa gtccggcgcac ttcatcaagc tgtatgtgtc ctacaacaac 3300
 aatgagcaca tcgtggcta ccccaaggac gggAACGCT tcaacaacct ggaccggatc 3360
 ctgagagtgg gctacaacgc ccctggcatc cccctgtaca agaaaatgga agccgtgaag 3420
 ctgcgggacc tggaaaccta ctctgtcag ctgaaactgt acgacgacaa gaacgccagc 3480
 ctggcctgg tggggaccca caacggccag atcggcaacg accccaaccc ggatatcctg 3540
 atcggccagca actggactt caaccacctg aaggacaaga tcctggctg cgatggtag 3600
 ttctgtgcca ccgacgaggg ctggaccaac gacaagctt ga 3642

<210> 8

<211> 1213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Lys Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu

20	25	30
----	----	----

Ser Glu Ser Ser Gln Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu

35 40 45

Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu

50 55 60

Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr

65 70 75 80

Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp

85 90 95

Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala Asp Asn His Val Thr Met Trp Val

100 105 110

Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg

115 120 125

Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu

130 135 140

Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser

145 150 155 160

Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu

165 170 175

Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala

180 185 190

Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu

195 200 205

Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu

210 215 220

Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr

225 230 235 240

Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp

245 250 255

Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala

260 265 270

Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr Pro Ile Val His Val Asp Met Glu

275 280 285

Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp

290 295 300

Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His

305 310 315 320

Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp

325 330 335

Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn Ser Thr

340 345 350

Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala

355 360 365

Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn

370 375 380

Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro

385 390 395 400

Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys

405 410 415

Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr

420 425 430

Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe

435 440 445

Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu

450 455 460

Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile

465 470 475 480

Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser

485 490 495

Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile

500 505 510

Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala

515 520 525

Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu
 530 535 540
 Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn
 545 550 555 560
 Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp
 565 570 575
 Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Val
 580 585 590
 Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met
 595 600 605
 Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile
 610 615 620
 Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val
 625 630 635 640
 Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile
 645 650 655
 Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly
 660 665 670
 Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser
 675 680 685
 Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp
 690 695 700
 Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr
 705 710 715 720
 Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp
 725 730 735
 Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly
 740 745 750
 Tyr Glu Ile Gly Gly Pro Gly Pro Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp
 755 760 765
 Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn

770	775	780
Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser		
785	790	795
Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly		
805	810	815
Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His		
820	825	830
Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val		
835	840	845
Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln		
850	855	860
Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser		
865	870	875
Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu		
885	890	895
Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe		
900	905	910
Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val		
915	920	925
Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile		
930	935	940
Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile		
945	950	955
Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn		
965	970	975
Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu		
980	985	990
Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr		
995	1000	1005
Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu		
1010	1015	1020

Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu
 1025 1030 1035
 Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr
 1040 1045 1050
 Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly
 1055 1060 1065
 Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp

 1070 1075 1080
 Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr
 1085 1090 1095
 Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala
 1100 1105 1110
 Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro
 1115 1120 1125
 Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp

 1130 1135 1140
 Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn
 1145 1150 1155
 Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn
 1160 1165 1170
 Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn
 1175 1180 1185
 His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro

 1190 1195 1200
 Thr Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Lys Leu
 1205 1210
 <210> 9
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> DNA sequence encoding hCD40L
 <400> 9

atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctcggt ccactggact gcccattcgc	60
atgaaaattt tcatgttattt acttactgtc tttcttatca cccagatgtat tgggtcagca	120
cttttgctg tgtatcttca tagaaggatgg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat	180
gaagatttt tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccatcatcc	240

ttactgaact gtgaggagat taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta	300
aacaaagagg agacgaagaa agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct	360
caaattgcgg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg	420
gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtaa ccctggaaaa tggaaacag	480
ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgccc aagtccaccc ttgttccat	540
cggaaagctt cgagtcaagc tccattata gccagccctc gcctaaagtc tcccgtaga	600
ttcgaggagaa tcttacttag agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcggcaaa	660

caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcgggt gtttgtcaat	720
gtgactgatc caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtccttgg cttaactcaaa	780
ctctga	786

<210> 10

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu

20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 11

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DNA sequence encoding hIL15R-Sushi

<400> 11

atggcccca gacgggccag aggctgtaga accctggac tgcctgccct gctgctgctc 60

ctcctgctga ggcctcctgc cacccggggc atcacctgtc ccccacccat gagcgtggaa 120
 cacggccaca tctgggtcaa gagctacagc ctgtacagca gagagcggtt catctgcaac 180
 agcggcttca agcggaaaggc cggcaccagc agcctgaccg agtgcgtgct gaacaaggcc 240

accaacgtgg cccactggac cacccccagc ctgaagtgc tcagggaccc cgccctggtg	300
catcagaggc ctgctctcc aagcggcgga tctggcgcg gaggaaatgg cgaggatca	360
ggcggaggcg gcagcctgca gaactgggtc aacgtgatca gcgacctgaa gaagatcgag	420
gaccgtatcc agagcatgca catcgacgcc accctgtaca ccgagagcga cgtgcacccc	480

agctgcaaag tgaccggcat gaagtgcctt ctgctggAAC tgcaggtcat cagcctggaa	540
agcggcgacg ccagcatcca cgacaccgtg gaaaacctga tcattctggc caacaacagc	600
ctgagcagca acggcaacgt gaccgagagc ggctgcaaag agtgcgagga actggaagag	660
aagaatatca aagagttcct gcagagcttc gtgcacatcg tgcagatgtt catcaacacc	720
agctga	726

<210> 12

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr

20	25	30
----	----	----

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser

35	40	45
----	----	----

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys

50	55	60
----	----	----

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp

85	90	95
----	----	----

Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly Ser Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Asn

115	120	125
-----	-----	-----

Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln

130	135	140
Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro		
145	150	155
Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val		
165	170	175
Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn		
180	185	190
Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr		
195	200	205
Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys		
210	215	220
Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr		
225	230	235
240		
Ser		
<210> 13		
<211> 753		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 13		
atggttgctg ggagcgacgc gggcgggcc ctgggggtcc tcagcgtgg tgcctgctg 60		
cactgcttgc ttcatcag ctgttttcc caacaaatat atgggttgt gtatggaaat 120		
gttaacttcc atgtaccaag caatgtgcct taaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag 180		
gataaagtgc cagaactgga aaattctgaa ttcaagcctt tctcatctt taaaaatagg 240		
gtttatatttgc acactgtgtc aggttagcctc actatctaca acttaacatc atcagatgaa 300		
gatgagtgatg aaatggaaatc gccaatattt actgataccca tgaagttctt tctttatgtg 360		
ctttagtctc ttccatctcc cacactaact tgtgcattga ctaatggaaatc cattgaagtc 420		
caatgcattgc taccagagca ttacaacagc catcgaggac ttataatgtt ctcattggat 480		
tgtccatgg agcaatgtt aaacgttactca accgttatat atttaagat ggaaaatgt 540		
cttccacaaa aaatacagtgc tactcttagc aatccattat ttaatacaac atcatcaatc 600		
attttgacaa cctgtatccc aagcagcggt cattcaagac acagatatgc acttataccc 660		
ataccattatc cagtaattac aacatgttattt gtgcgtata tgaatggat tctgaaatgt 720		

gacagaaaac cagacagaac caactccat tga 753

<210> 14

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln

20	25	30
----	----	----

Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn

35	40	45
----	----	----

Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala

50	55	60
----	----	----

Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr

85	90	95
----	----	----

Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr

115	120	125
-----	-----	-----

Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile

130	135	140
-----	-----	-----

Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys

165	170	175
-----	-----	-----

Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro

180	185	190
-----	-----	-----

Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser

195

200

205

Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala

210

215

220

Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys

225

230

235

240

Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn

245

250

<210> 15

<211> 1599

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggctcca gcagccccc gccccgcgtg cccgcactcc tggtccctgct cggggctctg	60
ttcccaaggac ctggcaatgc ccagacatct gtgtccccct caaaagtcat cctccccgg	120

ggaggctccg tgctggtgac atgcagcacc tcctgtgacc agcccaagtt gttggcata	180
gagaccccggt tgcttaaaaa ggagttgtct ctgcctggaa acaaccggaa ggtgtatgaa	240
cttagcaatg tgcagaagaaga tagccaaacca atgtgtatt caaactgccc tgcgtggcag	300
tcaacagcta aaaccttcct caccgtgtac tggactccag aacgggtggaa actggcaccc	360
ctccctctt ggcagccagt gggcaagaac cttaccctac gctgccaggt ggagggtggg	420
gcaccccggtt ccaacctcac cgtggtgctg ctccgtgggg agaaggagct gaaacgggag	480
ccagctgtgg gggagccgc tgaggtcacg accacgggtgc tggtgaggag agatcaccat	540

ggagccaatt tctcgtgccg cactgaactg gacctgcggc cccaaaggct ggagctgttt	600
gagaacacctt cgccccctta ccagctccag acctttgtcc tgccagcgac tcccccaaa	660
cttgcagcc cccgggtctt agaggtggac acgcaggggaa ccgtggcttg ttccctggac	720
gggctgttcc cagtcctcgaa ggcggcgttcc cacctggcac tggggacca gaggttgaac	780
cccacagtca cctatggcaa cgactccttc tcggccaagg cctcagtcag tgtgaccgca	840
gaggacgagg gcacccagcg gctgacgtgt gcagtaatac tggggacca gagccaggag	900
acactgcaga cagtgaccat ctacagcttt ccggcgccca acgtgattct gacgaagcca	960

gaggctctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg cccaccctag agccaagggtg	1020
acgtgttgttccagg ccagccactg ggcccgaggccc cccagctctt gctgaaggcc	1080
accccaaggagg acaacgggacg cagttctcc tgctctgcaa ccctggaggt ggccggccag	1140

cttatacaca agaaccagac ccgggagct cgtgtctgt atggccccc actggacgag	1200
agggattgtc cggaaactg gacgtggca gaaaattccc agcagactcc aatgtgccag	1260
gcttgggga acccattgcc cgagctcaag tgtctaaagg atggacttt cccactgccc	1320
atcgggaat cagtactgt cactcgagat cttagggca cttaccccttg tcggccagg	1380

agcactcaag gggaggtcac ccgcaagggtg accgtgaatg tgctctccc ccggatgag	1440
attgtcatca tcactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcagc	1500
tacctctata accgccagcg gaagatcaag aaatacagac tacaacaggc ccaaaaaggg	1560
accccatga aaccgaacac acaagccacg cctccctag	1599

<210> 16

<211> 532

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ala Leu Pro Ala Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Phe Pro Gly Pro Gly Asn Ala Gln Thr Ser Val Ser

20 25 30

Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser Val Leu Val Thr Cys

35 40 45

Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly Ile Glu Thr Pro Leu

50 55 60

Pro Lys Lys Glu Leu Leu Pro Gly Asn Asn Arg Lys Val Tyr Glu

65 70 75 80

Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met Cys Tyr Ser Asn Cys

85 90 95

Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu Thr Val Tyr Trp Thr

100 105 110

Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser Trp Gln Pro Val Gly

115 120 125

Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ala

130 135 140

Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu
 145 150 155 160
 Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr Thr Val Leu Val Arg
 165 170 175
 Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg Thr Glu Leu Asp Leu
 180 185 190
 Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr Ser Ala Pro Tyr Gln
 195 200 205

Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro Gln Leu Val Ser Pro
 210 215 220
 Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val Val Cys Ser Leu Asp
 225 230 235 240
 Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His Leu Ala Leu Gly Asp
 245 250 255
 Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ala
 260 265 270

Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu Gly Thr Gln Arg Leu
 275 280 285
 Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln Ser Gln Glu Thr Leu Gln Thr
 290 295 300
 Val Thr Ile Tyr Ser Phe Pro Ala Pro Asn Val Ile Leu Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Ser Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Lys Cys Glu Ala His Pro
 325 330 335

Arg Ala Lys Val Thr Leu Asn Gly Val Pro Ala Gln Pro Leu Gly Pro
 340 345 350
 Arg Ala Gln Leu Leu Lys Ala Thr Pro Glu Asp Asn Gly Arg Ser
 355 360 365
 Phe Ser Cys Ser Ala Thr Leu Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile His Lys
 370 375 380
 Asn Gln Thr Arg Glu Leu Arg Val Leu Tyr Gly Pro Arg Leu Asp Glu

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Arg Asp Cys Pro Gly Asn Trp Thr Trp Pro Glu Asn Ser Gln Gln Thr

405	410	415
-----	-----	-----

Pro Met Cys Gln Ala Trp Gly Asn Pro Leu Pro Glu Leu Lys Cys Leu

420	425	430
-----	-----	-----

Lys Asp Gly Thr Phe Pro Leu Pro Ile Gly Glu Ser Val Thr Val Thr

435	440	445
-----	-----	-----

Arg Asp Leu Glu Gly Thr Tyr Leu Cys Arg Ala Arg Ser Thr Gln Gly

450	455	460
-----	-----	-----

Glu Val Thr Arg Lys Val Thr Val Asn Val Leu Ser Pro Arg Tyr Glu

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Ile Val Ile Ile Thr Val Val Ala Ala Ala Val Ile Met Gly Thr Ala

485	490	495
-----	-----	-----

Gly Leu Ser Thr Tyr Leu Tyr Asn Arg Gln Arg Lys Ile Lys Lys Tyr

500	505	510
-----	-----	-----

Arg Leu Gln Gln Ala Gln Lys Gly Thr Pro Met Lys Pro Asn Thr Gln

515	520	525
-----	-----	-----

Ala Thr Pro Pro

530

<210> 17

<211> 867

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgggccaca cacggaggca ggaaacatca ccatccaagt gtccataacct caatttcttt	60
--	----

cagctttgg tgcggctgg tcttcgtcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
---	-----

gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcgtgt ggtcacaatg ttctgttg agagctggca	180
---	-----

caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgtat gtctgggac	240
---	-----

atgaatatat gcccgagta caagaaccgg accatcttg atatcactaa taacctctcc	300
---	-----

attgtgatcc tggctctgctgccc acatctgac gagggcacat acgagtggtgt tggtctgaag	360
---	-----

tatgaaaaag acgtttcaa gcggaaacac ctggctgaag tgacgttac agtcaaagct	420
---	-----

gactcccta cacctagtat atctgactt gaaattccaa cttctaataat tagaaggata 480
 atttgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctc cctgggtgga aaatggagaa 540
 gaattaaatg ccatcaacac aacagttcc caagatcctg aaactgagct ctatgcttt 600
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatttaa gagtgaatca gacccatcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcatttcct 720
 gataacctgc tccccatcctg ggccattacc ttaatcttag taaatggaat ttttgtata 780

tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
 agaaggaaa gtgtacgccc tgtataa 867

<210> 18

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys

20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu

35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile

50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp

65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly

100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr

130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile

145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp

180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg

210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro

225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly

245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg

260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val

275 280 285

<210> 19

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> codon-optimized DNA encoding GP-ZEBOV-Mayinga (GenBank Accession

No. ABX75367.1)

<400> 19

atggcgtga caggcattct gcagctcccc agagacagat tcaagccgac ctcccttttc 60

ctctgggtca tcattctgtt tcagcgacc ttctccatcc ctctggcgt gatccacaat 120

agcacccctcc aggtgtccga cgtggacaag ctctgtgcc gggacaagct gtcctccacc 180

aaccagctga gaagcgtggg gctgaatctc gagggcaatg gcgtggccac agacgtgccc 240

tccgccacaa agcgctgggg ctttcggagc ggcgtccctc ctaaagtctgt gaactacgag 300

gcagggaaat gggctgaaaa ttgttacaat ctcgagatca aaaaaccaga tggctctgag 360

tgccctgcctg ccgcaccaga cggcatcagg ggcttccta gatgccgcta tgtgcacaag 420

gtgagtgta caggcccttg tgccggcgat tttgccttc acaaagaggg ggctttttt	480
ctgtacaca ggctcgccag tacagtata taccgaggtt ctacctcgc cgaaggcgtg	540
gtggccttc tgattctgcc ccaggccaag aaggacttct tcagcagcca cccccctgaga	600
gaacccgtga acgccacaga ggaccccagc agcggctact acagcacccac aatcagat	660
caggccacag gcttcggcac caatgagaca gagtacctgt tcgaggtgga caacctgacc	720
tacgtgcagc tgaaagccg gtttaccctt cagttctcc tgcaagctaa cgagacaatc	780
tacacccctcg gcaagcggag caacacaaca ggcaagctca tctggaaagt gaaccccgag	840
atcgatacca ctatagggga gtggccttc tggaaacta agaagaacct cacccggaag	900
atcagatccg aggaactgtc cttcacccgt ggttccaacg ggcaccaagaa catttcagga	960
cagagccccg ccagaacaag cagcgacccc ggcaccaaca ccacaaccga ggaccacaag	1020
atcatggcca gcgagaactc cagcgccatg gtgcagggtcc acagccagg aagagaagcc	1080
gccgtgagcc acctgaccac actggccacc atcagcacca gccccagag cctgaccacc	1140
aagcctggcc ccgacaacag cacacacaac accccctgtt acaagctgga catcagcgag	1200
gccacccagg tggagcagca ccacagacgg accgacaacg acagcacccgc cagcgatacc	1260
ccttctgcca ccacagccgc cggacccct aaggccgaga ataccaacac cagcaagagc	1320
accgacttcc tggatccagc caccaccacc agtccacaga accacagcga aaccggccgc	1380
aacaacaata cccaccacca ggacaccggc gaggaaacgc ccagctctgg caagctggc	1440
ctgattacca acacaatcgc cggcgtggcc ggactgtatca cggcggcag acggaccaga	1500
cggaggcca tctgtaacgc ccagccaaa tgtaatccta atctccacta ttggaccaca	1560
caggacgagg gcgcgtccat cggactggca tggattccctt acttcggacc agccgctgaa	1620
gggatctata tcgagggct catgcataac caggatggc tgatttgtgg tctcggcag	1680
ctggctaattt agacaacaca ggctctccag ctgtttctga gagccacaac agagctgaga	1740
accttcagca ttctcaaccg caaggctatt gacttcgtc tccaacgatg gggaggcaca	1800
tgccacatcc tggggcttga ttgttgtatc gaacctcactg attggacaaa gaacattaca	1860
gataagatcg atcagattt ccatgacttt gtggacaaga ccctgcccga tcagggcgc	1920
aacgataatt ggtggacagg gtggagacag tggattccag cgggattgg cgtgaccggc	1980
gtgattatcg ccgtgatcgc cctgttctgc atctgcaagt tcgtgttctg a	2031

<210> 20

<211> 676

<212> PRT

<213> ZEBOV-Mayinga

<400> 20

Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg

1 5 10 15

Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser

20 25 30

Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val

35 40 45

Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg

50 55 60

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro

65 70 75 80

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val

85 90 95

Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu

100 105 110

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly

115 120 125

Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr

130 135 140

Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe

145 150 155 160

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe

165 170 175

Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp

180 185 190

Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp

195 200 205

Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly

210 215 220

Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr

225 230 235 240

Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu

245 250 255

Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys

260 265 270

Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp

275 280 285

Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu

290 295 300

Glu Leu Ser Phe Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Lys Asn Ile Ser Gly

305 310 315 320

Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr

325 330 335

Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln

340 345 350

Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu

355 360 365

Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Ser Leu Thr Thr Lys Pro Gly Pro

370 375 380

Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu

385 390 395 400

Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr

405 410 415

Ala Ser Asp Thr Pro Ser Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala

420 425 430

Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Thr Asp Phe Leu Asp Pro Ala Thr

435 440 445

Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr

450 455 460

His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly

465 470 475 480

Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly

485	490	495
Arg Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn		
500	505	510
Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly		
515	520	525
Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Ile		
530	535	540
Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln		
545	550	555
Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr		
565	570	575
Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe		
580	585	590
Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys		
595	600	605
Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp		
610	615	620
Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp		
625	630	635
Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile		
645	650	655
Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys		
660	665	670
Lys Phe Val Phe		
675		
<210> 21		
<211> 159		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><223> DNA sequence encoding VV B5R anchor		
<400> 21		

cctaaggcctt ctacacctcc tggcagcagc gccacacctacc acatcatcat cgtggccctg	60
acaattatgg gcgtgatctt cctgatcagc gtgatcgtc tcgtgtgcag ctgcgacaag	120
aacaacgacc agtacaagtt ccacaagctg ctgccctga	159
<210> 22	
<211> 42	
<212> PRT	
<213> Vaccinia Virus	
<400> 22	
Ala Thr Tyr His Ile Ile Ile Val Ala Leu Thr Ile Met Gly Val Ile	
1 5 10 15	
Phe Leu Ile Ser Val Ile Val Leu Val Cys Ser Cys Asp Lys Asn Asn	
20 25 30	
Asp Gln Tyr Lys Phe His Lys Leu Leu Pro	
35 40	
<210> 23	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> promoter sequence	
<400> 23	
aaaaattgaa attttatTTT ttTTTTgg aatataaata	40
<210> 24	
<211> 234	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> promoter sequence	
<400> 24	
aaaaattgaa attttatTTT ttTTTTgg aatataaata aaaaattgaa aaactattct	60
aatttattgc acggTccggt aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acggTccggt	120
aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acggTccggt aaaaattgaa aaactattct	180
aatttattgc acggTccggt aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acgg	234
<210> 25	

<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> promoter sequence
<400> 25

tccaaaccca cccgctttt atagtaagtt ttcacccat aaataataaa tacaataatt 60
aatttcttgt aaaagttagaa aatatattct aatttattgc acgg 104

<210> 26
<211> 119
<212> DNA
<213> Fowlpox virus
<400> 26

ttaatgtata gaactaattt ataataaaca tagtaaatat gggtaacttc ttaatagcca 60
taatttaaat tgaaaaaaaaa atatcattat aaaacgtaaa cgaacaaaaa acattaatt 119

<210> 27
<211> 227
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> promoter sequence
<400> 27

gttttgaaaa ttttttata ataaatatcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat 60
tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc ggtaaaaatt 120
gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat 180
tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgg 227

<210> 28
<211> 2220
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> codon-optimized DNA sequence encoding NP-EBOV-CdI (GenBank

Accession No. ACI28629.1)

<400> 28
atggaaagca gggcccacaa ggcctggatg acacacacccg ccagcggctt cgagacagac 60
taccacaaga tcctgacagc cggccgtgtct gtgcagcagg gcatcgtcgc gcagcgcgtg 120

atccagggtgc accaggtgac caacctggaa gagatctgcc agctgatcat ccaggccttc	180
gaggccggcg tggacttcca ggaaagcgcc gacagttcc tgctgtatgcgt gtgcctgcac	240
cacgcctacc agggcgacta caagcagttc ctggaaagca acgcccgtgaa gtacctggaa	300
gggcacggct tcagattcga agtgccgaa aaagaaggcg tgaagccgct ggaagaactg	360
ctgcctgccc ccagctccgg caagagcatc agacgcaccc tggccgccat gcccgggaa	420
gagacaaccg aggccaacgc tggccagttc ctgagcttcg ccagcctgtt cctgcctaag	480
ctgggtggc gcgagaaggc ctgcctggaa aaggtgcagc ggcagattca ggtgcacagc	540
gagcaggccc tgatccagta ccctaccgc tgccagagcg tggccacat gatgggtatc	600
ttccggctga tgcggaccaa cttccgtatc aagttctgc tgatccacca gggaatgcac	660
atggtggtg gccacgcacgc caatgacgccc gtgatcgcca atagcgtggc ccaggccaga	720
ttcagccggcc tgctgtatcgt gaaaacagtg ctggaccaca tcctgcagaa aaccgagcac	780
ggcgtgagac tgccaccctt ggcgggacc gccaaagtga agaacgaaatg gaacagcttc	840
aaggccgccc tgtcttagct ggcccagcac ggcgagtacg ccccttcgc ccggctgctg	900
aacctgagcg gcgtgaacaa tctggAACAC ggactgttcc cccagcttag cgccattgcc	960
ctgggagtgg ccacagcccc caagcttaca ctggccggcg tgaacgtggg cgagcgtac	1020
cagcagctga gagaggccgc cacagaggcc gagaaggcgc tgccagaatgta cgccgagac	1080
cgggagctgg atcacctggg cctggacgac caggaaaaga agatcctgaa ggacttccac	1140
cagaagaaga acgagatcag cttccagcag accacccgc tgggtgaccct gcgaaagag	1200
cggtggcca agctgaccga gcccattacc tccaccagcc tgctgaaaac cgcaagcag	1260
tacgacgacg acaatgacat ccccttcct ggcccataca acgacaacga gaactccgag	1320
cagcaggacg atgacccac cgtatagccag gataccacca tccccacat catgtggac	1380
cccgacgacg gcccgtacaa caactacggc gactacccca gcgagacagc caatgcccc	1440
gaggacctgg tgcgtttcga cctggaaatg ggccgacgagg acgaccacag acccagcagc	1500
tccagcggaa acaacaacaa gcacagcctg accggcaccg acagcaacaa gaccagcaac	1560
tggaaaccgga accccaccaa catggccaaag aaggacagca cccagaacaa cgacaacccc	1620
gcccagagag cccaggaata cgccgggac aacatccagg acaccctac ccctcacaga	1680
gccctgaccc ccatcagcga ggaaaccggc tccaaacggcc acaacgagga cgatatcgac	1740
agcatcccccc cccatggaaatc cgacgaggaa aacaacacgg aaaccacccat caccaccaca	1800
aagaacacca ccggccctcc cgccctgtt taccggatca acagcggaa agagccctg	1860
cctcaggaaa agagccagaa acagccaaat caggtgtccg gcagcggaa taccgacaac	1920
aagccccaca gcaacagag cgtggaggaa atgtaccggc acattctgca gaccggc	1980

cccttcgacg ccatcctgta ctactacatg atgacagagg aaccatcggtt ctcggcacc	2040		
tccgacggca aagaatacgt gtaccccgac agcctggaag gcgagcaccc tccctggctg	2100		
agcgaaaaag aggccctgaa cgaggacaac cggttcatca ccatggacga tcagcagttc	2160		
tactggcccg tcatggacca ccggacaaag ttcatggcca tcctgcagca ccacaagtga	2220		
<210> 29			
<211> 739			
<212> PRT			
<213> EBOV-CdI			
<400> 29			
Met Glu Ser Arg Ala His Lys Ala Trp Met Thr His Thr Ala Ser Gly			
1	5	10	15
Phe Glu Thr Asp Tyr His Lys Ile Leu Thr Ala Gly Leu Ser Val Gln			
20	25	30	
Gln Gly Ile Val Arg Gln Arg Val Ile Gln Val His Gln Val Thr Asn			
35	40	45	
Leu Glu Glu Ile Cys Gln Leu Ile Ile Gln Ala Phe Glu Ala Gly Val			
50	55	60	
Asp Phe Gln Glu Ser Ala Asp Ser Phe Leu Leu Met Leu Cys Leu His			
65	70	75	80
His Ala Tyr Gln Gly Asp Tyr Lys Gln Phe Leu Glu Ser Asn Ala Val			
85	90	95	
Lys Tyr Leu Glu Gly His Gly Phe Arg Phe Glu Val Arg Lys Lys Glu			
100	105	110	
Gly Val Lys Arg Leu Glu Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ser Ser Gly Lys			
115	120	125	
Ser Ile Arg Arg Thr Leu Ala Ala Met Pro Glu Glu Glu Thr Thr Glu			
130	135	140	
Ala Asn Ala Gly Gln Phe Leu Ser Phe Ala Ser Leu Phe Leu Pro Lys			
145	150	155	160
Leu Val Val Gly Glu Lys Ala Cys Leu Glu Lys Val Gln Arg Gln Ile			
165	170	175	

Gln Val His Ser Glu Gln Gly Leu Ile Gln Tyr Pro Thr Ala Trp Gln
 180 185 190
 Ser Val Gly His Met Met Val Ile Phe Arg Leu Met Arg Thr Asn Phe
 195 200 205
 Leu Ile Lys Phe Leu Leu Ile His Gln Gly Met His Met Val Ala Gly
 210 215 220
 His Asp Ala Asn Asp Ala Val Ile Ala Asn Ser Val Ala Gln Ala Arg
 225 230 235 240
 Phe Ser Gly Leu Leu Ile Val Lys Thr Val Leu Asp His Ile Leu Gln
 245 250 255
 Lys Thr Glu His Gly Val Arg Leu His Pro Leu Ala Arg Thr Ala Lys
 260 265 270
 Val Lys Asn Glu Val Asn Ser Phe Lys Ala Ala Leu Ser Ser Leu Ala
 275 280 285
 Gln His Gly Glu Tyr Ala Pro Phe Ala Arg Leu Leu Asn Leu Ser Gly
 290 295 300
 Val Asn Asn Leu Glu His Gly Leu Phe Pro Gln Leu Ser Ala Ile Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Val Ala Thr Ala His Gly Ser Thr Leu Ala Gly Val Asn Val
 325 330 335
 Gly Glu Gln Tyr Gln Gln Leu Arg Glu Ala Ala Thr Glu Ala Glu Lys
 340 345 350
 Gln Leu Gln Lys Tyr Ala Glu Ser Arg Glu Leu Asp His Leu Gly Leu
 355 360 365
 Asp Asp Gln Glu Lys Lys Ile Leu Lys Asp Phe His Gln Lys Lys Asn
 370 375 380
 Glu Ile Ser Phe Gln Gln Thr Thr Ala Met Val Thr Leu Arg Lys Glu
 385 390 395 400
 Arg Leu Ala Lys Leu Thr Glu Ala Ile Thr Ser Thr Ser Leu Leu Lys
 405 410 415
 Thr Gly Lys Gln Tyr Asp Asp Asn Asp Ile Pro Phe Pro Gly Pro

420	425	430
Ile Asn Asp Asn Glu Asn Ser Glu Gln Gln Asp Asp Asp Pro Thr Asp		
435	440	445
Ser Gln Asp Thr Thr Ile Pro Asp Ile Ile Val Asp Pro Asp Asp Gly		
450	455	460
Arg Tyr Asn Asn Tyr Gly Asp Tyr Pro Ser Glu Thr Ala Asn Ala Pro		
465	470	475
Glu Asp Leu Val Leu Phe Asp Leu Glu Asp Gly Asp Glu Asp Asp His		
485	490	495
Arg Pro Ser Ser Ser Glu Asn Asn Lys His Ser Leu Thr Gly		
500	505	510
Thr Asp Ser Asn Lys Thr Ser Asn Trp Asn Arg Asn Pro Thr Asn Met		
515	520	525
Pro Lys Lys Asp Ser Thr Gln Asn Asn Asp Asn Pro Ala Gln Arg Ala		
530	535	540
Gln Glu Tyr Ala Arg Asp Asn Ile Gln Asp Thr Pro Thr Pro His Arg		
545	550	555
Ala Leu Thr Pro Ile Ser Glu Glu Thr Gly Ser Asn Gly His Asn Glu		
565	570	575
Asp Asp Ile Asp Ser Ile Pro Pro Leu Glu Ser Asp Glu Glu Asn Asn		
580	585	590
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Thr Lys Asn Thr Thr Ala Pro Pro Ala		
595	600	605
Pro Val Tyr Arg Ser Asn Ser Glu Lys Glu Pro Leu Pro Gln Glu Lys		
610	615	620
Ser Gln Lys Gln Pro Asn Gln Val Ser Gly Ser Glu Asn Thr Asp Asn		
625	630	635
Lys Pro His Ser Glu Gln Ser Val Glu Glu Met Tyr Arg His Ile Leu		
645	650	655
Gln Thr Gln Gly Pro Phe Asp Ala Ile Leu Tyr Tyr Tyr Met Met Thr		
660	665	670

Glu Glu Pro Ile Val Phe Ser Thr Ser Asp Gly Lys Glu Tyr Val Tyr

675 680 685

Pro Asp Ser Leu Glu Gly Glu His Pro Pro Trp Leu Ser Glu Lys Glu

690 695 700

Ala Leu Asn Glu Asp Asn Arg Phe Ile Thr Met Asp Asp Gln Gln Phe

705 710 715 720

Tyr Trp Pro Val Met Asn His Arg Asn Lys Phe Met Ala Ile Leu Gln

725 730 735

His His Lys

<210> 30

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Codon optimized DNA sequence encoding GP-SEBOV-Gulu (GenBank

Accession No. AAU43887.1)

<400> 30

atggcggcc ttagcctgct gcagctgcc cggacaagt tccggaagtc cagtttttc	60
gtgtggtga tcatcctgtt ccagaaagcc ttcatcgatgc ccctggcgt ggtgaccaac	120
agcacccctgg aagtgaccga gatcgaccag ctggtgtgca aggaccacct ggccagcacc	180
gatcagctga agtccgtggg cctgaacctg gaaggcagcg gcgtgagcac cgacatcccc	240
agcgcacca agagatgggg cttcagatcc ggcgtgcccc ccaaggtgg gtcttatgag	300

gccggcgagt gggccgagaa ctgctacaac ctggaaatca agaagcccga cggcagcggag	360
tgtctgcctc cccctcccgta tgccgtgaga ggctcccccc ggtgcagata cgtgcacaag	420
gcacaaggca ccggtccatg cccaggcgcac tacgccttcc acaaggacgg cgccttttc	480
ctgtacgacc ggctggctc caccgtgatc taccggggcg tgaactttgc cgagggcgtg	540
atcgccctcc tgatectggc caagccaaa gagacattcc tgcagagccc ccccatccgg	600
gaggccgtga actacaccga gaacaccaggc agctactacg ccacccctcta cctggaatac	660
gagatcgaga acttcggcgc ccagcacacgc accaccctgt tcaagatcga caacaacacc	720

ttcggtcgcc tggacagacc ccacaccccc cagttctgt tccagctgaa cgacaccatc	780
catctgcatac agcagctgta caacaccacc ggcagactga tctggaccct ggacgccaac	840

atcaacgccc acatcggtga atggcttt tgggagaaca agaagaatct gagcagcag	900
ctgcggggcg aagaactcgat cttcgaggcc ctgaggctga acgagacaga ggacgacgac	960
gccgccagca gccggatcac caagggccgg atcagcgacc gggccaccag aaagtacagc	1020
gaccttggtgc ccaagaacag ccccgcatg gtgccttgtc acatccccga gggcgagaca	1080
acttcctcta gtcagaatag caccgagggc agacgggtgg gcgtgaacac ccaggaaacc	1140

atcaccgaga cagccgccac catcatttgt actaacggca accacatgca gatcagcacc	1200
atcggcatcc gcccagcag cagccagatc ccaagttagta gtcctaccac agcccttagc	1260
cctgaggccc agaccctac cacacacacc agcggcccta gcgtgatggc caccgagaa	1320
cctaccaccc ctcttggcag cagcccaggta ccaactacccg aggacccaac cctgaccacc	1380
cccgagaaca tcaccaccgc cgtaaaacc gtgctgcccc agggaaagcac cagcaacggc	1440
ctgtatccca gcaccgtgac cggcatcctg ggcagcctgg gcctgiggaa gggagcaga	1500
cgccagacca acaccaaggc caccggcaag tgcaacccca acctgcacta ctggaccgcc	1560

caggaacagc acaacgccc tggatcgcc tggatcccactttggtgcttcccttggatcgatc	1620
ggaatataca ccgagggct gatgcacaac cagaacgccc tggatcgatc tggatcgatc	1680
ctggccaacg aaaccactca ggcactgcag ctgttctgc gggccaccac cgagctgcgg	1740
acctacacca tcctgaacag gaaggccatc gactttctgc tgccggatg gggccggacc	1800
tgttagaatcc tggcccccga ctgctgcatac gagccccacg actggaccaa gaatatcacc	1860
gacaagatca accagatcat ccacgacttc atcgacaacc ccctgccaa ccaggacaac	1920
gacgacaact ggtggactgg ttggcgacag tggatccctg cggcatcgatc catcaccggc	1980

atcatcattgc cattatcgcttcctctgc gtgtgcaagcttccttgctga	2031
--	------

<210> 31

<211> 676

<212> PRT

<213> SEBOV-Gulu

<400> 31

Met Gly Gly Leu Ser Leu Leu Gln Leu Pro Arg Asp Lys Phe Arg Lys

1 5 10 15

Ser Ser Phe Phe Val Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe Ser

20 25 30

Met Pro Leu Gly Val Val Thr Asn Ser Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile

35 40 45

Asp Gln Leu Val Cys Lys Asp His Leu Ala Ser Thr Asp Gln Leu Lys
 50 55 60
 Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser Thr Asp Ile Pro
 65 70 75 80
 Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
 85 90 95
 Val Ser Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Pro Pro Asp Gly
 115 120 125
 Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Ala Gln Gly Thr
 130 135 140
 Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe His Lys Asp Gly Ala Phe Phe
 145 150 155 160
 Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Val Asn Phe
 165 170 175

Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro Lys Glu Thr
 180 185 190
 Phe Leu Gln Ser Pro Pro Ile Arg Glu Ala Val Asn Tyr Thr Glu Asn
 195 200 205
 Thr Ser Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn
 210 215 220
 Phe Gly Ala Gln His Ser Thr Thr Leu Phe Lys Ile Asp Asn Asn Thr
 225 230 235 240

Phe Val Arg Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Asp Thr Ile His Leu His Gln Gln Leu Ser Asn Thr Thr Gly Arg
 260 265 270
 Leu Ile Trp Thr Leu Asp Ala Asn Ile Asn Ala Asp Ile Gly Glu Trp
 275 280 285
 Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Leu Ser Glu Gln Leu Arg Gly Glu

290	295	300
Glu Leu Ser Phe Glu Ala Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asp Asp Asp		
305	310	315
Ala Ala Ser Ser Arg Ile Thr Lys Gly Arg Ile Ser Asp Arg Ala Thr		
325	330	335
Arg Lys Tyr Ser Asp Leu Val Pro Lys Asn Ser Pro Gly Met Val Pro		
340	345	350
Leu His Ile Pro Glu Gly Glu Thr Thr Leu Pro Ser Gln Asn Ser Thr		
355	360	365
Glu Gly Arg Arg Val Gly Val Asn Thr Gln Glu Thr Ile Thr Glu Thr		
370	375	380
Ala Ala Thr Ile Ile Gly Thr Asn Gly Asn His Met Gln Ile Ser Thr		
385	390	395
Ile Gly Ile Arg Pro Ser Ser Gln Ile Pro Ser Ser Pro Thr		
405	410	415
Thr Ala Pro Ser Pro Glu Ala Gln Thr Pro Thr Thr His Thr Ser Gly		
420	425	430
Pro Ser Val Met Ala Thr Glu Glu Pro Thr Thr Pro Pro Gly Ser Ser		
435	440	445
Pro Gly Pro Thr Thr Glu Ala Pro Thr Leu Thr Thr Pro Glu Asn Ile		
450	455	460
Thr Thr Ala Val Lys Thr Val Leu Pro Gln Glu Ser Thr Ser Asn Gly		
465	470	475
Leu Ile Thr Ser Thr Val Thr Gly Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg		
485	490	495
Lys Arg Ser Arg Arg Gln Thr Asn Thr Lys Ala Thr Gly Lys Cys Asn		
500	505	510
Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Ala Gln Glu Gln His Asn Ala Ala Gly		
515	520	525
Ile Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Glu Pro Gly Ala Glu Gly Ile Tyr Thr		
530	535	540

Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asn Ala Leu Val Cys Gly Leu Arg Gln
 545 550 555 560

Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr
 565 570 575

Thr Glu Leu Arg Thr Tyr Thr Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
 580 585 590

Leu Leu Arg Arg Trp Gly Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Asp Cys
 595 600 605

Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asn
 610 615 620

Gln Ile Ile His Asp Phe Ile Asp Asn Pro Leu Pro Asn Gln Asp Asn
 625 630 635 640

Asp Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile
 645 650 655

Gly Ile Thr Gly Ile Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu Cys Val Cys
 660 665 670

Lys Leu Leu Cys

675

<210> 32

<211> 187

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> promoter sequence

<400> 32

gttttggaaa ttttttata ataaatatcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	60
tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc ggtaaaaatt	120
gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	180
tgcacgg	187

<210> 33

<211> 984

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> codon-optimized VP40 sequence

<400> 33

atgcggcgcg tgatcctgcc caccggccct ccagagtaca tggaagccat ctacccgtg 60

cgaggcaaca gcacaatcgc cagaggcggc aacagcaata ccggcttcct gaccccccag 120

agcgtgaacg ggcacacccc cagcaacccc ctgaggcccta tcggccacga caccatcgac 180

cacggccagcc acacccctgg cagcgtgtcc agcgccttca tcctggaagc catggtaac 240

gtgatcagcg gccccaaagggt gctgatgaag cagatccccca tctggctgcc cctggcggt 300

gccgaccaga aaacctacag cttcgacagc accaccggcg ccatcatgct ggccagctac 360

accatcaccc acttcggcaa ggccaccaac cccctggtgc gcgtgaacag actggccct 420

ggcatccccg accacccctt gagactgctg cggatcggca accaggcctt cctgcaggaa 480

ttcggtgtgc ccccggtgca gctgccccag tactcacct tcgacctgac cgccctgaag 540

ctgatcaccc agcctctgcc tgccgccacc tggaccgatg ataccccccac aggcagcaac 600

ggcggccctga ggccggcat cagcttccac cccaagctga ggcccatctt gctggccaaac 660

aagagcggca agaaggcua cagcggcagc ctgacccc cccagaagat ccaggccatc 720

atgaccagcc tgcaggactt caagatcgtc cccatcgacc ccaccaagaa catcatggc 780

atcgagggtgc ccgagacact ggtgcacaag ctgaccggca agaaagtgc cagcaagaac 840

ggccagccca tcatccctgt gctgctgcct aagtacatcg gcctggaccc cgtggccct 900

ggcggccctga ccatggtgat cacacaggac tgcgataacct gccacagccc cgccagcctg 960

cccgccgtga ttgagaagta atag 984

<210> 34

<211> 326

<212> PRT

<213> ZEBOV-Mayinga

<400> 34

Met Arg Arg Val Ile Leu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Tyr Met Glu Ala

1 5 10 15

Ile Tyr Pro Val Arg Ser Asn Ser Thr Ile Ala Arg Gly Gly Asn Ser

20 25 30

Asn Thr Gly Phe Leu Thr Pro Glu Ser Val Asn Gly Asp Thr Pro Ser

35 40 45

Asn Pro Leu Arg Pro Ile Ala Asp Asp Thr Ile Asp His Ala Ser His

50	55	60
Thr Pro Gly Ser Val Ser Ser Ala Phe Ile Leu Glu Ala Met Val Asn		
65	70	75
Val Ile Ser Gly Pro Lys Val Leu Met Lys Gln Ile Pro Ile Trp Leu		
85	90	95
Pro Leu Gly Val Ala Asp Gln Lys Thr Tyr Ser Phe Asp Ser Thr Thr		
100	105	110
Ala Ala Ile Met Leu Ala Ser Tyr Thr Ile Thr His Phe Gly Lys Ala		
115	120	125
Thr Asn Pro Leu Val Arg Val Asn Arg Leu Gly Pro Gly Ile Pro Asp		
130	135	140
His Pro Leu Arg Leu Leu Arg Ile Gly Asn Gln Ala Phe Leu Gln Glu		
145	150	155
Phe Val Leu Pro Pro Val Gln Leu Pro Gln Tyr Phe Thr Phe Asp Leu		
165	170	175
Thr Ala Leu Lys Leu Ile Thr Gln Pro Leu Pro Ala Ala Thr Trp Thr		
180	185	190
Asp Asp Thr Pro Thr Gly Ser Asn Gly Ala Leu Arg Pro Gly Ile Ser		
195	200	205
Phe His Pro Lys Leu Arg Pro Ile Leu Leu Pro Asn Lys Ser Gly Lys		
210	215	220
Lys Gly Asn Ser Ala Asp Leu Thr Ser Pro Glu Lys Ile Gln Ala Ile		
225	230	235
Met Thr Ser Leu Gln Asp Phe Lys Ile Val Pro Ile Asp Pro Thr Lys		
245	250	255
Asn Ile Met Gly Ile Glu Val Pro Glu Thr Leu Val His Lys Leu Thr		
260	265	270
Gly Lys Lys Val Thr Ser Lys Asn Gly Gln Pro Ile Ile Pro Val Leu		
275	280	285
Leu Pro Lys Tyr Ile Gly Leu Asp Pro Val Ala Pro Gly Asp Leu Thr		
290	295	300

Met Val Ile Thr Gln Asp Cys Asp Thr Cys His Ser Pro Ala Ser Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Val Ile Glu Lys
 325

<210> 35
 <211> 124
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> promoter sequence
 <400> 35

taaaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agtattgctc ttgtgactag	60
agacttttgt taaggtaactg taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt	120

agta	124
------	-----

<210> 36
 <211> 2046
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> codon-optimized DNA sequence GP-MARV-Angola
 <400> 36

atgaagacga cctgcctgct gatctcgctg attctgattc agggagtgaa aacccttccc	60
attctcgaga ttgcctctaa tatccagcca caaaaatgtcg acagtgtgtg ttccggAAC	120
ctccagaaga cagaggatgt tcacctcatg ggattcactc tgtctggaca gaaagtgcga	180
gactctcctc tcgaggctag caaaaagatgg gctttccggg caggtgtccc accaaaaaac	240

gtcgagtata ctgaaggcga agaagctaag acttgttata acatttcgtt caccgatccc	300
agtggaaaat ccctccttct ggatccacca actaacattha gggattaccc gaaatgtaa	360
acaattcatc acattcaagg acagaaccct catgccaaag ggattgcctt ccatctctgg	420
ggtgcattct ttctgtacga caggatcgca tctacaacaa tgtatagagg caaagtcttc	480
acggaaggga acatagctgc tatgatagtt aacaaaacag ttcacaaaat gatttcagt	540
cggcaaggc agggataccg ccatatgaat ttgacctcga ctaacaaata ctggacatcc	600
tcgaacggaa cccaaacaaa cgatactggc tgttcggga cactccagga gtacaactct	660

acaaagaacc aaacgtgcgc tccctctaag aagccactgc ctttccac cgccccccctt	720
gaagtgaagc tcacatctac cagcacagat gccactaagc tcaacacgac agaccctaat	780

tctgatgacg aggatctcac cacatccggc tccgggagcg gcgagcaaga accctacacc 840
 acatctgacg cagccacaaa gcaaggcgtg tccagacta tgccacctac tcctagccca 900
 caaccaggta cacctaaca gggagggAAC aatacaaATC attctcaggc cgtggtcaca 960
 gagccggca agaccaacac aactgcttag ccttctatgc ctctcacaa taccacaacg 1020
 attcgacga ataacacgag caaacacaat ctgagcacac ccagcgtgcc catccagaac 1080

gccacaaatt acaatacaca gtctacagct ccagagaatg aacagacatc cgctcccagc 1140
 aagaccacgc tgctgcctac cgagaatcca acaaccgcta aatccaccaa tagcacaag 1200
 tctcccacca ccaccgtgcc taacaccaca aacaagtaca gcacctctcc cagccctaca 1260
 cctaactcca ccgtcagca tctcgttat ttgcgcga agagaacat cctctggaga 1320
 gaggagata tgttccatt tctcgacggg ctcatatgc cgccatcgat tttgatccg 1380
 gttcgaaca caaagacat ctttgatgag tctagctta gcggagcctc agcagaggaa 1440
 gaccaacatg ctatcctaa tattccctc accctgtcct atttccctaa agtgaatgaa 1500

aataccgctc actctggaga aaacgaaaat gactgtgacg ctgaactccg gatttgtcc 1560
 gttcaggagg atgatctcgc cgccggactc tcttgattc cttctttgg accagggatc 1620
 gaaggactgt atacagctgg actcatcaaa aatcagaaca atctcgatg tcggctcagg 1680
 cggctcgcta accaaactgc caaaaggctt gagctccctc tgccggatc cacagaggaa 1740
 agaacattt ctctgattaa tcgcccacgt atagacttgc ttctcgatcg gtggggtgga 1800
 acctgcaaag tcctcgacc tgattgtgt atcgaaattg aagatctgtc gcggaaatgc 1860
 tccgagcaa tcgatcagat taagaaagat gagcaaaagg aaggtacagg gtggggattg 1920

ggtgaaaaat ggtggacttc cgattgggt gtcctacta atctcggtat ctcctctg 1980
 ctctccattg ccgtcctgtat cgctctgtca tgtatttgc gaatctttac aaagtatatt 2040
 gggtga 2046

<210> 37

<211> 681

<212> PRT

<213> MARV-Angola

<400> 37

Met Lys Thr Thr Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Val

1 5 10 15

Lys Thr Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn Ile Gln Pro Gln Asn

20 25 30

Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His

35 40 45

Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu

50 55 60

Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Ala Gly Val Pro Pro Lys Asn

65 70 75 80

Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser

85 90 95

Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn

100 105 110

Ile Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln

115 120 125

Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe

130 135 140

Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe

145 150 155 160

Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys

165 170 175

Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr

180 185 190

Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp

195 200 205

Thr Gly Cys Phe Gly Thr Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln

210 215 220

Thr Cys Ala Pro Ser Lys Lys Pro Leu Pro Leu Pro Thr Ala His Pro

225 230 235 240

Glu Val Lys Leu Thr Ser Thr Ser Thr Asp Ala Thr Lys Leu Asn Thr

245 250 255

Thr Asp Pro Asn Ser Asp Asp Glu Asp Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gly

260 265 270

Ser Gly Glu Gln Glu Pro Tyr Thr Thr Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln

275

280

285

Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Pro Ser Pro Gln Pro Ser Thr

290

295

300

Pro Gln Gln Gly Gly Asn Asn Thr Asn His Ser Gln Gly Val Val Thr

305 310 315 320

Glu Pro Gly Lys Thr Asn Thr Ala Gln Pro Ser Met Pro Pro His

325

330

335

Asn Thr Thr Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Ser

340

345

350

Thr Pro Ser Val Pro Ile Gln Asn Ala Thr Asn Tyr Asn Thr Gln Ser

355

360

365

Thr Ala Pro Glu Asn Glu Gln Thr Ser Ala Pro Ser Lys Thr Thr Leu

370

375

380

Leu Pro Thr Glu Asn Pro Thr Thr Ala Lys Ser Thr Asn Ser Thr Lys

385 390 395 400

Ser Pro Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Asn Lys Tyr Ser Thr Ser

405

410

415

Pro Ser Pro Thr Pro Asn Ser Thr Ala Gln His Leu Val Tyr Phe Arg

420

425

430

Arg Lys Arg Asn Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu

435

440

445

Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr

450

455

460

Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu

465 470 475 480

Asp Gln His Ala Ser Pro Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Phe Pro

485

490

495

Lys Val Asn Glu Asn Thr Ala His Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys

500

505

510

Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala

515

520

525

Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr

530 535 540

Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg

545 550 555 560

Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val

565 570 575

Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp

580 585 590

Phe Leu Leu Ala Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp

595 600 605

Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Arg Asn Ile Ser Glu Gln Ile

610 615 620

Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu

625 630 635 640

Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly

645 650 655

Ile Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile

660 665 670

Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly

675 680