



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126848** (13) **C2**
(51) МПК (2023.01)**A61K 39/12** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)**A61P 31/14** (2006.01)**A61P 37/02** (2006.01)**C12N 15/86** (2006.01)**C12N 7/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2017 02987**
(22) Дата подання заявки: **03.09.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **16.02.2023**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/045,538, 62/055,154**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **03.09.2014, 25.09.2014**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.06.2017, Бюл.№ 11**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **15.02.2023, Бюл.№ 7**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2015/070161, 03.09.2015**

(72) Винахідник(и):
Фолькманн Аріане (DE), Штайгервальд Робін (DE), Гохрайн Губертус (DE), Дирмаєр Ульрике (DE), Лаутербах Генінг (DE), Гаусманн Юрген (DE)
(73) Володілець (володільці):
БАВАРІАН НОРДІК А/С, Hejreskovvej 10 A, 3490 Kvistgaard, Denmark (DK)
(74) Представник:
Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2016030551 A1, 04.02.2016
WO 2014037124 A1, 13.03.2014
Henning Lauterbach et al: "Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity", Frontiers in Immunology, 01.01.2013, vol. 4, art. 25, P. 1-16
Rimmelzwaan G F et al: "Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara", Expert review of Vaccines, Future Drugs, London, GB, 01.01.2009, vol. 8, no. 4, P. 447-454
Michael C Keefer et al: "A phase I trial of preventive HIV vaccination with heterologous poxviral-vectors containing matching HIV-1 inserts in healthy HIV-uninfected subjects", Vaccine, Elsevier LTD, GB, 20.12.2010, vol. 29, no. 10, P. 1948-1958
Claire L Hutchings et al: "Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge", Infection and immunity, American society for Microbiology, US, 01.12.2007, vol. 75, no. 12, P. 5819- 5826

UA 126848 C2

(54) ФІЛОВІРУСНА ВАКЦИНА НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО МОДИФІКОВАНОГО ВІРУСУ ВІСПОВАКЦИНИ АНКАРА (MVA)

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування рекомбінантного вектора на основі модифікованого вірусу вісповакцини (MVA), що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує глікопротеїн оболонки (GP) вірусу Марбург (MARV), для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики викликаного MARV захворювання, причому рекомбінантний вектор MVA містить нуклеїнові кислоти, яка кодують імуногенний білок глікопротеїну оболонки MARV, імуногенний білок глікопротеїну оболонки Zaire Ebola virus (ZEBOV), імуногенний білок глікопротеїну оболонки Sudan Ebola virus (SEBOV) та імуногенний білок нуклеопротеїну Cote d'Ivoire Ebola virus (EBOV-CdI).

ОБЛАСТЬ ВИНАХОДУ

Цей винахід пов'язаний з удосконаленою філовірусною вакциною, яка містить вакцину на основі рекомбінантного модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA основі) проти філовірусної хвороби, і продуктами, способами та застосуваннями, які мають до неї відношення. Зокрема, цей винахід пов'язаний з генетично-спроєктованими (рекомбінантними) векторами MVA, які містять гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка. Цей винахід також пов'язаний із способами вакцинації, зокрема, гомологічними і гетерологічними примуючими-бустуючими режимами вакцинації, із застосуванням двох вірусних векторних композицій. Більш детально, винахід пов'язаний з рекомбінантним MVA для використання в гомологічному примуючому-бустуючому режимі вакцинації, і/або рекомбінантним MVA і рекомбінантним вірусом віспи курей (FPV), для використання в гетерологічному примуючому-бустуючому режимі вакцинації. Винахід також пов'язаний із продуктами, способами та їх застосуваннями, наприклад такими, що придатні для виклику захисної імунної відповіді у суб'єкта.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Філовіруси є вкритими оболонкою, несеgmentованими вірусами з мінус-ланцюгом РНК із сімейства вірусів Filoviridae. На сьогоднішній день були виявлені два члени цього сімейства вірусів: вірус Марбург (MARV) і вірус Ебола (EBOV). Філовіруси є надзвичайно вірулентними, легко передаються від людини до людини, надзвичайно смертоносні, викликають сильну геморагічну лихоманку у людей і нижчих приматів. Рівень смертності від філовірусних інфекцій серед людей варіює від 23 % до 90 %. Незважаючи на їх заразність і летальність, втім, не існує офіційно схваленого лікування або профілактичної вакцини.

Під час спалахів хвороб, ізоляції хворих, застосування захисного одягу та дезінфікуючих процедур (які в сукупності називають ізоляційними запобіжними заходами або бар'єрними методами захисту персоналу від вірусної геморагічної лихоманки (ВГЛ)) було достатньо, щоб припинити подальшу передачу вірусу Марбург або вірусу Ебола, і таким чином проконтролювати і припинити спалах хвороби. Так як не існує жодного відомого ефективного лікування геморагічних лихоманок, які викликані філовірусами, запобігання передачі, застосовуючи ВГЛ ізоляційні запобіжні заходи, на даний час є єдиним доступним засобом для контролю епідемій філовірусів.

Перший філовірус був розпізнаний в 1967 році після того, як у деякого числа лабораторних працівників у Німеччині та Югославії, які працювали з тканинами африканських зелених мавп, розвинулася важка геморагічна лихоманка. В цілому з цими спалахами хвороб було пов'язано сім смертей та 31 випадок зараження. Вірус був названий вірусом Марбург (MARV) у відповідності з містом Марбург, Німеччина, місцем одного зі спалахів хвороби. Після перших спалахів хвороби, вірус зник і не з'являвся аж до 1975 року, коли мандрівник, швидше за все інфікований в Зімбабве, захворів в Йоганнесбурзі, Південна Африка; супутник мандрівника і медсестра також були заражені. З того часу були ідентифіковані декілька спорадичних випадків геморагічної лихоманки Марбург (ДЛМ), але хвороба залишається відносно рідкісною.

Другий філовірус, вірус Ебола (EBOV), був вперше виявлений в 1976 році, коли два спалахи геморагічної лихоманки Ебола (ГЛЭ) відбулися у Північному Заїрі (нині Демократична Республіка Конго) та Південному Судані. В ці спалахи хвороб були залучені віруси, які в кінцевому підсумку виявилися двома різними видами вірусу Ебола, і які були названі в честь країн, в яких вони були виявлені. Було доведено, що обидва віруси є надзвичайно смертельними, так як 90 % випадків в Заїрі і 50 % випадків у Судані призвели до смерті заражених. Починаючи з 1976, вірус Ебола спорадично виникав в Африці, разом з кількома дрібними і середніми спалахами хвороб, підтвердженими в 1976-1979 роках, і знову в Габоні в 1994-1996 роках. Великі епідемії ГЛ Еболи траплялися в Кіквіте, Заїр, в 1995 році, і в Гулу, Уганда, в 2000 році.

Виявляється, що філовіруси передаються людині у процесі життєдіяльності однієї або більше тварин, які не відносяться до людини. Незважаючи на численні спроби виявити природне джерело або джерела вірусів Ебола і Марбург, їх походження залишається загадковим. Отже, залишається незрозумілим, як саме вірус передається з природного(их) джерела(ел) людям. Після того як людина була інфікована, подальше зараження відбувається шляхом передачі від людини до людини. Зокрема, передача передбачає тісний особистий контакт між інфікованою людиною або її біологічними рідинами та іншою людиною. Під час зафіксованих спалахів геморагічної лихоманки, які були викликані філовірусною інфекцією, люди, які дбали про інфікованих (тобто ті, які годували, мили, лікували) або дуже тісно працювали з інфікованими, піддавалися значному ризику зараження. Нозокоміальна (лікарняна) передача через контакт з інфікованими рідинами організму (тобто, через повторне

використання нестерилізованих шприців, голок та іншого медичного устаткування, забрудненого такими рідинами) також є важливим чинником у поширенні хвороби. Мінімізація тісного контакту між неінфікованими та інфікованими пацієнтами, як правило, скорочує кількість нових заражень людей під час епідемії. Хоча філовіруси виявили деякі здатності до зараження через малі частинки аерозолів в лабораторії, повітряно-крапельне поширення серед людей не було чітко продемонстровано.

До теперішнього часу було виявлено п'ять штамів вірусу Ебола, і вони були названі на честь місць їх першої появи: Bundibugyo (BEBOV), Cote d'Ivoire (EBOV-CdI, також позначений як Tai Forest virus або TAFV), Reston (EBOV-Reston), Sudan (SEBOV), і Zaire (ZEBOV); штами Zaire, Sudan і Bundibugyo, як правило, пов'язані з захворюваністю і смертністю людей. Ebola-Reston є єдиним відомим філовірусом, який не викликає важкого захворювання у людей, хоча він може бути смертельним для мавп. До теперішнього часу було ідентифіковано кілька штамів вірусу Марбург, разом з штамом Musoke, який має найвищий показник смертності. Див. Фіг. 1.

У структурному плані, віріони філовірусів можуть зустрічатися в декількох формах, у тому числі довгих, іноді розгалужених волокон, а також коротких волокон, у формі цифри "6", у формі літери "U", або у формі кола. Вірусні волокна можуть досягати 14 мікрометрів (мкм) в довжину, мають рівномірний діаметр, який складає 80 нанометрів (нм), і упаковані в ліпідну мембрану. Кожен віріон містить одну молекулу одноланцюгової антисмислової РНК, довжина якої становить близько 19 тисяч пар основ (кБ), і яка містить сім генів, які послідовно розташовані в такому порядку: ген нуклеопротеїну (NP), ген білка 35 віріона (VP35), ген білка 40 віріона (VP40), ген глікопротеїну оболонки (GP), ген білка 30 віріона (VP30), ген білка 24 віріона (VP24), і ген РНК-залежної РНК-полімерази (L). При вході в цитоплазму клітини-господаря, РНК транскрибується для створення поліаденільованих, субгеномних видів мРНК, які кодують білки. Транскрипція і трансляція призводять до синтезу семи структурних поліпептидів, з передбачуваними однаковими функціями для кожного з різних філовірусів. Чотири білки (NP, VP30, VP35 і L) об'єднані з вірусною геномною РНК в нуклеокапсидний комплекс. Три структурних білки є мембран-зв'язаними; GP є трансмембранним білком I типу, а VP24 і VP40, ймовірно, знаходяться на внутрішній стороні мембрани. Глікопротеїн оболонки (GP) входить до складу вірусної оболонки в якості гомотримера (також називається 'пепломер'), який складається з трьох копій гетеродимера. Гетеродимер містить два фрагменти повнорозмірного попередника GP (називається 'GP0'), відомих також як 'GP1' і 'GP2', які утворені шляхом розщеплення фурином. GP1 і GP2 зв'язані дисульфідним зв'язком. Неструктурний глікопротеїн (sGP), який секритується, експресується EBOV, але не MARV (H. Feldmann & M.P. Kiley, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 235:1-21 (1999)). Нові вірусні частинки утворюються шляхом відокремлення від поверхні клітин-господарів (див. нижче).

Життєвий цикл філовірусу починається з прикріплення віріона до специфічних клітинних поверхневих рецепторів, після чого відбувається злиття оболонки віріона з клітинною мембраною і вивільнення нуклеокапсиду вірусу в цитозоль. Вірусна РНК-залежна РНК-полімераза (RNAP, також відома як білок 'L') частково розкриває нуклеокапсид і транскрибує гени в плюс-ланцюги мРНК, які потім транслюються в структурні та неструктурні білки. Див. Фіг. 2. RNAP зв'язується з єдиним промотором, який розташований на 3'-кінці генома. Транскрипція або припиняється після проходження гена, або переходить до наступного за порядком гена, і це означає, що гени які розташовані близько до 3'-кінця генома транскрибуються в надлишку, а ті, що розташовані близько 5'-кінця генома транскрибуються з меншою ймовірністю. Тому порядок розташування генів є простою, але ефективною формою регуляції транскрипції. Нуклеопротеїн (NP) є білком який виробляється в найбільшій кількості, і клітинна концентрація якого визначає, коли RNAP перемикається з транскрипції генів на реплікацію генома. Результатом реплікації є повнорозмірні, плюс-ланцюг анти-геноми, які в свою чергу транскрибуються в мінус-ланцюг вірусне потомство геномних копій. Нові синтезовані структурні білки і геноми самостійно збираються і акумулюються біля внутрішньої сторони клітинної мембрани. Вірусні частинки упаковуються під час того, як вони відбруньковуються від зараженої клітини-господаря, породжуючи зрілі інфекційні віріони.

Попередні розробки вакцини

Було оцінено безліч стратегій в ході спроб розробити безпечну, імуногенну вакцину, яка здатна індукувати захисний імунітет проти інфекції, яка викликана одним або більше видом філовірусів, з явно різнорідними результатами. Огляд коротко викладено в Марці й Фельдман (A. Marzi and H. Feldmann Expert Rev. Vaccines 13(4):521-531 (2014)). Наприклад, не дивлячись на те, що трьохвалентна ДНК-вакцина, яка складається з трьох ДНК плазмід, одна з яких експресує глікопротеїн оболонки з ZEBOV, друга експресує глікопротеїн оболонки з SEBOV, а третя експресує нуклеопротеїн з ZEBOV, була безпечна, імуногенна, і здатна викликати

антигенну відповідь проти щонайменше одного з трьох антигенів в організмі людини, відповіді CD8+Т-клітин спостерігались менш ніж в 1/3 прищепленої популяції (J. E. Martin et al., Clin. Vaccine Immunol. 13(11):1267-1277 (2006)). Аналогічно, складна п'ятивалентна "пан-філовірусна" вакцина на основі аденовірусу, яка містить суміш з чотирьох різних рекомбінантних

аденовірусів, які експресують глікопротеїни оболонки з ZEBOV, SEBOV, Marburg-Ci67 (штам Ratauczak), Marburg-Musoke, і Marburg-Ravn, а також нуклеопротеїни з ZEBOV і Marburg-Musoke, захищала нижчих приматів від ZEBOV або MARV зараження і індукувала продукцію антитіл до обох типів вірусу, проте залишається незрозумілим, чи індукувала вакцина будь-яку CD8+ Т-клітинну відповідь (D. L. Swenson et al., Clin. Vaccine Immunol. 15(3):460-467 (2008)).

Інтраназальне введення рекомбінантного параміксовірусу - вірусу парагрипу людини, серотипу 3 (HPIV3), який експресує або глікопротеїн оболонки, або як глікопротеїн оболонки, так і нуклеопротеїн з ZEBOV, захищало морських свинок від подальшого зараження EBOV. Моделі з використанням гризунів надають результати, які погано екстраполюються на приматів, з рядом попередніх вакцин-кандидатів EBOV, які були ефективні для гризунів, і зовсім неефективні для нижчих приматів (A. Bukreyev et al., J. Virol. 80(5):2267-2279 (2006)).

Інтраназальне введення рекомбінантного HPIV3, який експресує або глікопротеїн оболонки, або як глікопротеїн оболонки так і нуклеопротеїн з ZEBOV, макакам-резус показало, що будь-яка конструкція, яка експресує глікопротеїн оболонки була помірно імуногенною, і захищала більше 80 % тварин від хвороби після пост-вакцинуючих заражень за допомогою ZEBOV (A. Bukreyev et al., J. Virol. 81(12):6379-6388 (2007)). Зрештою, рекомбінантний вірус везикулярного стоматиту (VSV), в якому глікопротеїн VSV був замінений на глікопротеїн оболонки ZEBOV, захищав 50 % морських свинок, 100 % мишей, яких лікували так пізно як 24 години після зараження, в іншому ж випадку спостерігалась поголовна смертельна інфекція. Чотири з восьми макакам-резус (50 %) були захищені, коли їх лікували від 20 до 30 хв. після впливу вірусом, надаючи можливість пост-контактної терапії при зараженні вірусом Ебола (H. Feldmann, PLoS Pathogens 3(1):54-61 (2007)).

Геїсберт і співавт. оцінили ефекти стратегій вакцинацій, які захищали мишей або морських свинок від летальної інфекції EBOV у нижчих приматів. Вони використовували частинки РНК реплікона, які були отримані з ослабленого штаму венесуельського вірусу коней (VEEV), який експресує глікопротеїн і нуклеопротеїн EBOV, рекомбінантний вірус вісповакцини (VACV), який експресує глікопротеїн EBOV, ліпосоми, які містять ліпід А та інактивовані EBOV, і концентровані, інактивовані препарати цілісних віріонів. Вони виявили, що жодна з цих стратегій не була здатною успішно захистити приматів від важкого зараження EBOV (T. H. Geisbert et al., Emerging Infectious Diseases 8(3):503-507 (2002)).

Інші використовували Вірус-Подібні Частинки (ВПЧ), які були експресовані в клітинах ссавців, бактерій, рослин або клітинах комах, як субодиничні вакцини, що не здатні до реплікації (D. L. Swenson et al., Vaccine 23:3033-3042 (2005); K. L. Warfield et al., JID 196(2):430-437 (2007), N. Kushnir et al., 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 et al., J Virol. 79(16):10442-10450 (2005), WO 2003/039477, WO 2006/046963, WO 2006/073422, WO 2004/042001, US 8900595, US 7211378), щоб викликати продукцію антитіл. Проте філовірусні ВПЧ вимагають дорогого і складного процесу виробництва, і їх тривале зберігання повинно забезпечуватися при кімнатній температурі протягом тривалого періоду.

Таким чином, після витрати великої кількості часу і зусиль, на доклінічних стадіях з'явилося лише кілька перспективних вакцин-кандидатів, але в даний час немає затвердженої профілактичної вакцини. З урахуванням заразності та летальності філовірусної інфекції, існує нагальна необхідність у створенні ефективної вакцини.

СУТЬ ВИНАХОДУ

У цьому винаході виявлено, що різні примуючі-бустуючі комбінації реплікативно-неповних і реплікативно-нездатних векторів створюють ефективний імунний захист проти філовірусної інфекції.

Відповідно, один загальний аспект цього винаходу має відношення до комбінованої вакцини, яка містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є

композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з комбінованою вакциною, яка містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з набором, який містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з набором, який містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з рекомбінантним вектором на основі модифікованого вірусу вісповакцини (MVA), який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує дві або більше антигенні детермінанти філовірусного білка для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання. У ще одному аспекті, цей винахід пов'язаний з рекомбінантним вектором MVA, який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенний білок філовірусного глікопротеїну і кодує філовірусний білок 40 віріона (VP40) для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання. В іншому варіанті реалізації винаходу, винахід пов'язаний з рекомбінантним вектором MVA, який містить нуклеотидну послідовність, яку вибирають із групи, що складається з: а) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:30; б) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28 і SEQ ID NO:30; в) SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:33. В деяких аспектах, винахід пов'язаний з: фармацевтичною композицією, яка містить вектор MVA; вакциною, яка містить зазначений рекомбінантний вектор MVA; лікарським препаратом, який містить зазначений рекомбінантний вектор MVA і фармацевтичний носій, розчинник і/або добавку; і клітиною, яка містить зазначений рекомбінантний вектор MVA. В деяких аспектах, винахід пов'язаний із зазначеним рекомбінантним вектором MVA для застосування як лікарського засобу або вакцини для лікування і/або запобігання філовірусному захворюванню у суб'єкта, і спосіб для впливу на імунну відповідь у суб'єкта, який включає стадію в якій суб'єкту вводять зазначений рекомбінантний вектор MVA. У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з набором, який містять зазначений рекомбінантний вектор MVA в першій ампулі або контейнері для першого введення (примування) і в другій ампулі або контейнері для другого введення (бустування).

Справжній винахід також пов'язаний з рекомбінантним вектором FPV, який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка (наприклад будь-якого з філовірусних білків як згадувалося вище або нижче, бажано філовірусного глікопротеїну оболонки) під контролем промотору FPV-40K, який має SEQ ID NO:26. У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з рекомбінантним вектором на основі модифікованого вірусу віспи курей (FPV), який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує одну, дві або більше антигенних детермінант філовірусного білка для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання. В деяких аспектах, винахід пов'язаний з: фармацевтичною композицією, яка містить вектор FPV; вакциною, яка містить зазначений рекомбінантний вектор FPV; лікарським препаратом, який містить зазначений рекомбінантний вектор FPV і фармацевтичний носій, розчинник і/або добавку; і клітиною, яка

містить зазначений рекомбінантний вектор FPV. В деяких аспектах, винахід пов'язаний із зазначеним рекомбінантним вектором FPV для застосування як лікарського засобу або вакцини для лікування і/або запобігання філовірусному захворюванню у суб'єкта, і спосіб для впливу на імунну відповідь у суб'єкта, який включає стадію в якій суб'єкту вводять зазначений

5 рекомбінантний вектор FPV.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з комбінованою вакциною, яка містить:

а) імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

10 б) імунологічно-ефективну кількість вектора вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому один із векторів є вакциною для примування, а інший вектор є вакциною для бустування.

15 У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з комбінованою вакциною, яка містить:

а) імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

20 б) імунологічно-ефективну кількість одного або більше додаткових векторів MVA, які містять нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому один із векторів MVA є вакциною для примування, а інші вектори MVA є вакциною для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний з комбінованою вакциною, яка містить:

25 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка;

30 АБО

в) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка; і

35 г) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора FPV, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний зі способом виклику імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

40 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

45 б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний зі способом виклику імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

50 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

55 б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

Винахід також охоплює спосіб створення рекомбінантного вектора MVA для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання, що включає етапи, в яких:

60 а) інфікують клітину-господаря вірусом MVA,

б) трансфікують інфіковану клітину рекомбінантним вектором, який містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту будь-якого з філовірусних білків за будь-яким з варіантів реалізації винаходу; зазначена нуклеотидна послідовність додатково містить геномну послідовність вірусу MVA, здатна направляти вбудовування

5 щонайменше однієї нуклеотидної послідовності в геном вірусу MVA, і

в) ідентифікують, ізолюють і при необхідності очищують створений рекомбінантний вірус MVA.

В іншому варіанті реалізації винаходу, порядок етапів а) і б) способу створення рекомбінантного вектора MVA за будь-яким з вище зазначених варіантів реалізації винаходу

10 може бути змінений таким чином, що етап б) є першим етапом, а а) - другим.

Винахід також охоплює спосіб створення рекомбінантного вектора FPV для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання, що включає етапи, в яких:

а) інфікують клітину-господаря вірусом FPV

б) трансфікують інфіковану клітину рекомбінантним вектором, який містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту будь-якого з філовірусних білків за будь-яким з варіантів реалізації винаходу; зазначена нуклеотидна послідовність додатково містить геномну послідовність вірусу FPV, здатна направляти вбудовування

15 щонайменше однієї нуклеотидної послідовності в геном вірусу FPV, і

в) ідентифікують, ізолюють і при необхідності очищують створений рекомбінантний вірус FPV.

20 В іншому варіанті реалізації винаходу, порядок етапів а) і б) способу створення рекомбінантного вектора FPV за будь-яким з вище зазначених варіантів реалізації винаходу може бути змінений таким чином, що етап б) є першим етапом, а а) - другим.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний зі способом виклику імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

25 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка;

30 АБО

в) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка; і

35 г) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора FPV, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одну антигенну детермінанту філовірусного білка;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний із способом забезпечення захисного імунітету або захисної імунної відповіді у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

40 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

45 при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний із способом забезпечення захисного імунітету або захисної імунної відповіді у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

50 а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

55 при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язано із способом продукування філовірус-подібних частинок у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

60

а) імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного глікопротеїну і філовірусного білка 40 віріона (VP40), разом з фармацевтично прийнятним носієм; і

б) імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей або вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому один із векторів є вакциною для примування, а інший вектор є вакциною для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний зі способом виклику продукування філовірус-подібних частинок у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше одного філовірусного глікопротеїну і філовірусного білка 40 віріона (VP40), разом з фармацевтично прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей або вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У додатковому аспекті, цей винахід пов'язаний зі способом виклику посиленої імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій продукують філовірус-подібні частинки у суб'єкті шляхом введення суб'єкту:

а) імунологічно-ефективної кількості вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного глікопротеїну і філовірусного білка 40 віріона (VP40), разом з фармацевтично прийнятним носієм; і

б) імунологічно-ефективної кількості вектора на основі вірусу віспи курей або вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому один із векторів є вакциною для примування, а інший вектор є вакциною для бустування.

У додатковому аспекті, винахід пов'язаний зі способом виклику посиленої імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій продукують філовірус-подібні частинки в суб'єкті шляхом введення суб'єкту:

а) першій композиції, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше одного філовірусного глікопротеїну і філовірусного білка 40 віріона (VP40), разом з фармацевтично прийнятним носієм; і

б) другій композиції, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора віспи курей або вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Супроводжуючі графічні матеріали, які включені в цю специфікацію і є її частиною, ілюструють кілька варіантів реалізації винаходу, і разом з описом слугують для пояснення принципів винаходу.

Фіг. 1 ілюструє філогенетичне дерево, яке відображає взаємозв'язки між різними виявленими штамми філовірусів. Дерево було побудоване з використанням кодуєчих ділянок генів глікопротеїну оболонки (GP) і способу максимальної парсимонії. Обидва штамми Ravn і Ratausczak вірусу Марбург мали летальність, яка дорівнює 23 %, в той час як штамми Musoke і Angola мали летальність в діапазоні від 50 % до 88 %. Штам Sudan мав летальність 41-65 %, а штам Zaire мав летальність 57-90 %. Обидва штамми Cote d'Ivoire і Reston не викликають хвороби у людини, хоча штам Reston викликав захворювання у свиней.

Фіг. 2 ілюструє структуру і генетичну організацію філовірусного генома.

Фіг. 3А ілюструє структуру і генетичну організацію MVA-mBN252В. Фіг. 3Б ілюструє структуру і генетичну організацію MVA-mBN226В. Фіг. 3В ілюструє структуру і генетичну організацію MVA-mBN254А, включно з селекційним маркером. Фіг. 3Г ілюструє структуру і генетичну організацію MVA-mBN368А, включно з селекційним маркером.

Фіг. 4А ілюструє структуру і генетичну організацію плазміди pBNX186. Фланг 1 (F1 IGR 88/89) та фланг 2 (F2 IGR 88/89) є послідовностями MVA-BN, які оточують IGR 88/89. F1 IGR 88/89 і F2

IGR 88/89 застосовуються для вставки касети експресії і селекційної касети (NPT II і eGFP) в MVA-BN у випадку гомологічної рекомбінації. Були з'єднані ген селекції Неоміцин Фосфотрансфераза (NPT II) і ген посиленого Зеленого Флуоресцентного Білка (eGFP) *E. coli* через внутрішній рибосомальний сайт входження (IRES), і вставлені під контролем сильного синтетичного поксівірусного промотору (PrS), щоб забезпечити відбір рекомбінантних вірусів. Послідовності F2 і F2-повторів IGR 88/89 фланкують селекційну касету, і роблять можливим видалення селекційної касети за допомогою гомологічної рекомбінації за відсутності селективного тиску.

Фіг. 4Б ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBNX197. Фланг 1 (F1 IGR 148/149) та фланг 2 (F2 IGR 148/149) є послідовностями MVA-BN, які оточують IGR 148/149. F1 IGR 148/149 і F2 IGR 148/149 застосовуються для вставки касети експресії і селекційної касети (GPT і RFP) в MVA-BN у випадку гомологічної рекомбінації. Ген селекції за чутливістю до лікарського препарату Гуанін-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) *E. coli* і ген Червоного Флуоресцентного Білка (RFP) були вставлені у вигляді злитого гена під контролем сильного синтетичного поксівірусного промотору (PrS), щоб забезпечити відбір рекомбінантних вірусів. LoxP послідовності фланкують селекційну касету, і роблять можливим CRE рекомбіназо-опосередковане видалення селекційної касети. Фіг. 4В ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN274, яка експресує Cre рекомбіназу. Фіг. 4Г ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBNX221. Фланг 1 (F1 IGR BamHI J FowlPox) та фланг 2 (F2 IGR BamHI J FowlPox) є послідовностями FPV, які оточують інсерційний сайт BamHI J. F1 IGR BamHI J FowlPox і F2 IGR BamHI J FowlPox застосовують для вставки касети експресії і селекційної касети (GPT і RFP) в FPV у випадку гомологічної рекомбінації. Ген селекції за чутливістю до лікарського препарату Гуанін-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) *E. coli* і ген Червоного Флуоресцентного Білка (RFP) були вставлені у вигляді злитого гена під контролем сильного синтетичного поксівірусного промотору (PrS), щоб забезпечити відбір рекомбінантних вірусів. LoxP послідовності фланкують селекційну касету, і роблять можливим CRE рекомбіназо-опосередковане видалення селекційної касети. Фіг. 4Д ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBNX214. Фланг 1 (F1 IGR 148/149) та фланг 2 (F2 IGR 148/149) є послідовностями MVA-BN, які оточують IGR 148/149. F1 IGR 148/149 і F2 IGR 148/149 застосовують для вставки касети експресії і селекційної касети (GPT і RFP) в MVA-BN у разі гомологічної рекомбінації. pBNX214 вже містить PrS5E промотор для експресії трансгенів. Ген селекції за чутливістю до лікарського препарату Гуанін-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) *E. coli* і ген Червоного Флуоресцентного Білка (RFP) були вставлені у вигляді злитого гена під контролем сильного синтетичного поксівірусного промотору (PrS), щоб забезпечити відбір рекомбінантних вірусів. LoxP послідовності фланкують селекційну касету, і роблять можливим CRE рекомбіназо-опосередковане видалення селекційної касети.

Фіг. 5А ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN433. GP-MARV-Musoke був вставлений під контролем промотору PrS в BspEI/NheI сайт pBNX197. Крім цього, плазміді також містить ДНК послідовності MVA-BN, які фланкують IGR 148/149 MVA-BN генома і loxP-фланковану селекційну касету. loxP сайти дозволяють пізніше усунення селекційної касети за допомогою CRE рекомбіназо-опосередкованої рекомбінації. Фіг. 5Б ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN384. Гени глікопротеїнів вірусу Ебола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) і вірусу Марбург Musoke (GP-MARV-Musoke) були вставлені під контролем промоторів Pr7.5 і PrS в MluI/NheI сайти pBNX197. Крім того, плазміді також містить ДНК послідовності MVA-BN, які фланкують IGR 148/149 MVA-BN генома і loxP-фланковану селекційну касету. loxP сайти дозволяють пізніше усунення селекційної касети за допомогою CRE рекомбіназо-опосередкованої рекомбінації. Фіг. 5В ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN385. Ген глікопротеїну вірусу Ебола Sudan (GP-SEBOV) і нуклеопротеїну вірусу Ебола Ivory Coast (NP-EBOV-CdI) були вставлені під контролем синтетичних промоторів PrS і PrLE1 в MluI/NheI сайти pBNX186. Крім того, плазміді містить послідовності ДНК MVA-BN, які фланкують IGR 148/149 MVA-BN генома і селекційну касету, яка фланкована сайтами F2 і F2rpt, які дозволяють пізніше усунення селекційної касети за допомогою гомологічної рекомбінації за відсутності селективного тиску. Фіг. 5Г ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN436. Ген глікопротеїну вірусу Ебола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) був вставлений в BspEI/NotI сайти pBNX214 під контролем PrS5E промотору. Крім цього, плазміді містить ДНК послідовності MVA-BN, які фланкують IGR 148/149 MVA-BN генома і loxP-фланковану селекційну касету. loxP сайти дозволяють пізніше усунення селекційної касети за допомогою CRE рекомбіназо-опосередкованої рекомбінації. Фіг. 5Д ілюструє структуру і генетичну організацію плазмиди pBN555. Ген глікопротеїну вірусу Ебола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) під контролем промотору FPV-40K був вставлений в MluI/NotI сайти pBNX221. Крім цього, плазміді

містить ДНК послідовності FPV, які фланкують інсерційний сайт BamHI J генома FPV і loxP-фланковану селекційну касету. loxP сайти дозволяють пізніше усунення селекційної касети за допомогою CRE рекомбіназо-опосередкованої рекомбінації.

Фіг. 6 ілюструє рівні антитіл до GP в яванських макак, після вакцинації MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B), як було виміряно за допомогою ІФА. Тварини були вакциновані двічі протягом чотирьох тижнів MVA-BN-Filo (в День -42 і День -14), і кров брали з інтервалами, для аналізу за допомогою ІФА: перед вакцинацією (День -42, червона крива (1)), після першої, але перед другою вакцинацією (День -14, зелена крива (2)), і після другої вакцинації (День -5, помаранчева крива (3)). Графік ліворуч демонструє специфічні антитіла до Marburg GP в сироватці, графік посередині демонструє специфічні антитіла до Ebola Zaire GP в сироватці, і графік праворуч демонструє специфічні антитіла до Ebola Sudan GP в сироватці. Гіперімунна сироватка з яванських макак, імунізованих або Marburg Angola GP (лівий графік), Ebola Zaire GP (середній графік), або Ebola Sudan GP (правий графік) була використана в якості позитивного контролю в кожному ІФА.

Фіг. 7 ілюструє результати вакцинації за допомогою MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B), після якої проводили зараження за допомогою MARV-Musoke. Фіг. 7A ілюструє, що вакцинація за допомогою MVA-BN-Filo захищала 100 % тварин від зараження MARV-Musoke. Фіг. 7Б ілюструє клінічні показники після зараження; вакциновані тварини, заражені MARV-Musoke, не продемонстрували жодних симптомів або гістологічних змін, пов'язаних з геморагічною лихоманкою, і не містили вірус в печінці, селезінці, наднирниках, лімфатичних вузлах або легенях.

Фіг. 8 ілюструє гуморальну і CD8 Т-клітинну відповідь після гетерологічної MVA/FPV імунізації. H-2K^bB6CBA F1 миші були імунізовані підшкірно за допомогою 5×10^7 ІДКТ₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN354A, див. Фіг. 3B) або FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPVmBN368A, див. Фіг. 3Г) в День 0 і День 21. А) У мишей брали кров у День 21 і 41 для аналізу антитіл. Показана середня концентрація ZEBOV-GP-специфічних антитіл +/- СПС. Б) У День 41, миші були вбиті та їх селезінки були проаналізовані за допомогою проточної-цитометрії після повторної стимуляції пептидом GP⁵⁷⁷⁻⁵⁸⁴. Показана абсолютна кількість CD107a⁺, IFN- γ ⁺ та TNF- α ⁺ CD8 Т клітин на селезінку $\times 10^4$ +/- СПС. rMVA = рекомбінантний MVA-ZEBOV-GP (MVA-mBN254); rFPV = рекомбінантний FPV-ZEBOV-GP (FPV-mBN368).

Фіг. 9 ілюструє ZEBOV-GP специфічну CD8 Т-клітинну відповідь після імунізації (підшкірно) мишей за допомогою MVA/FPV. Показана абсолютна кількість CD107a⁺, IFN- γ ⁺ та TNF- α ⁺ CD8 Т-клітин на селезінку $\times 10^4$ +/- СПС. 1: MVA-mBN254/FPV-mBN368; 2: MVA-mBN226/FPV-mBN368, 3: MVA-mBN255/FPV-mBN368.

Фіг. 10 ілюструє специфічні антитіла яванських макак до ZEBOV-GP, які в День 0 і 28 дослідження отримали примуюче-бустуюче щеплення за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP (MVA-mBN254) в дозі 5×10^8 ІДКТ₅₀ (n=3), за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255) в дозі 5×10^8 ІДКТ₅₀ (n=3) згідно Прикладу 6. Результати представлені як середня геометрична концентрація (нг/мл) разом із стандартною помилкою середнього (СПС).

Фіг. 11 ілюструє нейтралізуючу гуморальну відповідь яванських макак, які були вакциновані тричі в День дослідження 0, 28 за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP в дозі 5×10^8 ІДКТ₅₀ (n=2), або за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (5×10^8 ІДКТ₅₀, n=2). Додаткові тварини (n=2) отримали ТСБ в якості негативного контролю в День дослідження 0 і 56. Сироватки були проаналізовані за допомогою ZEBOV-GP-специфічного псевдовіронного нейтралізуючого аналізу. Результати представлені в якості окремого титру антитіл, що нейтралізують 80 % ZEBOV-GP, які експресують VSV.

Фіг. 12 А) і Б) ілюструють формування філовірус-подібних частинок в клітинах HeLa, заражених MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255). А, Б) Трансмисійний електронний мікроскопічний (TEM) аналіз MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (VLP) і MVA wt заражених клітин HeLa. Клітини HeLa були інфіковані MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (А) або ВАС-отриманих MVA-wt (Б) при MOI, яке дорівнює 10, і були отримані і оброблені тонкі зрізи для TEM. Стрілка: поперечний переріз ВПЧ, які продукуються MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40. В) показаний імуноблот-аналіз (ко-)експресії GP і VP40 в клітинах HeLa. Г) показаний імуноблот-аналіз імунопреципітатів з супернатантів клітин HeLa (аліквати тих самих супернатантів продемонстровані В) інфіковані за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 при MOI яке дорівнює 10, протягом 2 днів. VP40 і GP можуть бути тільки спільно преципітовані, якщо вони присутні в інтактних ВПЧ, але не після руйнування ВПЧ за допомогою Triton X-100 (1 %). 166: MVA-mBN166, 254: MVA-mBN254, 255: MVA-mBN255.

Фіг. 13 ілюструє структуру деяких рекомбінантних MVA/FPV конструкцій.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Автори цього винаходу виявили, що вакцина, яка містить рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту глікопротеїну (GP) вірусу Марбург (MARV), утворює філовірусну вакцину, яка здатна індукувати як клітинну, так і гуморальну відповіді, яких достатньо для

5 набуття захисного імунітету до вірусу Марбург, так само як і до віспи. Вставка додаткових гетерологічних нуклеотидних послідовностей, які кодують антигенну детермінанту глікопротеїну (GP) Ebola virus Zaire (ZEBOV), глікопротеїну (GP) Ebola virus Sudan (SEBOV), і/або нуклеопротеїну (NP) EBOV в рекомбінантний MVA, створює полівалентні вакцини, які здатні індукувати імунну відповідь як до MARV, так і EBOV, і навіть багатьох штамів MARV і/або EBOV,

10 таких як, наприклад, Ebola virus Sudan (SEBOV) і Ebola virus Zaire (ZEBOV), двома типами, які пов'язані зі смертельними формами лихоманки Ебола. Таким чином, рекомбінантний вектор MVA, який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту GP EBOV, демонструє дуже гарну імунну відповідь проти штамів вірусу Ебола. Крім цього, чудовий профіль безпеки MVA і його похідних (наприклад, MVA-BN), а також їх здатність вміщувати

15 декілька гетерологічних нуклеотидних послідовностей, дозволяє виробляти безпечну одно-компонентну полівалентну пан-філовірусну вакцину, на відміну від ряду багатоконпонентних вакцин на ранніх стадіях розробок (див. нижче).

Враховуючи той факт, що спроби відомого рівня техніки створити імунну відповідь проти філовірусів, особливо в нижчих приматів проти MARV і EBOV, провалилися, цей винахід став

20 несподіванкою. Виходячи з того, що викладається, і того що було досягнуто у відомому рівні техніки, неможливо було очікувати, що вакцина на основі MVA буде викликати імунну відповідь, яка надає нижчим приматам захист від філовірусної інфекції, зокрема від MARV. Зрозуміло, що виходячи з даних, які були отримані авторами цього винаходу і за їх спостереженнями, це більш ніж розумно і правдоподібно сказати, що вакцина на основі MVA також буде викликати імунну

25 відповідь у людини. Дійсно, FDA приймає моделі на основі нижчих приматів, як доказ того, що вакцина, яка забезпечує захист для нижчих приматів, також підходить для людей.

Автори цього винаходу також виявили, що режим вакцинації, який включає рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), що містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту EBOV, наприклад, таку як Ebola virus Sudan

30 (SEBOV) і/або Ebola virus Zaire (ZEBOV) в поєднанні з рекомбінантним модифікованим FPV, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту EBOV, наприклад Ebola virus Sudan (SEBOV) і/або ZEBOV, утворює філовірусну вакцину, яка здатна індукувати як клітинну так і гуморальну відповіді, яких достатньо для набуття захисного імунітету.

В ході дослідження, яке лежить в основі цього винаходу було також встановлено, що застосування вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок, щонайменше одного філовірусного субтипу, зокрема філовірусний глікопротеїн, і вектора на основі вірусу віспи курей, який містить щонайменше одну нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного глікопротеїну в якості гетерологічного примування-

40 бустування, викликає захисну імунну відповідь проти філовірусного імуногена шляхом індукції високого рівня гуморальної відповіді, і аж до 5-п'ятикратного підвищення відповіді цитотоксичних CD8 T-клітин, зокрема, при цьому вектор MVA був використаний щонайменше як одна композиція для примування, і вірус віспи курей як композиція для бустування.

Рекомбінантний MVA і/або FPV може бути моновалентним, тобто складатися тільки з однієї гетерологічної послідовності, яка кодує антигенну детермінанту EBOV, або полівалентним, тобто містити щонайменше дві гетерологічні послідовності, які кодують антигенні детермінанти EBOV.

45

Таким чином, у винаході пропонуються вакцини або комбінації вакцин, які застосовуються для виклику імунної відповіді, яка забезпечує подвійний захист або перехресний захист від

50 зараження, принаймні двома субтипами філовірусів, зокрема, такими субтипами, як вірус Марбург і/або вірус Ебола, і пропонуються вакцини або комбінації вакцин, які можуть бути використані для виготовлення вакцини проти щонайменше двох субтипів філовірусів, зокрема проти таких субтипів, як вірус Марбург і/або вірус Ебола. Таким чином, можуть бути запропоновані вакцини для перехресного захисту проти філовірусів, таких як Ebola Zaire-

55 Mayinga і Zair-Kikwit і/або Marburg-Musoke і Marburg-Angola. Також, зараз було виявлено вперше, що імунізація вектором MVA, який експресує певні антигени, такі як білок VP40 ZEBOV разом з іншими гетерологічними нуклеотидними послідовностями, які кодують щонайменше один поверхневий глікопротеїн філовірусу, зокрема ZEBOV, може породжувати філовірус-подібні частинки, наприклад, такі як вірус Ебола-подібні частинки, що містять філовірусний

60 глікопротеїн на їх поверхні. Це було несподівано, оскільки повідомлялося, що транспорт

філовірусного GP на поверхню клітини сильно пригнічується MVA (Sänger et al. J. Virol. Meth. 81, 29-35 (2001)). Проте, оскільки відділення філовірусних частинок відбувається на поверхні клітини (Noda et al., PLoS Pathog. 2(9):e99 (2006)), потрібний ефективний GP поверхневий транспорт для формування GP, які містять філовірусні ВПЧ. У дослідженні, яке лежить в основі цього винаходу, рекомбінантний MVA, який експресує білок 40 філовірусного віріона (VP40) і глікопротеїн, наприклад, GP-ZEBOV-Mayinga здатний продукувати ВПЧ, викликав посилену імунну реакцію з різними примуючими-бустуючими комбінаціями, і захищав нижчих приматів від філовірусної інфекції. Проведені дослідження також показали, що гомологічний примуючий-бустуючий режим, який базується виключно на рекомбінантному MVA, який експресує глікопротеїн і білок 40 (VP40) філовірусного віріона, захищав нижчих приматів від філовірусної інфекції.

Додатково було встановлено, що застосування вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний глікопротеїн щонайменше одного філовірусного субтипу, зокрема глікопротеїн вірусу Марбург і/або вірусу Ебола, і нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок білка 40 віріона (VP40) в якості гетерологічного примування-бустування разом з вектором на основі вірусу віспи курей, що містить щонайменше одну нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного глікопротеїну, створює посилену CD8 Т-клітинну відповідь. Додатково було встановлено, що застосування вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний глікопротеїн щонайменше одного філовірусного субтипу, зокрема глікопротеїн вірусу Ебола, і нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок білка 40 віріона (VP40), індукувало більш високу нейтралізуючу гуморальну відповідь у нижчих приматів, наприклад, вже після примування, яка була поліпшена після бустування, і таким чином створювалась імунна відповідь проти однієї або декількох філовірусних інфекцій, зокрема заражень Zaire-Mayinga і Zaire-Kikwit. Крім того, було показано, що імунізація вектором MVA, який експресує такі певні антигени, як білок 40 (VP40) філовірусного віріона разом з філовірусним глікопротеїном може створювати ВПЧ, які експресують філовірусний глікопротеїн оболонки, який вистилає всю поверхню ВПЧ, які схожі на інтактні віріони філовірусів. Таким чином, було показано, що включення нуклеїнової кислоти, яка кодує філовірусний білок VP40 у вектор MVA, підсилює імунну відповідь на вірусний вектор, який експресує антигенний білок або білки, зокрема вектор MVA.

Тепер буде наведено детальний опис типових варіантів реалізації цього винаходу, приклади яких проілюстровані у доданих графічних матеріалах.

Рекомбінантний вірус MVA

В одному аспекті, в цьому винаході запропонований рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну (GP), зокрема глікопротеїн оболонки. В іншому аспекті, в цьому винаході пропонується рекомбінантний вектор MVA, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну, зокрема глікопротеїн оболонки, і гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка. MVA був створений за допомогою більш ніж 570 послідовних пасажів штаму епідермальної коров'ячої віспи Анкара на курячих ембріональних фібробластах (КЕФ) (Chorioallantois вірус коров'ячої віспи Анкара, CVA; для огляду див. Mayr et al. (1975), Infection 3: 6-14) який підтримувався в Інституті вакцинації, Анкара, Туреччина протягом багатьох років і застосовувався в якості основи для вакцинації людей. Проте, через часті важкі поствакцинальні ускладнення, які пов'язані з вірусом коров'ячої віспи, було кілька спроб створити більш ослаблені, безпечні вакцини проти віспи.

У період з 1960 по 1974, професору Антон Майер вдалося послабити CVA більш ніж 570 безперервними пасажами в КЕФ клітинах (Mayr et al. (1975)). На різних моделях тварин було показано, що остаточний MVA був авірулентним (Mayr, A. & Danner, K. (1978), Dev. Biol. Stand. 41:225-234). В рамках ранньої розробки MVA в якості попередньої вакцини проти віспи були проведені клінічні випробування із застосуванням MVA-517 в поєднанні з Лістер Елстри (Stickl (1974), Prev. Med. 3:97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), Munch. Med. Wochenschr. 113:1149-1153) для осіб схильних до ризику виникнення побічних реакцій від коров'ячої віспи. У 1976 році, MVA, отриманий з MVA-571 стокової культури (відповідає 571-шому пасажу), був зареєстрований у Німеччині як примуюча вакцина в двоетапній парентеральній програмі вакцинації проти віспи. Надалі, MVA-572 був використаний для вакцинації близько 120000 європейських індивідів, більшість з яких становили діти від 1 до 3 років, без будь-яких зареєстрованих серйозних побічних ефектів, хоча багато хто з суб'єктів були серед населення з високим ризиком розвитку ускладнень, пов'язаних з коров'ячою віспою (Mayr et al. (1978), Zentralbl. Bacteriol. (B) 167:375-390). MVA-572 був депонований в Європейській колекції

клітинних культур тварин як ECACC V94012707.

В результаті пасажування, застосованого для ослаблення MVA, існує цілий ряд різних штамів або ізолятів, залежно від кількості пасажів, виконаних в КЕФ клітинах. Наприклад, MVA-572 застосовували у невеликій дозі в якості попередньої вакцини в Німеччині під час програми ліквідації віспи, а MVA-575 широко застосовувався в якості ветеринарної вакцини. MVA, як і MVA-BN, не має приблизно 13 % (26.6 кБ з шести областей) генома у порівнянні з початковим CVA вірусом. Делеції зачіпають ряд генів вірулентності і хазяйських генів, так само як і ген, який відповідає за утворення тілець включення типу А. MVA-575 був депонований 7 грудня 2000 року, в Європейській колекції клітинних культур тварин (ECACC) під номером доступу V00120707. Ослаблений CVA-вірус MVA (модифікований вірус коров'ячої віспи Анкара) був отриманий шляхом послідовного розмноження CVA (більш ніж 570 пасажів) на первинних фібробластах курячого ембріона.

Хоча Майєр і співавт. продемонстрували в 1970-х, що MVA сильно ослаблений і авірулентний для людини і ссавців, деякі дослідники повідомили, що MVA не є повністю ослабленим в клітинних лініях ссавців і людини, оскільки в цих клітинах може відбуватися залишкова реплікація (Blanchard et al. (1998), J. Gen. Virol. 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), Virology 238:198-211; U.S. Patent No. 5185146; Ambrosini et al. (1999), J. Neurosci. Res. 55: 569). Передбачається, що результати які представлені у цих публікаціях, були отримані з використанням різних відомих штамів MVA, оскільки ті віруси, які застосовуються, суттєво відрізняються за своїми властивостями, зокрема, щодо їх ростової поведінки в різних клітинних лініях. Така залишкова реплікація є небажаною з різних причин, включаючи проблеми безпеки у зв'язку із застосуванням для вакцинації людей.

Штами MVA, які мають поліпшені профілі безпеки для розробки більш безпечних продуктів, таких як вакцини або лікарські препарати, були розроблені Bavarian Nordic: MVA далі було пасажовано в Bavarian Nordic і позначено як MVA-BN. Типовий і кращий зразок MVA-BN був депонований 30 серпня 2000 року, в Європейській колекції клітинних культур (ECACC) під номером доступу V00083008. MVA-BN додатково описаний в WO 02/42480 (US 2003/0206926) і WO 03/048184 (US 2006/0159699), обидва з яких включені в цей документ шляхом посилання.

MVA-BN може прикріплюватися до людських клітин і проникати всередину, де гени, які кодуються вірусом, експресуються дуже ефективно. MVA-BN дуже пристосований до первинних клітин фібробластів курячих ембріонів (КЕФ), і не реплікується в клітинах людини. У клітинах людини, вірусні гени експресуються, але інфекційний вірус не продукується. MVA-BN класифікується як організм першого рівня біобезпеки за даними Центрів з контролю і профілактики захворювань в США. Препарати MVA-BN і його похідні, були введені багатьом видам тварин, і більш ніж 2000 людям, в тому числі людям з імунodefіцитом. Було доведено, що всі щеплення в цілому, як правило, безпечні і добре переносяться. Незважаючи на значне послаблення та зниження вірулентності, у доклінічних дослідженнях було показано, що MVA-BN викликає як гуморальну, так і клітинну імунну відповіді на вірус вісповакцини і продукти гетерологічних генів, які кодуються генами, що клоновані в геном MVA (E. Harrer et al. (2005), Antivir. Ther. 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), Vaccine 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), Hum. Gene Ther. 14(14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), Clin. Cancer Res., 10(16):5381-5390).

"Похідні" або "варіанти" MVA відносяться до вірусів, які проявляють, в основному, такі ж характеристики реплікації, що і MVA, як описано в цьому документі, але демонструють відмінності в одній або декількох частинах їх геномів. MVA-BN, також як і похідні або варіанти MVA-BN, не здатні репродуктивно реплікуватись *in vivo* в організмі людини і миші, і навіть в мишах, з сильно пригніченою імунною системою. Більш конкретно, MVA-BN або похідна або варіант MVA-BN має бажано також здатність до репродуктивної реплікації в фібробластах курячих ембріонів (КЕФ), але не має здатності до репродуктивної реплікації в клітинній лінії кератиноцитів людини HaCaT (Boukamp et al (1988), J. Cell Biol. 106:761-771), клітинній лінії остеосаркоми 143B (ECACC депозитарний № 91112502), в лінії клітин 293 нирки людського ембріона (ECACC депозитарний № 85120602), і людській лінії клітин HeLa аденокарциноми шийки матки (ATCC депозитарний № CCL-2). Додатково, похідна або варіант MVA-BN має коефіцієнт ампліфікації вірусу, щонайменше, у два рази менший, і більш бажано в три рази менший, ніж MVA-575 в клітинах клітинних ліній Hela і HaCaT. Тести і аналіз цих властивостей варіантів MVA описані в WO 02/42480 (US 2003/0206926) і WO 03/048184 (US 2006/0159699).

Термін "нездатний до репродуктивної реплікації" або "немає можливості репродуктивної реплікації" - описані, наприклад, в WO 02/42480, який також демонструє, як отримати MVA, який має потрібні властивості, як зазначено вище. Цей термін застосовується до вірусу, який має коефіцієнт ампліфікації вірусу менше 1 до 4-го дня після зараження, застосовуючи аналізи, які описані в WO 02/42480 або патенті США № 6761893.

Термін "нездатний репродуктивно відтворюватись" відноситься до вірусу, який має коефіцієнт ампліфікації вірусу менш 1 до 4-го дня після зараження. Аналізи які описані в WO 02/42480 або в патенті США № 6761893 застосовуються для визначення коефіцієнта ампліфікації вірусу.

Ампліфікація і реплікація вірусу зазвичай виражається як відношення продукovanого вірусу інфікованою клітиною (продукована кількість) до початкової кількості, яка застосована для того, щоб заразити клітини спочатку (кількість яка вводиться), і це співвідношення називають "коефіцієнтом ампліфікації". Коефіцієнт ампліфікації рівний "1" визначає статус ампліфікації, при якому кількість вірусу, який продукований зараженими клітинами є таким же, як і кількість, яку спочатку використовували для зараження клітин, і це означає, що інфіковані клітини толерантні до наявності вірусної інфекції і розмноження вірусу. На відміну від цього, коефіцієнт ампліфікації менше 1, тобто зниження кількості, яка була продукована, в порівнянні з кількістю, яка була введена, вказує на відсутність репродуктивної реплікації і, отже, ослаблення вірусу.

До переваг вакцин на основі MVA можна віднести їх безпеку, а також доступність для крупномасштабного виробництва вакцини. Доклінічні випробування показали, що MVA-BN демонструє чудовий рівень ослаблення і ефективності у порівнянні з іншими штамми MVA (WO 02/42480). Додатковою властивістю MVA-BN штамів є здатність викликати істотно такий же рівень імунітету в режимах: примування - вірус вісповакцини/бустування - вірус коров'ячої віспи, у порівнянні з режимами: примування – ДНК/бустування - вірус вісповакцини.

Рекомбінантні MVA-BN віруси, у варіанті реалізації цього винаходу, якому надають найбільшу перевагу, вважаються безпечними через їх різні реплікативні недоліки в клітинах ссавців, і їх стабільну авірулентність. Крім цього, в додаток до його ефективності, може бути вигідною можливість виробництва в промислових масштабах. Додатково, вакцини на основі MVA можуть доставляти декілька гетерологічних антигенів і забезпечувати одночасну індукцію гуморального і клітинного імунітету.

У варіанті реалізації винаходу, якому надається перевага, рекомбінантний вектор MVA будь-якого з варіантів реалізації винаходу, які використовуються для створення рекомбінантного вірусу, є MVA-BN вірусом або його похідним, що мають можливість репродуктивної реплікації *in vitro* в клітинах курячих ембріональних фібробластів (КЕФ), але не мають здатності до репродуктивної реплікації в клітинній лінії кератиноцитів людини HaCat, людській клітинній лінії остеосаркоми 143В, в лінії клітин нирки людського ембріона 293, і людській лінії клітин HeLa аденокарциноми шийки матки.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний вектор MVA будь-якого з варіантів реалізації винаходу, який використовується для створення рекомбінантного вірусу, є MVA-BN, який депонований в Європейській колекції клітинних культур тварин (ECACC) під номером доступу V00083008.

Вектори MVA, які підходять для цього винаходу, можуть бути створені зі застосуванням способів, які відомі в даній області техніки, таких які описані в WO 02/042480 і WO 02/24224, обидва з яких включені в цей документ шляхом посилання.

В іншому аспекті, вірусний штам MVA, який підходить для створення рекомбінантного вірусу, може бути штамом MVA-572, MVA-575 або будь-яким аналогічним ослабленим штамом MVA. Також підходящим може бути будь-який мутант MVA, такий як вірус Chorioallantois коров'ячої віспи Анкара (dCVA) з делеціями. dCVA містить del I, del II, del III, del IV, del V, і del VI сайти делеції MVA генома. Сайти особливо корисні для вставки декількох гетерологічних послідовностей. dCVA може репродуктивно реплікуватись (з коефіцієнтом реплікації більше 10) у людських клітинних лініях (наприклад, таких як людські 293, 143В, і MRC-5 клітинні лінії), які дозволяють оптимізацію за допомогою додаткових мутацій, корисних для стратегії вакцинації на основі вірусу (див. WO 2011/092029).

Рекомбінантний FPV

В одному аспекті, в цьому винаході запропоновано рекомбінантний FPV, який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну (GP), зокрема глікопротеїн оболонки. В іншому аспекті, у цьому винаході пропонується рекомбінантний вектор FPV, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну, зокрема глікопротеїн оболонки, і гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка.

FPV, згідно цього винаходу, є прототипним видом в роді Aviroxvirus. Описані і доступні численні FPV штами, які можна отримати у таких компаній як: CEVA Laboratories, Cynamid Webster, Fort Dodge, Intercontinental Laboratories, Intervet (NOBILIS VARIOLE), Merial (DIFTOSECT strain), Schering-Plough, Select Laboratories, Solvay, Syntro-Zeon і Vineland Laboratories. FP1 є

штамом Duvette, який був модифікований для використання в якості вакцини для одноденних курчат. Штам є комерційним вакцинним штамом вірусу віспи курей, позначений як 0 DCEP 25/CEP67/2309 жовтня 1980 року, і випускається Institute Merieux, Inc. FP5 є комерційним вакцинним штамом вірусу віспи курей, джерелом якого були курячі ембріони, отриманий American Scientific Laboratories (підрозділ Schering Corp.) Медісон, Вісконсін, Ветеринарна Ліцензія Сполучених Штатів № 165, серійний № 30321. Різні ослаблені штами вірусу віспи курей відомі, наприклад, як FPV M (м'який вакцинний штам) та FPV S (стандартний вакцинний штам), отримуються у Cyanamid Websters Pty Ltd Австралія. Штам, який був підданий критичній оцінці Департаментом сільськогосподарства США (USDA), додатково був описаний C. L. Afonso et al., J. Virol. 74(8):3815-3831 (2000), 74(8):3815-3831 (2000). FP9 є штамом вірусу віспи курей, який застосовується у вакцинних цілях, був отриманий в кінці 1980-х Томлей, Бінс, Борснелл і Браун в IAH Houghton Laboratories (Сент-Айвс, Великобританія). Він був отриманий при очищенні бляшок вірусу, який був пасажований 438 разів в культурі курячих ембріональних фібробластів (КЕФ) HP1 (A. Mayr & K. Malicki (1966), Zentralbl Veterinarmed (B) 13:1-13, Skinner et al. (2005), Expert Res. Vaccines 4(1):63-76). Інші ослаблені штами є POXVAC-T3 як такими, що описані в S. Jenkins et al. (1991), Aids Research and Human Retroviruses 7(12):991:998. Депоновані штами включають, наприклад, вірус віспи курей ATCC® BP-229 (типові струпи вірусу віспи курей з гребенів курей в Нью-Джерсі до 1928) і вірус віспи курей ATCC® BP-250 (курка, Кентуккі, 1950).

В іншому аспекті, FPV вірусний штам, який підходить для створення рекомбінантного вірусу, може бути будь-яким зі штамів, які згадані вище, або будь-яким подібним штамом FPV. В іншому аспекті, FPV обраний із групи, яка складається з: FP1, FP5, FP9, FPV M, FPV S, ATCC® VR-229, ATCC® VR-250, USDA штаму і POXVAC-TC. В ще одному варіанті реалізації винаходу, FPV будь-якого з варіантів реалізації винаходу, є ослабленим FPV.

Перевага FPV в тому, що вірус викликає захворювання лише у птахів, а також здатний проникати і експресувати трансгени в клітинах ссавців, залишаючись імунологічно неперехресно-реагуючим з вірусом коров'ячої віспи, і тим самим уникає вже існуючого імунітету у людей, які пройшли вакцинацію проти віспи.

Рекомбінантні вектори FPV, які підходять для створення рекомбінантних FPV, можуть бути створені за допомогою усталених способів. Живі ослаблені віруси віспи курей можуть бути отримані шляхом багаторазового пересіву вірусу в пташиних клітинах. Підготовка векторів для FPV описана, наприклад, 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.407-427. Створення рекомбінантних FPV, які підходять для стратегії вакцинації на основі вірусу, також були описані у EP 0 284 416 B1, WO 88/02022, WO 89/03429, WO 89/03879, WO 89/07644, WO 89/12684, WO 90/02191, WO 91/02072, WO 89/03879 і WO 94/019014. Послідовність генома і організації генома були описані в Afonso et al. and Laidlaw and Skinner (C.L. Afonso et al. (2000), J. Virol. 74(8):3815-3831, S.M. Laidlaw and M.A. Skinner (2004), Journal of General Virology 85:305-322). Приблизна послідовність генома FPV може бути знайдена за номером доступу ГенБанку AF198100.1.

Антигенні Детермінанти

Термін "антигенна детермінанта" відноситься до будь-якої молекули, яка стимулює імунну систему хазяїна для створення антиген-специфічної імунної відповіді, незалежно від того чи це клітинна реакція або гуморальна відповідь. Антигенні детермінанти можуть включати: білки, поліпептиди, фрагменти антигенних білків, антигени, і епітопи, які ще викликають імунну відповідь у господаря і є частиною антигену, гомологи або варіанти білків, поліпептидів, і фрагменти антигенних білків, антигени і епітопи, в тому числі, наприклад, глікозильовані білки, поліпептиди, фрагменти антигенних білків, антигени і епітопи, і нуклеотидні послідовності, які кодують ці молекули. Таким чином, білки, поліпептиди, фрагменти антигенних білків, антигени і епітопи не обмежуються певними нативними нуклеотидними або амінокислотними послідовностями, а включають послідовності, які є ідентичними нативній послідовності, а також включають зміни в нативній послідовності, такі як делеції, додавання, вставки і заміни.

Термін "епітоп" відноситься до сайту на антигені, на який реагують В- і/або Т-клітини, або самостійно, або у поєднанні з іншим білком, таким як, наприклад, білок головного комплексу гістосумісності ("МНС") або Т-клітинними рецепторами. Епітопи можуть бути утворені як з суміжних амінокислот, так і окремих амінокислот, які зіставлені вторинним і/або третинним згортанням білка. Епітопи, які утворені з суміжних амінокислот, зазвичай зберігаються при впливі денатуруючих розчинників, в той час як епітопи, які утворені третинним згортанням, втрачаються при впливі денатуруючих розчинників. Епітоп зазвичай включає щонайменше 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше амінокислот - але, як правило, менше 20 амінокислот в унікальній

просторовій конформації. Способи визначення просторової конформації епітопів включають, наприклад, рентгенівську кристалографію і 2-мірний ядерний магнітний резонанс. Див., наприклад, "Epitope Mapping Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

5 Бажано, щоб гомолог або варіант мав щонайменше близько 50 %, щонайменше, близько 60 % або 65 %, щонайменше, близько 70 % або 75 %, принаймні, близько 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, або 89 %, що більш типово, щонайменше, близько 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, або 94 %, і ще більш типово щонайменше близько 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, найбільш типово, щонайменше близько 99 % ідентичності з зазначеним білком, поліпептидом, фрагментом антигенного білка, і епітопом антигена на рівні нуклеотидної або амінокислотної послідовності.

10 Методи визначення ідентичності нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, які відомі в даній галузі техніки. Дві або більше послідовності можна порівнювати шляхом визначення їх "відсотка ідентичності". Відсоток ідентичності двох послідовностей, незалежно від того чи це нуклеотидні, чи це амінокислотні послідовності, є числом точних відповідностей між двома вирівняними послідовностями, яке поділене на довжину більш коротких послідовностей і помножене на 100.

15 "Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" по відношенню до білків, поліпептидів, фрагментів антигенних білків, антигенів та епітопів, які описані у цьому документі, визначається як відсоток амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, які є ідентичними амінокислотним залишками еталонної послідовності (тобто, послідовності білка, поліпептиду, фрагмента антигенного білка, антигену або епітопа, з якої вона отримана), після вирівнювання послідовностей і введення пробілів, якщо це необхідно, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності, не розглядаючи будь-які консервативні заміни як частину ідентичності послідовності. Вирівнювання для визначення відсотка ідентичності послідовності амінокислот може бути досягнуто різними способами, які знаходяться в межах кваліфікації в даній області техніки, наприклад, за допомогою загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як BLAST, ALIGN, або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній області можуть визначити відповідні параметри для вимірювання вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей.

20 Те ж саме стосується і "відсотка (%) ідентичності нуклеотидних послідовностей", з відповідними змінами.

Наприклад, належне вирівнювання амінокислотних послідовностей забезпечується за допомогою алгоритму локальної гомології Сміта і Вотермана, (1981), *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489. Цей алгоритм може бути застосований для вирівнювання амінокислотних послідовностей з використанням матриці нарахування балів, яка розроблена Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, і стандартизована Gribskov (1986), *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763. Типова реалізація цього алгоритму для визначення відсотка ідентичності послідовності, запропонована Genetics Computer Group (Медісон, Ісв.) у "BestFit" допоміжному додатку. Параметри за замовчуванням для цього методу описані в *Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995)* (доступно від Genetics Computer Group, Медісон, Ісв.). Спосіб визначення відсотка ідентичності в контексті цього винаходу, якому надається перевага, полягає у використанні MPSRCH пакету програм, під авторським правом Единбурзького університету, розробленого Джоном Ф. Коллінз і С. Шейн Старрок, і який розповсюджується IntelliGenetics, Inc. (Маунтін-В'ю, Каліфорнія). З цього набору пакетів, алгоритм Сміта-Ватермана може використовуватися у випадках, коли у рахунковій таблиці застосовуються параметри за замовчуванням (наприклад, штраф за відкриття пробілу - 12, штраф за продовження пробілу - 1, і штраф за пропуск - 6). З даних, які були згенеровані, "Match" значення відображає "ідентичність послідовності". Інші підходящі програми для розрахунку відсотка ідентичності або схожості між послідовностями, широко відомі в даній області техніки, наприклад, інша програма для вирівнювання є програмою BLAST, яку застосовують з параметрами за замовчуванням. Наприклад, BLASTN і BLASTP можуть застосовуватися, використовуючи наступні стандартні параметри: genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Деталі цих програм можна знайти в інтернеті за такою адресою: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

В деяких варіантах гетерологічна нуклеїнова кислота кодує антигенні домени або фрагменти антигенного білка, а не весь антигенний білок. Ці фрагменти можуть мати будь-яку

довжину, достатню для того, щоб бути антигенними або імуногенними. Фрагменти можуть бути, щонайменше, 8 амінокислот в довжину, бажано 10-20 амінокислот, але можуть бути і більше, наприклад, щонайменше 50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000 амінокислот, або будь-якої довжини між вказаними значеннями.

В деяких варіантах, щонайменше, один фрагмент нуклеїнової кислоти, який кодує фрагмент антигенного білка або імуногенний поліпептид, вбудовують у вірусний вектор згідно з цим винаходом. В іншому варіанті реалізації винаходу, близько 2-6 різних нуклеїнових кислот, що кодують різні антигенні білки вставляють в один або більше вірусних векторів. В деяких варіантах реалізації винаходу, можуть бути використані декілька імуногенних фрагментів або субодиниць різних білків. Наприклад, з векторів можуть експресуватись декілька різних епітопів з різних сайтів одного білка або різних білків з того ж штаму, або з білкового ортолога з різних штамів.

Визначення

В контексті цього документа визначення в однині означають також і визначення в множині, якщо не зазначено інше. Таким чином, наприклад, посилання на "антигенна детермінанта" включає в себе одну або більше антигенних детермінант, а посилання на "спосіб" включає посилання на рівнозначні стадії і способи, відомі звичайним фахівцям в даній області техніки, які можуть бути змінені або замінені на способи, які описані в цьому документі.

Якщо не зазначено інше, термін "щонайменше" попередньої серії елементів, слід розуміти як такий, що посилається на кожний елемент в серії. Фахівцям в даній області техніки буде зрозуміло, чи вони будуть в змозі встановити з використанням не більш ніж рутинних експериментів, безліч аналогічних конкретних варіантів реалізації винаходу, які описані у цьому документі. Такі еквіваленти призначені для того, щоб бути охоплені даним винаходом.

В описі і формулі винаходу, які слідує нижче, якщо контекст не вимагає іншого, слово "мати" і його варіації, такі як "містить", "містити", слід розуміти як таке, що означає включення зазначеного цілого або стадії, або групи цілих або стадій, але не виключення будь-якого іншого цілого або стадії або групи цілих або стадій. При використанні в цьому документі, термін "містить" може бути замінений терміном "містити" або "включає" або іноді, коли використовується в цьому винаході терміном "має". Будь-який із зазначених вище термінів (що включає, містить, що включає в себе, має), будь-який раз, коли використовується тут у контексті аспекту або варіанту реалізації цього винаходу, може бути замінений терміном "складається з", хоча це й менш бажано.

При використанні в цьому документі, "складається з" виключає будь-який елемент, крок, або компонент, незазначений в елементі формули. При використанні в цьому документі, термін "складається в основному з" не впливає істотним чином на основні та нові властивості формули.

Як використовується в цьому документі, термін сполучник "і/або" між кількома перерахованими елементами слід розуміти як такий, що включає як індивідуальні, так і комбіновані варіанти. Наприклад, якщо два елементи з'єднані за допомогою "і/або", перший варіант відноситься до застосування першого елемента без другого. Другий варіант відноситься до застосування другого елемента без першого. Третій варіант відноситься до застосування першого і другого елементів разом. Будь-який з цих варіантів слід розуміти як такий, що потрапляє в межі свого значення, і, отже, задовольняє вимогу терміна "і/або", як використано в цьому документі. Одночасне застосування більш ніж одного з варіантів, слід розуміти як таке, що потрапляє в межі свого значення, і тому задовольняє вимогу терміна "і/або".

У тексті цієї специфікації цитуються деякі документи. Кожен з документів, які зазначені у цьому винаході (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, технічні вимоги виробника, інструкції і т. д.), або вище, або нижче, включені в цей документ у повному обсязі за допомогою посилання. У тих випадках, коли матеріал, який включений в справжній документ шляхом посилання, суперечить або не узгоджується з цією специфікацією, специфікація замінює собою будь-який матеріал. Ніщо в цьому документі не повинно бути витлумачено як визнання того, що винахід не має права датувати більш раннім числом таке розкриття на підставі попереднього винаходу.

Термін "по суті подібний" в контексті філовірусних антигенних білків згідно цього винаходу вказує на те, що поліпептид містить послідовність, щонайменше на 90 %, бажано щонайменше на 95 % ідентичні еталонній послідовності при вікні порівняння в 10-20 амінокислот. Відсоток ідентичності послідовностей визначають шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей в межах вікна порівняння, при цьому частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити доповнення або делеції (тобто гепи) у порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить доповнень або делецій) для оптимального вирівнювання двох

послідовностей. Відсоток обчислюється таким шляхом: визначається кількість позицій, в яких ідентичний нуклеотид або амінокислота представлені в обох послідовностях, для одержання кількості співпадаючих позицій; число співпадаючих позицій ділиться на загальне число позицій у вікні порівняння, і отриманий результат множиться на 100 для отримання відсотка ідентичності послідовностей.

Термін "субтип" тут можна замінити словом "вид". Він включає в себе штами, ізоляти, кладки або варіанти будь-якого філовірусу, такого як Марбург або вірус Ебола. Терміни "штам" "клада" або "ізолят" є технічними термінами, які добре відомі практикуючому, і які відносяться до систематики мікроорганізмів. Таксономічна система класифікує всі на даний момент охарактеризовані мікроорганізми в ієрархічному порядку - сімейства, роди, види, штами (Virology, ed. by Fields B. N., Lippincott-Raven Publishers, 4th edition 2001). У той час як критерієм для членів сім'ї, є їх філогенетичний зв'язок, рід містить всі члени, які мають спільні характеристики, а вид визначено як політилічний клас, який є сомовідтворюваною лінією потомства і займає особливу екологічну нішу. Термін "штам" або "клада" описує мікроорганізми, тобто віруси, які мають загальні властивості, такі, як морфологія або структура і організація генома, але варіюють в плані біологічних властивостей, таких як коло господарів, тканинний тропізм, географічне поширення, ослаблення або патогенність. Наприклад, існує п'ять субтипів вірусу Ебола, тобто Ebola virus Zaire, Ebola virus Sudan, Ebola virus Reston, Ebola virus Bundibugyo и Ebola virus Ivory Coast. Штамами Ebola virus Zaire, наприклад, є штами: Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon (1994), Zaire-Gabon (лютий 1996), Zaire-Gabon (жовтень 1996). Є тільки один субтип або вид вірусу Марбург, тобто відомий досі марбургвірус озера Вікторія, зі штамами, які включають Marburg-Musoke і Marburg-Angola. Додаткові штами або ізоляти також можна побачити на Фіг. 1.

Термін "ІДКТ₅₀" - це скорочення від "інфекційна доза культури тканин", та кількість патогенного агента, яка буде призводити до патологічних змін в 50 % клітин інокульованої клітинної культури, виражена як ІДКТ₅₀/мл. Метод визначення ІДКТ₅₀ добре відомий фахівцям в даній галузі техніки. Він, наприклад, описаний, у Прикладі 2 WO 03/053463.

Термін "суб'єкт", який застосовується в цьому документі, означає живі багатоклітинні хребетні організми, в тому числі, наприклад, людей, ссавців (не людей) і нижчих приматів. Термін "суб'єкт" може бути застосований рівнозначно з терміном "тварина" у цьому винаході.

Термін "викликане філовірусом захворювання", який відноситься до будь-якого з варіантів реалізації винаходу, може позначати будь-яке захворювання, викликане інфекцією будь-яким філовірусним штамом, ізолятом або варіантом, як зазначено в цьому документі, або викликане будь-якою комбінацією будь-яких філовірусних штамів, ізолятів або їх варіантів (як вже згадувалося у будь-якому місці вище або нижче і/або в будь-якому з варіантів реалізації вище або нижче).

Як використовується в цьому винаході, термін "посилення", коли застосовується по відношенню до імунної відповіді проти філовірусів, такої як гуморальна відповідь (наприклад, специфічна антигенна нейтралізуюча гуморальна відповідь або ZEBOV-GP-специфічна гуморальна відповідь), цитокінова відповідь або CD8 Т-клітинна відповідь (наприклад, імунодомінантна CD8 Т-клітинна відповідь), позначає збільшення імунної відповіді у тварини, яким ввели гомологічну примуючу-бустуючу комбіновану вакцину MVA, відносно відповідної імунної відповіді, яка спостерігається у тварини, якій ввели гомологічну примуючу-бустуючу комбіновану вакцину векторів MVA, при цьому вектори MVA не експресують жоден білок 40 філовірусного віріона, або позначає збільшення імунної відповіді у тварини, якій ввели гетерологічну примуючу-бустуючу комбіновану вакцину MVA і FPV векторів згідно цього винаходу, відносно відповідної імунної відповіді, яка спостерігається у тварини, якій ввели гетерологічну примуючу-бустуючу комбіновану вакцину MVA і FPV векторів, згідно цього винаходу, при цьому вектори MVA не експресують жоден білок 40 філовірусного віріона. Бажано, "посилений", коли застосовується по відношенню до імунної відповіді, такої як гуморальна відповідь, наприклад, нейтралізуюча гуморальна відповідь, цитокінова відповідь або CD8 Т-клітинна відповідь, означає зростання імунної відповіді у тварини, якій ввели гетерологічну примуючу-бустуючу комбіновану вакцину з вектором MVA як примуючим вектором, і вектором FPV як бустуючим вектором, згідно цього винаходу, відносно відповідної імунної відповіді, яка спостерігається у тварини, якій ввели зворотню примуючу-бустуючу комбінацію, при цьому вектор FPV пропонується як примуючий вектор, а вектор MVA пропонується як бустуючий вектор, застосовуючи той самий примуючий-бустуючий інтервал.

У контексті цього винаходу "імунодомінантна CD8 Т-клітинна відповідь" означає масштабну CD8 Т-клітинну відповідь господаря проти рекомбінантного антигена, який закодований MVA і/або FPV вектором. Таким чином, може бути створена імунодомінантна CD8 Т-клітинна

відповідь проти рекомбінантного антигена, який закодований за допомогою гомологічних примуючих-бустуючих рекомбінантних MVA або гетерологічних примуючих-бустуючих рекомбінантних MVA і FPV, яка є більшою, ніж CD8 Т-клітинна відповідь проти рекомбінантних антигенів рекомбінантних MVA або FPV, при цьому вектор MVA не експресує жодного білка 40 філовірусного віріона.

Рівень CD8 Т-клітинної відповіді може бути визначений способами, які добре відомі в даній галузі техніки, таким як, але необмежені лише цими: ELISPOT аналіз (наприклад, інтерферону-гамма (IFN- γ) ELISPOT. Наприклад протоколи описані в Current Protocols in Immunology (John Wiley & Son, Inc. (1994) (див. наприклад, Chapter 6, Section 19: ELISPOT Assay to Detect Cytokine-secreting Murine and Human Cells, Supplement 10) або в Schneider, et al., Nat. Med. 4:397-402 (1998)) і, наприклад, за методиками, які викладені в прикладах для конкретного вірусу цього винаходу. Інші підходящі аналізи включають в себе аналіз ICS, який аналізує рівень внутрішньоклітинних цитокінів при діяльності CD8 Т-клітин. Наприклад, CD8 Т-клітинна відповідь може включати антиген-специфічну CD8 Т-клітинну відповідь, яка становить більш ніж 50 %, наприклад, 51 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % від загального числа антиген-специфічних Т-клітинних відповідей у тваринному суб'єкті. Бажано, CD8 Т-клітинна відповідь також представляє 0,1 % або більше, наприклад 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, або більше від загального числа цитокінових відповідей у тваринному суб'єкті. В деяких варіантах, після другого або третього бустування, рекомбінантні вірусні вектори згідно цього винаходу викликають CD8 Т-клітинну відповідь господаря проти закодованого антигена, що становить щонайменше 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, або 30 % від загального числа CD8 Т-клітинних компартментів.

Рівень гуморальної відповіді може бути визначений за допомогою способів, які відомі в даній галузі техніки. Для визначення, чи індукує поліпептид (або полінуклеотид, який експресує такий поліпептид) одне або кілька нейтралізуючих антитіл проти одного або декількох філовірусних антигенів з одного або більше філовірусних субтипів, може бути застосований будь-який відповідний аналіз за допомогою реакції нейтралізації бляшкоутворення (РНБО). Типовий аналіз за допомогою реакції нейтралізації бляшкоутворення для філовірусів описаний в Прикладах. Інші РНБО способи і формати добре відомі фахівця в даній галузі техніки.

Філовірусні білки

Як використовуються рівнозначно у цьому винаході, терміни "ген глікопротеїну" або "GP ген" позначає ген, або гомолог або варіант гена, який кодує глікопротеїн, зокрема трансмембранний глікопротеїн оболонки, в будь-якому філовірусному штамі або ізоляті, хоча точна послідовність і/або геномне розташування гена глікопротеїну може відрізнятися у різних штамів або ізолятів. Наприклад, в штамі Maleo SEBOV (SEBOV-Maleo), ген глікопротеїну (ген GP-SEBOV-Maleo) містить нуклеотиди 120-1004 і 1004-2149 (кінцеві точки включені) як пронумеровано в номері доступу ГенБанку U23069.1. Транскрипти EBOV проходять редагування у ході транскрипції таким чином, що деякі нуклеотиди зчитуються двічі. Ген GP-SEBOV-Maleo додатково містить відкриту білок-кодуєчу рамку зчитування (ORF), яка охоплює нуклеотиди 120-1004 і 1004-2149 (кінцеві точки включені) як пронумеровано в номері доступу ГенБанку U23069.1. Нуклеотидна послідовність гена GP-SEBOV-Maleo викладена в SEQ ID NO:1 (під номер доступу ГенБанку U23069.1).

Як використовується в цьому винаході, "гомолог" або "варіант" має бажано щонайменше близько 50 %, щонайменше, близько 60 % або 65 %, щонайменше, близько 70 % або 75 %, принаймні, близько 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, або 89 %, що більш типово, щонайменше, близько 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, або 94 % і навіть більш типово щонайменше близько 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, найбільш типово, щонайменше близько 99 % ідентичності нуклеотидної послідовності з зазначеним геном, білком, поліпептидом, фрагментом антигенного білка, антигеном і епітопом. Термін "гомолог" або "варіант" також включає в себе видалені, усичені чи іншим чином мутовані версії генів і білків, відповідно. В якості прикладу, охоплюються, наприклад, розчинні форми GP-EBOV або GP-MARV білків, які позбавлені сигнального пептиду, а також трансмембранні та/або цитоплазматичні домени повнорозмірних GP-EBOV або GP-MARV білків.

Як використовуються як рівнозначні у цьому винаході, терміни "глікопротеїн" або "GP", відносяться до глікопротеїну, зокрема трансмембранного глікопротеїну оболонки, або до гомолога або до варіанта глікопротеїну.

Амінокислотна послідовність GP-EBOV-Maleo викладена в SEQ ID NO:2 (амінокислотна послідовність під номером доступу ГенБанку U23069.1). GP-SEBOV-Maleo білок містить сигнальний пептид, позаклітинний домен, трансмембранний домен і цитоплазматичний домен (див., наприклад, UniProtKB/Swiss-Prot номер доступу Q66798). Сигнальний пептид білка GP-

SEBOV-Maleo складається з амінокислот 1-32 SEQ ID NO:2; позаклітинний домен білка GP-SEBOV-Maleo складається з амінокислот 33-650 SEQ ID NO:2 або амінокислот 1-650 SEQ ID NO:2; трансмембранний домен білка GP-SEBOV-Maleo складається з амінокислот 651-671 SEQ ID NO:2; і цитоплазматичний домен білка GP-SEBOV-Maleo складається з амінокислот 672-676 SEQ ID NO:2.

Нуклеїнова кислота, яка кодує амінокислотну послідовність GP-ZEBOV-Mayinga викладена в SEQ ID NO:19. GP-ZEBOV-Mayinga містить білок викладений в SEQ ID NO:20 (номер доступу ГенБанку ABX75367.1).

Крім того, також терміни "ген нуклеопротеїну" або "NP ген", які використовуються рівнозначно у цьому винаході, позначають ген, або гомолог або варіант гена, який кодує нуклеопротеїн в будь-якому філовірусному штамі або ізоляті, хоча точна послідовність і/або геномні розташування гена нуклеопротеїну також можуть різнитися між штамами або ізолятами. Наприклад, в штамі Boniface SEBOV (SEBOV-Boniface), ген нуклеопротеїну (ген NP-SEBOV-Boniface) містить нуклеотиди 383-2599 (кінцеві точки включені), як пронумеровано в номері доступу ГенБанку AF173836.1. Ген NP-SEBOV-Boniface додатково містить відкриту білок-кодируючу рамку зчитування (ORF), яка охоплює нуклеотиди 383-2599 (кінцеві точки включені), як пронумеровано в номері доступу ГенБанку AF173836.1. Нуклеотидна послідовність гена NP-SEBOV-Boniface викладена в SEQ ID NO:3 (номер доступу ГенБанку AF173836.1).

Амінокислотна послідовність NP-EBOV-Boniface викладена в SEQ ID NO:4 (номер доступу амінокислотної послідовності ГенБанку AF173836.1). NP-SEBOV-Boniface білок містить суперспіральний домен (див., наприклад, номер доступу UniProtKB/Swiss-Prot Q9QP77). Суперспіральний домен білка NP-SEBOV-Boniface складається з амінокислот 334-363 SEQ ID NO:4.

В деяких варіантах реалізації винаходу, нуклеїнова кислота, яка кодує антигенну детермінанту, бажано антигенний білок, більш бажано будь-який з білків, які згадані вище або нижче, являє собою повнорозмірний білок.

Рекомбінантні MVA і FPV

У цьому винаході запропоновані рекомбінантні поксвіруси (наприклад, MVA або MVA-BN або FPV), які містять гетерологічні або чужорідні послідовності нуклеїнових кислот, отримані з EBOV і/або MARV, які вставлені в різні сайти вбудовування в поксвірусний геном (наприклад, MVA або MVA-BN або FPV). Гетерологічні нуклеїнові кислоти можуть кодувати один або більше чужорідний білок і/або чужорідний антиген, у тому числі, наприклад, вірусні антигени.

Як правило, такий "рекомбінантний" MVA або FPV, як описано в цьому документі, належить до MVA/FPV, які створюються стандартними генно-інженерними методами, тобто MVA/FPV цього винаходу, таким чином, являють собою генетично спроектовані або генетично модифіковані MVA/FPC. Термін "рекомбінантний MVA або FPV", таким чином, включає в себе MVA/FPV які мають стабільно інтегровану в їх геном рекомбінантну нуклеїнову кислоту, бажано у формі транскрипційної одиниці. Транскрипційна одиниця може містити промотор, енансер, термінатор і/або сайленсер. Рекомбінантні MVA/FPV цього винаходу можуть експресувати гетерологічні антигенні детермінанти, поліпептиди або білки (антигени) після впливу на регуляторні елементи. Термін "MVA/FPV" в контексті будь-якого з варіантів реалізації винаходу включає як індивідуальні, так і комбіновані варіанти MVA, FPV або MVA і FPV.

Як використовується тут, "гетерологічний" ген, нуклеїнова кислота, антиген або білок вважається нуклеотидною або амінокислотною послідовністю, яка не представлена в поксвірусному геномі дикого типу (наприклад, MVA або MVA-BN або FPV). Досвідчений фахівець розуміє, що "гетерологічний ген", який присутній в поксвірусі, такому як MVA або MVA-BN або FPV, повинен бути включений у поксвірусний геном таким чином, що, після введення рекомбінантного поксвіруса в клітину-господаря, він експресується як відповідний гетерологічний генний продукт, тобто як "гетерологічний антиген" і/або "гетерологічний білок." Експресія зазвичай досягається шляхом оперативного зв'язування гетерологічного гена з регуляторними елементами, які допускають експресію в поксвірус-інфікованих клітинах. Бажано, щоб регуляторні елементи містили природні або синтетичні поксвірусні промотори.

В одному аспекті, рекомбінантний MVA/FPV вектор, згідно цього винаходу, містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з вірусу Ебола (EBOV) і/або вірусу Марбург (MARV). В іншому варіанті реалізації, рекомбінантний MVA/FPV вектор, згідно цього винаходу, містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту однієї чи більше антигенних детермінант філовірусного білка (наприклад, білка EBOV), який вибирається з одного або більше субтипів EBOV, вибраного з групи, що складається з Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus Cote d'Ivoire (EBOV-Cdi), який також називається Tai Forest virus або

TAFV), Ebola virus Reston (REBOV) і Ebola virus Bundibugyo (BEBOV).

Згідно з іншим варіантом реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор, згідно цього винаходу, містить одну або більше антигенну детермінанту філовірусного білка, бажано білок EBOV, білок MARV або повнорозмірний білок, вибраний з групи, яка складається з: Zaire-

Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola. Бажано, щоб антигенна детермінанта філовірусного білка (наприклад, вибраного з групи, яка складається з Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola) була обрана з групи, яка складається з: глікопротеїну оболонки (GP), нуклеопротеїну (NP), білка 35 віріона (VP35), білка 40 віріона (VP40), білка 30 віріона (VP30), білка 24 віріона (VP24), і білка РНК-залежної РНК-полімерази (L).

В іншому варіанті реалізації цього винаходу, антигенна детермінанта філовірусного білка є глікопротеїном оболонки (GP), бажано, щонайменше, глікопротеїном оболонки (GP) і білком 40 віріона (VP40).

В іншому варіанті реалізації цього винаходу, антигенна детермінанта філовірусного білка є глікопротеїном оболонки (GP), який обраний із групи ZEBOV і SEBOV, бажано щонайменше глікопротеїном оболонки (GP) і білком 40 віріона (VP40), при цьому GP і VP40 походять з одного і того ж штаму, бажано при цьому цей же штам обраний із групи ZEBOV і SEBOV.

В іншому варіанті реалізації цього винаходу, антигенна детермінанта філовірусного білка є щонайменше глікопротеїном оболонки (GP) і білком 40 віріона (VP40), при цьому GP і VP40 отримують з різних ізолятів або тих же ізолятів, бажано при цьому різні або ті ж ізоляти обрані з групи, яка складається з Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola, бажано, при цьому ізолят вибирають з групи Zaire-Mayinga, Sudan-Gulu, Marburg-Musoke і Marburg-Angola, найбільш бажано, при цьому ізолят вибирають з групи Zaire-Mayinga, Sudan-Gulu, Marburg-Musoke.

В іншому бажаному варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор, згідно цього винаходу, містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенні детермінанти двох, трьох, чотирьох або більше субтипів Ебола і Марбург.

Інший бажаний варіант реалізації винаходу охоплює рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу, який містить антигенні детермінанти двох, трьох, чотирьох або більше філовірусних білків, які вибрані з групи, яка складається з глікопротеїну оболонки (GP), нуклеопротеїну (NP), білка 35 віріона (VP35), білка 40 віріона (VP40), білка 30 віріона (VP30), білка 24 віріона (VP24), і білка РНК-залежної РНК-полімерази (L).

У бажаному варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенні детермінанти одного, двох, трьох, чотирьох або більше філовірусних білків, які вибрані з групи, яка складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка який складається з SEQ ID NO: 20.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 34.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:34.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:34.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор по будь-якому з варіантів реалізації винаходу містить антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

В іншому варіанті реалізації винаходу, вектор MVA відповідно до будь-якого з варіантів реалізації винаходу містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:29 і/або SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:31.

5 В іншому варіанті реалізації винаходу, вектор MVA відповідно до будь-якого з варіантів реалізації винаходу містить нуклеотидну послідовність, яка містить SEQ ID NO:28 і/або SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:30.

В іншому варіанті реалізації винаходу, вектор MVA відповідно до будь-якого з варіантів реалізації винаходу містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенний філовірусний білок 40 віріона (VP40), що містить SEQ ID NO:33 або нуклеотидну послідовність, яка кодує білкову послідовність, що містить SEQ ID NO:34.

В іншому бажаному варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний вектор MVA, відповідно до будь-якого з варіантів реалізації винаходу, містить нуклеотидну послідовність, яка обрана з групи, що складається з: а) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:30; б) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28 і SEQ ID NO:30; в) SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:33.

В іншому аспекті, цей винахід включає рекомбінантний вектор MVA або вектор FPV, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну, зокрема філовірусного глікопротеїну оболонки.

Філовірусний глікопротеїн може кодуватися GP-MARV або GP-EBOV.

20 Для описаних тут варіантів реалізації винаходу, глікопротеїн з MARV може бути отриманий з MARV-Musoke, бажано повнорозмірний MARV-Musoke, який, у свою чергу, може бути отриманий з штаму озера Вікторія або ізоляту MARV-Musoke. GP-MARV також може бути отриманий з MARV-Ravn, MARV-Ozolin, MARV-Ratayczak або з MARV-Angola. Нуклеотидна послідовність, яка кодує GP-MARV-Musoke наведена в SEQ ID NO:5, яка кодує амінокислоти 1-681 або 19-681 SEQ ID NO:6. У бажаному варіанті реалізації винаходу, GP-MARV-Musoke містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:5, яка бажано кодує білок SEQ ID NO:6. В деяких варіантах реалізації винаходу, GP-MARV-Musoke є усіченим, при цьому усічений GP-MARV-Musoke, може містити лише позаклітинний домен глікопротеїну оболонки, що містить амінокислоти 1-648 або амінокислоти 19-648 SEQ ID NO:6 (номер доступу ГенБанку ABA87127.1). В інших варіантах реалізації винаходу, як описано в цьому винаході, глікопротеїн MARV може бути отриманий з MARV-Angola, бажано повнорозмірний GP-MARV-Angola. У бажаному варіанті реалізації винаходу, GP-MARV-Angola містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:36, яка кодує SEQ ID NO:37.

Глікопротеїн EBOV може являти собою GP-SEBOV, або може бути отриманий з GP-ZEBOV, зокрема, із штаму Mayinga GP-ZEBOV (GP-ZEBOV-Mayinga). Повнорозмірний GP-ZEBOV-Mayinga містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:19, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20. У бажаному варіанті GP-ZEBOV-Mayinga містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:19, яка бажано кодує білок SEQ ID NO:20. GP-EBOV можуть також являти собою GP-BEBOV, GP-EBOV-Cdi або GP-EBOV-Reston. GP-ZEBOV може бути усіченим і 40 може містити нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:19, яка була змінена для кодування амінокислот 1-636 SEQ ID NO:20, або змінена, щоб видалити домен муцину, що охоплює амінокислоти 314-464 SEQ ID NO:20.

GP-SEBOV може бути отриманий із штаму Gulu GP-SEBOV (GP-SEBOV-Gulu). В деяких варіантах реалізації винаходу, GP-SEBOV містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:30, бажано, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:31.

Рекомбінантний MVA/FPV, згідно цього винаходу, також може додатково містити послідовність фрагмента С правцевого анатоксину. У бажаному варіанті реалізації винаходу, GP-MARV-Musoke, зокрема, повнорозмірний GP MARV-Musoke додатково містить фрагмент С правцевого анатоксину. Фрагмент С правцевого анатоксину може містити нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8. В деяких варіантах реалізації винаходу GP-MARV-Musoke додатково містить фрагмент С правцевого анатоксину (CAC), який може містити нуклеотиди 2281-3642 нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:7, які кодують амінокислоти 760-1213 амінокислотної послідовності SEQ ID NO:8.

55 Рекомбінантний MVA/FPV вектор, згідно цього винаходу може додатково містити імуностимулюючі або костимулюючі молекули. У бажаному варіанті реалізації винаходу, гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту GP-MARV-Musoke, додатково містить одну або більше імуностимулюючих молекул. В деяких варіантах реалізації винаходу, одна чи більше імуностимулюючих молекул є людським CD40 лігандом, (hCD40L), який може містити SEQ ID NO:9, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10. В деяких 60 варіантах реалізації винаходу, одна або більше імуностимулюючих молекул є злитим білком,

що містить суші-домен рецептора людського інтерлейкіна-15 (hIL15R-Sushi), який може містити SEQ ID NO:11, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12.

Одна або більше імуностимулюючих молекул також можуть являти собою лімфоцитарний функціонально-зв'язаний антиген 3 (LFA-3, або CD58), молекулу внутрішньоклітинної адгезії 1 (ICAM-1, або CD54) та B7.1 (CD80), в сукупності відомі як тріади костимулюючих молекул (тобто "ТРИКОМ"). "ТРИКОМ", як використовується в цьому винаході, являє собою аббревіатуру від Тріада Костимулюючих Молекул, яка складається з B7-1 (також відома як CD80), внутрішньоклітинної молекули адгезії-1 (ICAM-1, також відома як CD54), і лімфоцитарного функціонально-зв'язаного антигену-3 (LFA-3, також відома як CD58), що входять до складу рекомбінантних вірусних векторів (наприклад, поксівірусних векторів), які експресують специфічний антиген з метою підвищення антиген-специфічної імунної відповіді. Окремі компоненти ТРИКОМ можуть бути під контролем одного і того ж або різних промоторів, і можуть бути надані в тому ж векторі зі специфічним антигеном або в окремому векторі. Типові вектори описані, наприклад, в Hodge et al., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation," *Cancer Res.* 59:5800-5807 (1999) і патенті США № 7211432 B2, обидва джерела включені в цей документ шляхом посилання. LFA-3 може містити нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:13, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, ICAM-1 може містити нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:15, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, і B7.1 може містити нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:17, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18.

Рекомбінантний MVA/FPV, згідно цього винаходу, може додатково містити послідовність мембранного якоря, таку як ген B5m вірусу коров'ячої віспи, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:21, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22. Зокрема, антигенна детермінанта, як описано в цьому документі, бажано, може бути функціонально зв'язаною з мембранним якорем, наприклад, таким як B5m. Таким чином, як застосовується в цьому документі, те, що рекомбінантний MVA/FPV містить послідовність мембранного якоря, це означає, що антигенна детермінанта, яка міститься в рекомбінантному MVA/FPV, є бажано функціонально зв'язаною з мембранним якорем. Мембранний якор позначає будь-який поліпептид, який здатний заякорювати гетерологічні поліпептиди на зовнішній поверхні клітинної мембрани. Бажано, мембранний якор містить трансмембранний і цитоплазматичний домени білка B5R вірусу коров'ячої віспи, зазначеного в цьому документі як "B5R якор" або "B5m". Згідно з визначенням, B5R якор позначає 42-амінокислотний С-кінцевий сегмент B5R білка з будь-якого типу вірусу коров'ячої віспи, наприклад, WR штаму (Katz et al. *J Virol.* 71(4):3178-87 (1997)) або більш бажано MVA. Крім цього, в цей винахід включені варіанти B5R якоря, які мають щонайменше 80 %, наприклад щонайменше 85 %, наприклад щонайменше 90 %, або щонайменше 95 %, наприклад щонайменше 98 % ідентичності послідовності по відношенню до еталонної B5R якорної послідовності. Бажана послідовність якоря показана в SEQ ID NO: 21, її трансляційний продукт також показаний в SEQ ID NO: 22.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, повнорозмірний і/або усічений GP-ZEBOV додатково містить ген B5m вірусу коров'ячої віспи.

В іншому аспекті, цей винахід включає рекомбінантний MVA/FPV вектор, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну, як описано вище, та додатково містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, що кодує додаткові філовірусні білки, які необхідні для формування вірусоподібних часток (ВПЧ). В одному варіанті реалізації винаходу, додаткова гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує філовірусні білки, які необхідні для формування ВПЧ, може представляти собою VP40. В деяких варіантах реалізації винаходу, додаткові філовірусні білки, які необхідні для формування вірусоподібних частинок або посиленого утворення вірусоподібних частинок, являють собою NP-EBOV і VP40-EBOV, при цьому білки можуть бути отримані з штамів, як зазначено вище. Бажано, філовірусний нуклеопротеїн (наприклад, NP-EBOV) і філовірусний білок 40 віріона (наприклад, VP40-EBOV) отримують з того ж філовірусного штаму. Вакцинуючи нижчих приматів рекомбінантним MVA, який експресує GP і VP40 (або в доповнення або без експресії NP), який здатний виробляти GP-вмісні EBOV-вірусоподібні частинки з інфікованих клітин, винахідники змогли досягти захисту проти вірусу для нижчих приматів при перевірочному філовірусному зараженні. Виробництво вірусоподібних частинок у тварин, які були вакциновані, створює додаткову модальність вакцини, близько імітуючи вірусні частинки, які присутні при цій філовірусній інфекції. Така рекомбінантна вакцинація MVA філо ВПЧ, стимулює і гуморальну і клітинну імунні відповіді, і таким чином захищає від філовірусної інфекції. Додатковою перевагою вакцинації ослабленим вірусом MVA, який виробляє філовірусні ВПЧ, є уникнення необхідності очищення вірус-подібних частинок

перед інокуляцією і додаткова MVA-опосередкована імуностимуляція. Застосування філовірусного нуклеопротейну (наприклад, NP-EBOV) і філовірусного білка 40 віріона (наприклад, VP40-EBOV), які були отримані від того ж штаму, є корисним для підвищення утворення вірус-подібних частинок, бажано для продукування однорідних GP шипиків, які декорують вірус-подібні частинки з однорідним діаметром, близько імітуючи вірусні частинки і покращуючи захист від філовірусної інфекції.

Справжній винахід також пов'язаний з рекомбінантним MVA/ FPV вектором, який містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну, і гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка. Гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка, може кодувати один або більше філовірусний білок, який вибраний з групи, що складається з: нуклеопротейну (NP), білка 35 віріона (VP35), білка 40 віріона (VP40), білка 30 віріона (VP30), білка 24 віріона (VP24), і білка РНК-залежної РНК-полімерази (L). Перераховані гени і білки, відповідно, можуть бути отримані з одного або більше описаних вище філовірусних штамів. NP-EBOV-Cdi деяких варіантів реалізації винаходу містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:28, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29.

В деяких варіантах реалізації, VP40 вибирають з MARV або EBOV, бажано VP40 обраний з одного або більше субтипів EBOV, який обраний із групи, що складається з: Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus Cote d'Ivoire (EBOV-Cdi, який також називається Tai Forest virus або TAFV), Ebola virus Reston (EBOV-Reston) і Ebola virus Bundibugyo (BEBOV). У бажаному варіанті реалізації винаходу, VP40 обраний з одного або більше ZEBOV, SEBOV і MARV. В деяких варіантах реалізації винаходу, філовірусний глікопротеїн і філовірусний VP40 вибирають з того ж філовірусного штаму. У додатковому варіанті реалізації винаходу, VP40 і/або філовірусний глікопротеїн вибирають з одного або більше: Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola; і більш бажано, вибирають з одного або більше Zaire-Mayinga (VP40-ZEBOV-Mayinga), Sudan-Gulu (VP40-SEBOV-Gulu), Marburg-Musoke (VP40-MARV-Musoke) і Marburg-Angola (VP40-MARV-Angola). У додатковому варіанті реалізації винаходу, вектор MVA в будь-якому з варіантів реалізації винаходу додатково містить філовірусний нуклеопротейн (NP), бажано, при цьому філовірусний нуклеопротейн і філовірусний VP40 отримують з того ж філовірусного штаму. У додатковому варіанті реалізації винаходу, VP40 містить нуклеїнову послідовність, яка кодує VP40-ZEBOV-Mayinga або VP40-MARV-Musoke. В інших варіантах реалізації винаходу, філовірусний VP40 містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:33. У додатковому варіанті реалізації винаходу, VP40 містить нуклеїнову кислоту, яка кодує білкову послідовність SEQ ID NO:34. У додатковому бажаному варіанті реалізації винаходу, VP40 містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:33, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34.

У додатковому бажаному варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, і щонайменше одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка. В деяких варіантах реалізації винаходу, перша гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки кодує GP-MARV, а друга гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, кодує GP-EBOV. Рекомбінантний MVA/FPV вектор містить, згідно додаткового бажаного варіанту реалізації цього винаходу, три гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, і щонайменше одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту додаткового філовірусного білка. Бажано, перша гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, кодує GP-MARV, друга гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, кодує GP-EBOV, і третя гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, кодує GP-EBOV, отримана з ізоляту штаму або EBOV, в якому GP-EBOV відрізняється від такого, який закодований другою гетерологічною нуклеотидною послідовністю. Відповідно, одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки, може кодувати GP-SEBOV-Gulu, а інша - GP-ZEBOV-Mayinga.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор містить дві гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенну детермінанту GP-EBOV з EBOV

штаму або ізоляту, і дві гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенну детермінанту GP-MARV з MARV штаму або ізоляту, і бажано MARV штам є MARV-Angola і MARV-Musoke, а EBOV штам є ZEBOV і/або SEBOV, бажано ZEBOV-Mayinga і SEBOV-Gulu. Зрозуміло, що додаткова нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту

5 додаткового філовірусного білка, може кодувати також філовірусні білки, які вибрані з групи, що складається з: нуклеопротеїну (NP), білка 35 віріона (VP35), білка 40 віріона (VP40), білка 30 віріона (VP30), білка 24 віріона (VP24), і білка РНК-залежної РНК-полімерази (L), як вже згадувалося вище, які можуть бути отримані з різних штамів, як вже зазначалося вище.

10 Рекомбінантний MVA/FPV вектора, згідно додаткового бажаного варіанту реалізації цього винаходу, містить дві гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки GP-MARV і GP-EBOV, і третю гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту VP40. Такий VP40 може являти собою будь-який VP40, як описано вище або нижче. Відповідно, одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну

15 оболонки, може кодувати GP-SEBOV-Gulu, інша - GP-ZEBOV-Mayinga, а третя гетерологічна нуклеотидна послідовність, може кодувати антигенну детермінанту філовірусного білка VP40-ZEBOV, VP40-SEBOV або VP40-MARV, бажано VP40-ZEBOV-Mayinga або VP40-MARV-Musoke.

У додатковому варіанті реалізації цього винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор містить дві гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки GP-EBOV, бажано GP-ZEBOV і/або GP-SEBOV, більш бажано GP-ZEBOV-Mayinga і GP-SEBOV-Gulu, один філовірусний глікопротеїн оболонки GP-MARV, бажано GP-MARV-Musoke, або GP-MARV-Angola, і щонайменше один філовірусний нуклеопротеїн, бажано обраний із групи, яка складається з NP-EBOV-Cdi, NP-ZEBOV, і NP-MARV, бажано NP-MARV-Musoke або NP-MARV-Angola.

25 Інтеграційні сайти в MVA/FPV

Гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти філовірусного глікопротеїну, в якості варіанту, які додатково містять щонайменше одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує додатковий філовірусний білок, можуть бути вставлені в одну або кілька міжгенних ділянок (IGR) MVA. В деяких варіантах реалізації винаходу, міжгенна

30 область вибирається з: IGR 07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, і IGR 148/149. В деяких варіантах реалізації винаходу, менш ніж 5, 4, 3 або 2 міжгенні ділянки рекомбінантного MVA містять гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти філовірусного глікопротеїну оболонки і/або додаткового філовірусного білка. Гетерологічні нуклеотидні послідовності можуть, додатково або альтернативно, бути вставлені в одному або

35 декількох делеційних сайтах дикого типу, зокрема в основних делеційних сайтах I, II, III, IV, V або VI в геномі MVA. В деяких варіантах реалізації винаходу, менш ніж 5, 4, 3 або 2 з делеційних сайтів дикого типу рекомбінантного MVA містять гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти філовірусного глікопротеїну оболонки і/або додаткового філовірусного білка.

40 Кількість інсерційних сайтів MVA, які містять гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти з філовірусного білка, може становити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, або більше. В деяких варіантах реалізації винаходу, гетерологічні нуклеотидні послідовності вставляються в 4, 3, 2, або меншу кількість інсерційних сайтів. Бажано, використовують два інсерційних сайти. В деяких варіантах реалізації винаходу, використовують три інсерційних сайти. Бажано, рекомбінантні MVA містять щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, або 7 генів, які вставлені у 2 або 3 інсерційні сайти.

Гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти філовірусного глікопротеїну, в якості варіанту, які додатково містять щонайменше одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує додатковий філовірусний білок, можуть бути вставлені в

50 одну або кілька міжгенних ділянок (IGR) FPV. У бажаному варіанті реалізації винаходу, міжгенна ділянка знаходиться між ORF 7 і 9 1,3-кб HindIII фрагмента генома (див. Drillien et al, Virology 160:203-209 (1987) (US 5180675) і Spehner et al, J. Virol. 64:527-533 (1990)). В деяких варіантах реалізації винаходу, гетерологічна нуклеотидна послідовність може бути вставлена в інсерційні сайти вірусу віспи курей, як описано в EP 0 538 496 A1 і WO 05/048957, які включені в цей документ шляхом посилання. Також бажані інсерційні сайти вірусу віспи курей цього винаходу являють собою LUS інсерційний сайт, FP14 інсерційний сайт, і 43K інсерційний сайт. Ці сайти також згадуються іноді як FPN006/FPN007 (LUS інсерційний сайт), FPN254/FPN255 (LUS інсерційний сайт), FPV060/FPV061 (FP14 інсерційний сайт), і FPV107/FPV108 (43K інсерційний сайт).

60 В одному бажаному варіанті реалізації винаходу, інсерційний сайт в вірусі віспи курей є

інсерційним сайтом LUS. Існує дві довгих унікальних послідовності (LUS) на кожному кінці вірусного генома вірусу віспи курей (номер доступу ГенБанку: AF 198100.1), і, таким чином, два LUS інсерційні сайти в кожному геномі. LUS інсерційний сайт на лівому кінці генома лежить 3' FPV006 і 5' FPV007 125L, бажано між позиціями 7470 і 7475 в геномній послідовності вірусу віспи курей, як анотовано в номері доступу ГенБанку AF198100.1. LUS інсерційний сайт на правому кінці генома лежить 3' FPV254 і 5' FPV255, бажано між позиціями 281065 і 281070 в геномній послідовності вірусу віспи курей, наприклад, номери доступу ГенБанку AF198100.1. В одному варіанті реалізації винаходу, гетерологічна нуклеотидна послідовність може бути вставлена в будь-яку позицію між нуклеотидними позиціями 281065 і 281070.

В іншому варіанті реалізації винаходу, інсерційний сайт вірусу віспи курей є FP14 інсерційним сайтом. Цей сайт знаходиться в 3' FPV060 і 5' FPV061 в геномній послідовності вірусу віспи курей, бажано між позиціями 67080 і 67097 генома вірусу віспи курей, наприклад, номери доступу ГенБанку AF198100.1. В одному варіанті реалізації винаходу, нуклеотиди між позиціями 67080 і 67097 ДНК послідовності видаляються в рекомбінантному вірусі, і замінюються певними вставками, які є послідовністю інтересу. В одному варіанті реалізації винаходу, FP14 інсерційний сайт знаходиться між ортологом гена FPV060 і ортологом FPV061, наприклад, AF198100.1. Термін "FPV060, FPV061, FPV254" і т. д. позначає положення відповідної кодуєчої послідовності (наприклад, CDS) відповідного гена, пронумерованої від 5' до 3' кінця, як анотовано в номері доступу ГенБанку AF198100.1. У бажаному варіанті реалізації винаходу, FP14 інсерційний сайт знаходиться між позиціями 67091 і 67092 в геномній послідовності вірусу віспи курей (який також називають IGR60/61 інсерційний сайт, як анотовано в номері доступу ГенБанку AF198100.1).

У ще одному варіанті реалізації винаходу, інсерційний сайт вірус віспи курей позначає 43K інсерційний сайт. Цей сайт знаходиться в 3' FPV107 і 5' FPV108, бажано в позиції 128178 геномної послідовності вірусу віспи курей, як анотовано в номері доступу ГенБанку AF198100.1.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, інтеграційний сайт є FP14 (IGR60/61) і/або BamHI J ділянка. BamHI J ділянка додатково описується в S. Jenkins et al. (1991), *Aids Research and Human Retroviruses* 7(12):991:998, який включений в цей документ шляхом посилання.

В певному варіанті реалізації винаходу, IGR є BamHI J FPV.

Кількість інсерційних сайтів FPV, які містить гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигенні детермінанти філовірусного білка, може складати один або два. Бажано, використовують два інсерційних сайти. В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний FPV містить щонайменше 1, 2, 3, 4 або 5 генів, які вставлені в один або два інсерційні сайти.

Рекомбінантні MVA/FPV віруси, які представлені у цьому документі, можуть бути створені за допомогою звичайних способів, які відомі в даній галузі техніки. Способи отримання рекомбінантних поксівірусів, або вставки екзогенних кодуєчих послідовностей в поксівірусний геном, добре відомі фахівцю в даній галузі техніки. Наприклад, способи стандартних методик молекулярної біології, такі як клонування ДНК, РНК і ДНК виділення, Вестерн-блот аналіз, ЗТ-ПЛР та ПЛР методи ампліфікації описані в *Molecular Cloning, A laboratory Manual* (2nd Ed.) (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), і методи поводження з вірусами і маніпуляції вірусами, описані в *Virology Methods Manual* (B. W. J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)). Аналогічним чином, методи та вміння для поводження з, маніпуляцій та генетичної інженерії MVA описані в *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) (див, наприклад, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)) і *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Son, Inc. (1998) (див., наприклад, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)).

Для створення різних рекомбінантних MVA/FPV векторів, які описані у цьому документі, можуть бути застосовані різні способи. Послідовність ДНК, яку потрібно вставити у вірус, може бути розміщена в плазмідній конструкції *E. coli*, в яку було вставлено ДНК, яка гомологічна ділянці ДНК MVA/FPV. Окремо, послідовність ДНК для вставки може бути лігвана з промотором. З'єднання промотор-ген може бути розташоване в плазмідній конструкції таким чином, щоб з'єднання промотор-ген фланкувалось на обох кінцях ДНК, яка гомологічна послідовності ДНК, яка фланкує ДНК ділянку MVA/FPV, яка містить несуттєвий локус. Кількість копій отриманої плазмідної конструкції може бути збільшено шляхом розмноження в бактерії *E. coli*, і надалі ця плазмідна конструкція може бути виділена з бактерії. Виділена плазміда, яка містить ДНК послідовність гена, який повинен бути вставлений, може бути трансфікована в культуру клітин, наприклад, культуру ембріональних курячих фібробластів, в той же час культура інфікується MVA. Рекомбінація між гомологічним ДНК MVA в плазміді та вірусним геномом, відповідно, може створювати MVA, який модифікований наявністю чужорідної

послідовності ДНК.

Згідно бажаного варіанту реалізації винаходу, клітини підходящої клітинної культури, такі, як наприклад КЕФ клітини, можуть бути заражені поксівірусом. Заражена клітина може бути, як наслідок, трансфікована першим плазмідним вектором, який містить чужорідний або гетерологічний ген або гени, бажано під транскрипційним контролем поксівірусного елемента, який контролює експресію. Як пояснено вище, плазмідний вектор також містить послідовності, які здатні направляти включення екзогенної послідовності в обрану частину поксівірусного генома. В якості варіанту, плазмідний вектор також містить касету, яка містить маркер і/або ген відбору, який функціонально зв'язаний з поксівірусним промотором. Підходящий маркер або гени відбору є, наприклад, генами, які кодують зелений флуоресцентний білок, β -галактозидазу, неоміцин-фосфорибозилтрансферазу або інші маркери. Застосування відбору або касети маркерів спрощує ідентифікацію і виділення виробленого рекомбінантного поксівірусу. Проте, рекомбінантний поксівірус також може бути визначений за допомогою методу ПЛР. Надалі, додаткові клітини можуть бути інфіковані рекомбінантним поксівірусом, який отриманий як описано вище, і трансфіковані другим вектором, який містить другий чужорідний або гетерологічний ген або гени. У разі, якщо цей ген вводиться в різні інсерційні сайти поксівірусного генома, другий вектор також відрізняється в поксівірус-гомологічних послідовностях, які направляють вбудовування другого чужорідного гена або генів у геном поксівірусу. Після того як відбулась гомологічна рекомбінація, може бути виділений рекомбінантний вірус, який містить два або більше чужорідних або гетерологічних гена. Для введення додаткових чужорідних генів у рекомбінантний вірус, етапи зараження і трансфекції можуть бути повторені за допомогою рекомбінантного вірусу, який був виділений на попередніх етапах, для зараження, і за допомогою додаткового вектора, що містить додатковий чужорідний ген або гени, для трансфекції.

В альтернативному варіанті, етапи зараження і трансфекції, як описано вище, є рівнозначними, тобто, відповідна клітинна лінія може спочатку бути трансфікована плазмідним вектором, який містить чужорідний ген і, потім, заражена поксівірусом. У додатковому альтернативному варіанті, також можливо ввести кожний чужорідний ген у різні віруси, заразити клітину спільно усіма отриманими рекомбінантними вірусами, провести пошук рекомбінантних варіантів, які містять всі чужорідні гени. Третій альтернативний варіант являє собою лігування ДНК генома і чужорідної послідовності *in vitro*, і реконструювання рекомбінованого вірусного ДНК генома вірусу коров'ячої віспи, застосовуючи допоміжний вірус. Четвертий альтернативний варіант являє собою гомологічну рекомбінацію в *E. coli* або іншому виді бактерій, між геномом вірусу коров'ячої віспи, який був клонований як бактеріальна штучна хромосома (BAC), і лінійною чужорідною послідовністю, яка фланкувана послідовностями ДНК, що гомологічні послідовностям, які фланкують бажані сайти вбудовування в геномі вірусу коров'ячої віспи.

Експресія гетерологічних філовірусних генів

Гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка може експресуватись як єдина транскрипційна одиниця. Наприклад, гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка, може бути функціонально зв'язана з поксівірусом, наприклад, з промотором вірусу коров'ячої віспи і/або пов'язана з поксівірусом, наприклад, термінатором транскрипції вірусу коров'ячої віспи.

В деяких варіантах реалізації винаходу, "транскрипційна одиниця" вставляється самостійно в інсерційний сайт MVA/FPV генома. В деяких варіантах реалізації винаходу, "транскрипційна одиниця" вставляється разом з іншою одиницею транскрипції в інсерційний сайт MVA/FPV генома. "Транскрипційна одиниця" не зустрічається в природі (тобто є гетерологічною, екзогенною або чужорідною) в MVA/FPV геномі, і здатна до транскрипції в заражених клітинах.

Бажано, рекомбінантний MVA/FPV містить 1, 2, 3, 4, 5, або більше транскрипційних одиниць, які вставлені у MVA/FPV геном. В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV стабільно експресує гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенні детермінанти філовірусного білка, який кодується 1, 2, 3, 4, 5, або більше транскрипційними одиницями. В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV містить 2, 3, 4, 5 або більше транскрипційних одиниць, які вставлені у MVA/FPV геном в 1, 2, 3 або більше інсерційних сайтів в MVA/FPV геномі.

В деяких варіантах реалізації винаходу, експресія одного, кількох або всіх гетерологічних нуклеотидних послідовностей, які кодують антигенні детермінанти філовірусного білка, знаходиться під контролем одного або більше поксівірусного промотору. В деяких варіантах реалізації винаходу, поксівірусний промотор є Pr7.5 промотором, гібридом раннього/пізнього промотору, PrS промотор, PrS5E промотором, синтетичним або природнім раннім або пізнім промотором, або ATI промотором з вірусу коров'ячої віспи. Підходящі промотори додатково

описані в WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 і WO 2014/063832, які включені в цей документ шляхом посилання. В деяких варіантах реалізації винаходу, поксівірусний промотор обраний із групи, яка складається з: PrS промотору (SEQ ID NO:23), PrS5E промотору (SEQ ID NO:24), Pr7.5 (SEQ ID NO:25), PrLE1 промотору (SEQ ID NO:27), Pr13.5 довгого промотору (SEQ ID NO:35) і FPV-40K промотору (SEQ ID NO:26); більш бажано, вибраний з групи, яка складається з: PrS промотору (SEQ ID NO:23), PrS5E промотору (SEQ ID NO:24), Pr7.5 (SEQ ID NO:25) і PrLE1 промотору (SEQ ID NO:27).

В деяких варіантах реалізації винаходу, нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка, бажано ZEBOV, SEBOV, EBOV-Cdi, MARV і NP-ZEBOV білка, більш бажано GP-ZEBOV-Mayinga, GP-SEBOV-Gulu, GP-MARV і NP-ZEBOV, більш бажано GP-MARV-Musoke або GP-MARV-Angola, знаходиться під контролем промотору, який вибраний з групи, що складається з PrS, PrLE1 і Pr7.5. У бажаному варіанті реалізації винаходу, нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка GP-SEBOV і GP-MARV-Musoke, експресується під контролем PrS промотора (наприклад, SEQ ID NO:23), NP-EBOV-Cdi експресується під контролем PrLE1 або модифікованого PrLE1 промотора (наприклад, SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:32), і GP-ZEBOV-Mayinga експресується під контролем Pr7.5 промотора (наприклад, SEQ ID NO:25).

В іншому бажаному варіанті реалізації винаходу, нуклеотидна послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного білка FPV будь-якого з варіантів реалізації винаходу, знаходиться під контролем промотору, бажано містить або має SEQ ID NO:26.

Філовірусні вакцини і фармацевтичні композиції

Оскільки рекомбінантні віруси MVA, які описані в цьому документі, є дуже обмеженими в реплікації, і таким чином, сильно ослаблені, вони є ідеальними кандидатами для лікування широкого кола ссавців, включаючи людей, і навіть людей з ослабленим імунітетом. Отже, в цьому документі запропоновано фармацевтичні композиції та вакцини для індукції імунної відповіді в живому організмі тварини, включаючи людину. Додатково запропоновано рекомбінантний вектор MVA, який містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну для застосування в лікуванні і/або профілактиці викликаного філовірусом захворювання.

Вакцина бажано містить будь-який рекомбінантний вірус MVA, який описаний у цьому документі, і приготовлена у вигляді розчину в діапазоні концентрацій від 10^4 до 10^9 ІДКТ₅₀/мл, від 10^5 до 5×10^8 ІДКТ₅₀/мл, від 10^6 до 10^8 ІДКТ₅₀/мл, або від 10^7 до 10^8 ІДКТ₅₀/мл. Бажана доза для вакцинації для людини становить від 10^6 до 10^9 ІДКТ₅₀, в тому числі доза 10^6 ІДКТ₅₀, 10^7 ІДКТ₅₀, або 10^8 ІДКТ₅₀.

Фармацевтичні композиції, які запропоновані в цьому документі, можуть, як правило, включати один або більше фармацевтично-прийнятних і/або схвалених носіїв, добавок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розріджувачів і/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути: вода, фізіологічний розчин, гліцерин, етанол, зволожуючі або емульгуючі агенти, рН буферні речовини, або тому подібне. Підходящі носії зазвичай є великими молекулами які повільно метаболізуються, такими як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, сополімери амінокислот, ліпідні агрегати, або тому подібне.

Для приготування вакцин, рекомбінантні віруси MVA, які запропоновані в цьому документі, можуть бути перетворені в фізіологічно прийнятну форму. Це може бути зроблено на основі досвіду у підготовці поксівірусних вакцин, які застосовуються для вакцинації проти віспи, як описано Н. Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99:2386-2392 (1974).

Наприклад, очищені віруси можуть зберігатися при температурі -80°C з титром 5×10^8 ІДКТ₅₀/мл, приготовані близько в 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl і рН 7,4. Для приготування доз вакцини, наприклад, 10^2 - 10^8 або 10^2 - 10^9 частинок вірусу можуть бути ліофілізовані в 100 мл фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБР) в присутності 2 % пептону і 1 % альбуміну людини, в ампулі, бажано у скляній ампулі. В якості варіанту, дози вакцини можуть бути приготовані за допомогою поетапної ліофілізації вірусу в лікарський препарат. Цей лікарський препарат може містити додаткові добавки, такі як маніт, декстрин, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон, або інші засоби, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні білки (наприклад, сироватковий альбумін людини), які підходять для in vivo введення. Потім скляна ампула герметизується і може зберігатися при температурі від 4°C до кімнатної температурі протягом декількох місяців. Проте, поки немає необхідності, ампулу зберігають бажано при температурах нижче -20°C .

Для вакцинації або терапії, ліофілізат може бути розчинений у водному розчині, бажано фізіологічному розчині або Трис-буфері, і введений або системно, або локально, тобто

парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтраназально, або будь-яким іншим відомим шляхом введення, який є відомим досвідченому практикуючому лікарю. Режим введення, доза і кількість введень можуть бути оптимізовані фахівцями в даній області техніки відомим способом. Проте, найчастіше пацієнт вакцинується другою дозою вакцини близько

5 впродовж від одного місяця до шести тижнів після першої вакцинації.

Комбіновані вакцини застосовуючи гомологічні/гетерологічні примуючі-бустуючі режими

Комбіновані вакцини і способи, які описані в цьому документі, можуть також використовуватися як частина гомологічного примуючого-бустуючого режиму. У гомологічному примуючому-бустуючому режимі, проводиться перша примуюча вакцинація за якою

10 проводиться одна чи більше наступних бустуючих вакцинацій. Бустуючі вакцинації конфігурують для того, щоб підсилити імунну відповідь, яка створена при першій вакцинації, шляхом введення того ж рекомбінантного поксівірусу, який був використаний в першій вакцинації.

В одному типовому варіанті реалізації винаходу, може бути використаний гомологічний примуючий-бустуючий режим, при цьому вірусний вектор MVA, як визначено в цьому документі,

15 вводиться в першій дозі. Може бути виконано одне або більше наступних введення вірусного MVA вектора, як визначено в цьому документі, щоб підсилити імунну відповідь, викликану при першому введенні. Бажано, одна або більше антигенних детермінант є такими ж або схожими на ті, що і при першому введенні.

MVA і FPV рекомбінантні вірусні вектори, відповідно до цього винаходу, також можуть бути застосовані в гетерологічних примуючих-бустуючих режимах, в яких одна або більше

20 початкових вакцинацій примування виконуються за допомогою вектора MVA або FPV, як визначено в цьому документі, і одна або більше наступних вакцинацій бустування виконується поксівірусним вектором, який не був застосований в вакцинаціях примування, наприклад, якщо вектор MVA, як визначено у цьому документі, надається в примуючому-бустуючому режимі, то

25 наступні вакцинації бустування будуть проводиться векторами FPV і навпаки.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, примуюча вакцинація виконується вектором MVA, а повторна вакцинація вектором FPV. Як варіант, один з аспектів винаходу пов'язаний з комбінованою вакциною, яка містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який

30 містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше одного філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

35 при цьому перші композиції є композицією для примування, а інша композиція є композицією для бустування, бажано, при цьому композиція для бустування містить дві або більше доз вектора композиції для бустування.

Вакцини та набори, які містять рекомбінантні MVA і FPV віруси

Також в цьому документі запропоновані вакцини і набори, які містять будь-який один чи

40 більше рекомбінантних FPV і/або MVA, які описані у цьому документі. Набір може містити один або безліч контейнерів або флаконів рекомбінантного MVA або FPV, разом з інструкціями для введення рекомбінантного MVA і FPV суб'єкту, який підлягає ризику зараження філовірусом. В деяких варіантах реалізації винаходу, суб'єкт є людиною. В деяких варіантах реалізації винаходу, в інструкції вказують, що рекомбінантний MVA вводять суб'єкту у вигляді однієї дози

45 або декількох (наприклад, 2, 3, 4 і т. д.) доз. В деяких варіантах реалізації винаходу, в інструкції вказується, що рекомбінантний вірус MVA або FPV вводять при першому (примування) і другому (бустування) введенні зараженим або незараженим суб'єктам. Бажано, набір містить щонайменше дві ампули для примуючої-бустуючої імунізації, що містять рекомбінантні MVA, як описано в цьому документі, для першої інокуляції ("примуюча інокуляція") в першій

50 ампулі/контейнері, і для щонайменше другої і/або третьої і/або додаткової інокуляції ("бустуюча інокуляція") в другій і/або додатковій ампулі/контейнері.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, вакцини та набори, які запропоновані в цьому документі, містять першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок другого філовірусного субтипу, третього філовірусного субтипу, або

55 щонайменше чотирьох підвидів філовірусів.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, вакцини та набори, які запропоновані в цьому документі, містять вектор MVA у першій композиції, яка містить нуклеїнову кислоту, що кодує антигенний білок, який вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

60 У додатковому варіанті реалізації винаходу, вакцини та набори, які запропоновані в цьому

документі, містять вектор MVA у першій композиції, яка містить нуклеїнову кислоту, що кодує антигенний білок, який вибраний з групи, яка має: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:31, бажано, містить нуклеїнову кислоту, що кодує антигенний білок, який вибраний з групи, яка має: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:31.

У додатковому варіанті реалізації винаходу, вакцини та набори, які запропоновані в цьому документі, містять першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше чотирьох філовірусних підвидів, бажано, при цьому чотири різні філовірусні субтипи вибираються з групи, що має: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

У додатковому варіанті реалізації винаходу, вакцини та набори, які запропоновані в цьому документі, призначені для застосування у створенні захисної імунної відповіді проти щонайменше одного філовірусного субтипу, при цьому перша композиція застосовується для примування згаданої імунної відповіді, а друга композиція застосовується для бустування згаданої імунної відповіді, або для застосування у створенні захисної імунної відповіді проти щонайменше одного філовірусного субтипу, при цьому друга композиція застосовується для примування згаданої імунної відповіді, а перша композиція застосовується для бустування згаданої імунної відповіді. У будь-якій вакцині, і будь-якому наборі, які запропоновані в цьому документі, бустуюча композиція може містити дві або більше дози вектора бустуючої композиції.

Як обговорювалося раніше вище, цей винахід також пов'язаний з гетерологічними режимами вакцинації із застосуванням двох різних вірусних векторів, які не реплікуються.

Для гетерологічних режимів вакцинації, у цьому винаході запропонована комбінована вакцина і/або набір для вакцинації, яка(ий) містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

У цьому винаході також запропонована комбінована вакцина і/або набір для вакцинації, яка(ий) містить:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

В цьому варіанті реалізації винаходу, суміщені вакцини і/або набори містять щонайменше дві ампули для примуючої-бустуючої імунізації, що містять рекомбінантні MVA/FPV, як описано в цьому документі, для першої інокуляції ("примуюча інокуляція") в першій ампулі/контейнері, і для щонайменше другої і/або третьої і/або додаткової інокуляції ("бустуюча інокуляція") в другій і/або додатковій ампулі/контейнері.

Комбінована вакцина і/або набір може містити кілька контейнерів або флаконів рекомбінантного MVA/FPV, разом з інструкціями для введення рекомбінантного MVA/FPV суб'єкту, який підлягає ризику зараження філовірусом. В деяких варіантах реалізації винаходу, суб'єкт є людиною. В деяких варіантах реалізації винаходу, в інструкції вказується, що рекомбінантний MVA/FPV вводять суб'єкту у вигляді однієї дози або декількох (наприклад, 2, 3, 4 і т. д.) доз. В деяких варіантах реалізації винаходу, в інструкції вказується, що рекомбінантний вірус MVA/FPV вводять при першому (примування) і другому (бустування) введенні зараженим або незараженим суб'єктам.

Перша і/або друга композиція або MVA і/або FPV будь-якої поєднаної вакцини, набору для вакцинації і/або гетерологічних програм вакцинації за винаходом, може містити будь-який з MVA і/або FPV векторів, які описані в цьому документі, або, як більш докладно описано в розділі "Рекомбінантні MVA і FPV", і будь-яку їх комбінацію.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту,

яка кодує антигенний білок другого філовірусного субтипу, антигенну детермінанту третього філовірусного субтипу, антигенну детермінанту чотирьох філовірусних субтипів або антигенну детермінанту щонайменше чотирьох філовірусних субтипів.

В іншому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять філовірусний субтип з вірусу Ебола (EBOV) або вірус Марбург (MARV).

В іншому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять антигенну детермінанту з одного або більше EBOV субтипу, який вибраний з групи, що складається з: Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus Cote d'Ivoire (EBOV-Cdi), Ebola virus Reston (REBOV) і Ebola virus Bundibugyo (BEBOV).

В іншому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять антигенну детермінанту філовірусного білка, який вибраний з групи, що складається з глікопротеїну оболонки (GP), нуклеопротеїну (NP), білка 35 віріона (VP35), білка 40 віріона (VP40), білка 30 віріона (VP30), білка 24 віріона (VP24), і білка РНК-залежної РНК-полімерази (L).

У додатковому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять вектор MVA у першій композиції, яка містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок, який вибраний з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

У додатковому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше чотирьох філовірусних субтипів, бажано, при цьому чотири різних філовірусних субтипи вибираються з групи, що має: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

У бажаному варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, містять першу композицію, яка містить вектор MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки з чотирьох різних філовірусних субтипів, які вибрані з групи, що має: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:31.

В іншому варіанті реалізації винаходу, поєднані вакцини, які запропоновані в цьому документі, застосовуються для створення захисної імунної відповіді проти щонайменше одного філовірусного субтипу, бажано щонайменше двох, більш бажано, щонайменше, чотирьох філовірусних субтипів.

В іншому варіанті реалізації цього винаходу, цей винахід пов'язаний з поєднаною вакциною або рекомбінантним MVA будь-якого з варіантів реалізації винаходу, для застосування в якості лікарського засобу або вакцини для створення захисної імунної відповіді, або для виклику посиленої імунної відповіді проти щонайменше одного філовірусного субтипу, щонайменше двох філовірусних субтипів, щонайменше трьох або щонайменше чотирьох філовірусних субтипів, при цьому MVA здатний виробляти філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують, бажано, при цьому MVA виробляє філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують.

Способи і застосування рекомбінантних MVA/FPV вірусів

Також, в цьому документі запропоновано способи і/або будь-які рекомбінантні MVA/FPV, як описано в цьому документі, для застосування в способі імунізації тваринного суб'єкта або способах які впливають на імунну відповідь у суб'єкті. Крім того, розглядаються наступні види застосування рекомбінантних MVA/ FPV, як описано в цьому документі, для приготування ліків або лікарського засобу, що застосовуються для імунізації тваринного суб'єкта, зокрема для приготування лікарського засобу або вакцини для лікування і/або для запобігання викликаного філовірусом захворювання суб'єкта. Також запропоновано рекомбінантний MVA/FPV у відповідності з будь-яким варіантом реалізації цього винаходу, для застосування в примуванні або бустуванні імунної відповіді проти філовірусу, бажано, при цьому рекомбінантний MVA і/або рекомбінантний FPV вводять один раз, два рази, три рази або чотири рази.

Додатково у цьому документі розглядаються наступні види застосування комбінацій вакцин або рекомбінантного MVA по будь-якому з варіантів реалізації винаходу, для застосування в якості лікарського засобу або вакцини для індукції посиленої імунної відповіді проти філовірусної інфекції, при цьому MVA здатний виробляти філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують, бажано, при цьому, MVA виробляє філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують. Також, у цьому документі розглядаються наступні види застосування комбінацій вакцин або рекомбінантного MVA по будь-якому з варіантів реалізації винаходу, застосування для лікування або профілактики філовірусної інфекції, при цьому MVA здатний виробляти філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують, бажано, при цьому, MVA виробляє філовірус-подібні частинки в суб'єкті, який лікують.

Відповідно, в одному варіанті реалізації цього винаходу, в цьому винаході запропоновано

спосіб виклику імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора на основі вірусу віспи курей, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

В іншому варіанті реалізації винаходу, у винаході запропоновано спосіб виклику імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, що включає стадію, в якій суб'єкту вводять:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм; і

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому одна з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування.

В іншому варіанті реалізації винаходу, в цьому документі описані: спосіб виклику імунної відповіді проти філовірусу, застосування рекомбінантних MVA/FPV для приготування лікарського засобу та імунізації тваринного суб'єкта, зокрема, для приготування лікарського засобу або вакцини для лікування і/або профілактики викликаного філовірусом захворювання у суб'єкта, або поєднана вакцина за будь-яким із варіантів реалізації винаходу, для застосування у забезпеченні захисної імунної відповіді проти філовірусної інфекції, як запропоновано в цьому документі, яка містить першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок другого філовірусного субтипу, третього філовірусного субтипу або щонайменше чотирьох філовірусних субтипів.

В іншому варіанті реалізації винаходу, в цьому документі описані: спосіб виклику імунної відповіді проти філовірусу, застосування рекомбінантних MVA/FPV для приготування лікарського засобу та імунізації тваринного суб'єкта, зокрема, для приготування лікарського засобу або вакцини для лікування і/або профілактики викликаного філовірусом захворювання у суб'єкта, або поєднана вакцина за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, для застосування у забезпеченні захисної імунної відповіді проти філовірусної інфекції, як запропоновано в цьому документі, яка містить першу композицію, яка містить вектор MVA у першій композиції, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок обраний із групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

В додатковому варіанті реалізації винаходу, в цьому документі описані: спосіб виклику імунної відповіді проти філовірусу, застосування рекомбінантних MVA/FPV для приготування лікарського засобу та імунізації тваринного суб'єкта, зокрема, для приготування лікарського засобу або вакцини для лікування і/або профілактики викликаного філовірусом захворювання у суб'єкта, або поєднана вакцина за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, для застосування у забезпеченні захисної імунної відповіді проти філовірусної інфекції, як запропоновано в цьому документі, яка містить першу композицію, яка містить вектор MVA, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок щонайменше чотирьох філовірусних субтипів, при цьому чотири різні філовірусні субтипи вибрані з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

В іншому варіанті реалізації, в цьому винаході запропоновано спосіб забезпечення захисного імунітету і/або захисної імунної відповіді проти філовірусної інфекції в суб'єкті. В іншому варіанті реалізації, у винаході запропоновано спосіб забезпечення захисного імунітету і/або захисної імунної відповіді проти філовірусної інфекції у суб'єкта, що включає стадію в якій суб'єкту вводять:

а) першу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора MVA, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенні білки щонайменше двох філовірусних субтипів, бажано, щонайменше трьох, або щонайменше чотирьох різних філовірусних субтипів, разом з фармацевтично-прийнятним носієм;

б) другу композицію, яка містить імунологічно-ефективну кількість вектора FPV, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок першого філовірусного субтипу, разом з

фармацевтично-прийнятним носієм;

при цьому перша з композицій є композицією для примування, а друга композиція є композицією для бустування, бажано, при цьому друга композиція є композицією для бустування, бажано для введення один раз, два рази, три рази або чотири рази.

5 В іншому варіанті реалізації винаходу, спосіб, який забезпечує захисний імунітет і/або захисну імунну відповідь проти філовірусної інфекції за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, включає вектор MVA у першій композиції, яка містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок, який вибраний з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

10 В іншому варіанті реалізації винаходу, спосіб, який забезпечує захисний імунітет і/або захисну імунну відповідь проти філовірусної інфекції по будь-якому з варіантів реалізації винаходу, включає вектор MVA у першій композиції, яка містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенний білок з чотирьох різних філовірусних субтипів, який має: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 і SEQ ID NO:37.

15 В іншому варіанті реалізації, в цьому винаході запропоновано спосіб продукування філовірус-подібних частинок або спосіб виклику посиленої імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, спосіб, що включає вироблення філовірус-подібних частинок у суб'єкта по кожному з варіантів реалізації винаходу, при цьому філовірусний VP40 обраний із групи, що складається з: Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus Cote d'Ivoire (EBOV-Cdi), Ebola virus Reston (REBOV) і Ebola virus Bundibugyo (BEBOV), бажано, при цьому філовірусний VP40 вибирають з групи з одного або більше ZEBOV, SEBOV, MARV.

20 В іншому варіанті реалізації, в цьому винаході запропоновано спосіб продукування філовірус-подібних частинок або спосіб виклику посиленої імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, спосіб, що включає вироблення філовірус-подібних частинок у суб'єкта за будь-яким із варіантів реалізації винаходу, при цьому філовірусний глікопротеїн і філовірусний VP40 вибрані з того ж філовірусного штаму.

25 В іншому варіанті реалізації, в цьому винаході запропоновано спосіб продукування філовірус-подібних частинок або спосіб виклику посиленої імунної відповіді проти філовірусу у суб'єкта, спосіб, що включає продукування філовірус-подібних частинок у суб'єкта за будь-яким із варіантів реалізації винаходу, при цьому вектор MVA додатково містить нуклеїнову кислоту, яка кодує філовірусний нуклеопротеїн (NP), бажано при цьому філовірусний нуклеопротеїн і філовірусний VP40 отримані з того ж самого філовірусного штаму.

30 В іншому бажаному варіанті реалізації винаходу, філовірусний штам за будь-яким з вище перерахованих способів вибирають з групи Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola, вірусів Zaire-Mayinga і Ebola virus Cote d'Ivoire, бажано при цьому філовірусний VP40 обраний із групи Zaire-Mayinga або Marburg-Musoke, більш бажано філовірусний VP40 містить нуклеїнову кислоту, яка кодує білкову послідовність SEQ ID NO:34, або при цьому нуклеїнова кислота, яка кодує антигенний білок філовірусного VP40 містить SEQ ID NO:33.

35 Як використовується тут, термін "захисний імунітет" або "захисна імунна відповідь" означає, що вакцинований суб'єкт здатний контролювати інфекцію збудника, проти якого було зроблено щеплення. Як правило, суб'єкт який має вироблену "захисну імунну відповідь" демонструє лише від легких до помірних клінічних симптомів, або взагалі жодних симптомів. Як правило, суб'єкт який має "захисну імунну відповідь" або "захисний імунітет" проти якогось збудника не вмирає в результаті інфікування зазначеним збудником. В деяких варіантах реалізації винаходу, тваринний суб'єкт є ссавцем. Ссавець може бути дорослою коровою, телям, зокрема ювенільним телям, пацюком, кроликом, свинею, мишею, але бажано людиною, і спосіб включає введення суб'єкту дози будь-якого одного або більше рекомбінантних MVA/FPV, які запропоновані у цьому документі.

40 В деяких варіантах реалізації винаходу, суб'єкт є людиною. В деяких варіантах реалізації винаходу, суб'єкт є дорослою людиною. В деяких варіантах реалізації винаходу, доросла людина є дорослою людиною з ослабленим імунітетом. В деяких варіантах реалізації винаходу, доросла людина має вік 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, або 85 років. В деяких варіантах реалізації винаходу, вік суб'єкта становить менш ніж 5 років, менш ніж 3 роки, менш ніж 2 роки, менш ніж 15 місяців, менше ніж 12 місяців, менше ніж 9 місяців, менш ніж 6 місяців, або менш ніж 3 місяці. В деяких варіантах реалізації винаходу, вік суб'єкта становить від 0 до 3 місяців, від 3 до 6 місяців, від 6 до 9 місяців, від 9 до 12 місяців, до 1 до 2 років, або від 2 до 5 років.

60 Будь-який з рекомбінантних MVA/FPV, які запропоновані у цьому документі, можуть бути

введені суб'єкту в дозі від 10^6 до 10^{10} ІДКТ₅₀, бажано від 10^6 до 10^9 ІДКТ₅₀ як, наприклад, у дозі від 10^6 до 10^9 ІДКТ₅₀, від 10^6 до 5×10^8 ІДКТ₅₀, від 10^7 до 10^8 ІДКТ₅₀, від 5×10^7 ІДКТ₅₀ до 5×10^8 ІДКТ₅₀, 10^7 ІДКТ₅₀ або 10^8 ІДКТ₅₀. В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вектор вводять у кількості 1×10^8 ІДКТ₅₀ або 1×10^{10} ІДКТ₅₀. В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вводять у кількості від 1×10^8 ІДКТ₅₀ до 5×10^9 , бажано в кількості від 5×10^8 ІДКТ₅₀ до 6×10^9 . В деяких варіантах реалізації винаходу, будь-який з рекомбінантних MVA, які запропоновані у цьому документі, вводять людському суб'єкту в дозі 10^7 ІДКТ₅₀ або 10^8 ІДКТ₅₀ або 5×10^8 ІДКТ₅₀. В деяких варіантах реалізації винаходу, будь-який з рекомбінантних FPV, які запропоновані у цьому документі, вводять людському суб'єкту в дозі 5×10^8 , $6,3 \times 10^8$ або 1×10^9 ІДКТ₅₀.

В іншому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантні MVA, які запропоновані в цьому документі, вводять людському суб'єкту в дозі нижче, ніж рекомбінантні FPV. У деяких варіантах реалізації винаходу, будь-який з рекомбінантних MVA/FPV, які запропоновані у цьому документі, вводять суб'єкту в дозах, які передбачені у цьому документі, перед зараженням філовірусом, як, наприклад, 1, 2, 3, або 4 тижні або 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, або 12 місяців перед зараженням філовірусом. В деяких варіантах реалізації винаходу, будь-який з рекомбінантних MVA/FPV, які запропоновані у цьому документі, вводять суб'єкту в дозах, які запропоновані у цьому документі, після зараженням філовірусом, як, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, або 24 години або 1, 2, 3, 4, 5, 6, або 7 днів після зараження філовірусом.

В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантні MVA/FPV, які запропоновані в цьому документі, вводять суб'єкту у вигляді однієї дози або у вигляді декількох (наприклад, 2, 3, 4 і т. д.) доз. В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантні MVA/FPV, які запропоновані в цьому документі, вводять при першому (примування) і другому (бустування) введеннях. Перша доза може становити від 10^7 до 10^8 ІДКТ₅₀ рекомбінантного MVA/FPV вірусу, а друга доза може становити від 10^7 до 10^8 ІДКТ₅₀ рекомбінантного MVA/FPV вірусу.

Композицію для бустування, як правило, вводять один або кілька разів, тижні або місяці після введення композиції для примування, наприклад, через 1 або 2 тижні, або 3 тижні, або 4 тижні, або 6 тижнів, або 8 тижнів, або 16 тижнів, або 20 тижнів, або 24 тижні, або 28 тижнів, або 32 тижні, один або два роки.

Бажано, початкову бустуюче щеплення роблять впродовж 1-12 тижнів, 2-12 тижнів після примуючого введення, більш бажано 1, 2, 4 або 8 тижнів після примуючого введення. У бажаному варіанті реалізації винаходу, первісну бустуючу інокуляцію роблять 4 або 8 тижнів після примуючого введення. У додаткових бажаних варіантах реалізації винаходу, початкове бустування проводять щонайменше 2 тижнів або, щонайменше 4 тижні після примуючого введення. У ще одному варіанті реалізації винаходу, початкове бустування проводять впродовж 4-12 тижнів або впродовж 4-8 тижнів після примуючого введення.

Рекомбінантні MVA/FPV, які запропоновані в цьому документі, можна вводити системно або місцево. В деяких варіантах реалізації винаходу, рекомбінантні MVA/FPV вводять парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або інтраназально, зокрема підшкірно. Бажано, рекомбінантні MVA/FPV вводять інтраназально. В інших варіантах реалізації винаходу, рекомбінантні MVA/FPV вводяться будь-яким іншим шляхом введення, який є відомим досвідченому лікарю. У додатковому варіанті реалізації винаходу, рекомбінантний MVA/FPV вводять внутрішньом'язово, бажано рекомбінантний MVA/FPV вводять внутрішньом'язово в об'ємі, що перебуває в діапазоні від близько 100 мкл до 10 мл, бажано який містить концентрації, наприклад, близько від 10^4 до 10^{10} вірусних частинок/мл. Бажано, рекомбінантний MVA/FPV вектор вводять в об'ємі, який знаходиться в діапазоні від 0,25 до 1,0 мл. Більш бажано, рекомбінантний MVA/FPV вектор вводять в об'ємі близько 0,5 мл.

Спосіб отримання рекомбінантного MVA/FPV вектора

Додаткові варіанти реалізації винаходу включають спосіб отримання рекомбінантного вектора MVA за будь-яким з варіантів реалізації винаходу чи антигенної детермінанти, яка експресована з генома зазначеного рекомбінантного вектора MVA, що включає в себе етапи, в яких:

а) інфікують клітину-господаря рекомбінантним вірусом MVA за будь-яким з варіантів реалізації винаходу або трансфікують клітину рекомбінантною ДНК рекомбінантного вірусу MVA за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, бажано з додаванням допоміжного вірусу для виробництва вірусних частинок MVA,

б) культивують інфіковану або трансфіковану клітину, і

в) ізолюють вірус MVA і/або антигенну детермінанту з вказаної клітини.

В іншому варіанті реалізації винаходу, винахід пов'язаний з рекомбінантним вірусом MVA

і/або антигенною детермінантою, які отримані за способом створення рекомбінантного вектора.

Додаткові варіанти реалізації винаходу включають спосіб отримання рекомбінантного вектора FPV за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, або антигенної детермінанти, яка експресована з генома зазначеного рекомбінантного вектора FPV, що включає етапи, в яких:

5 а) інфікують клітину-господаря рекомбінантним вірусом FPV за будь-яким з варіантів реалізації винаходу або трансфікують клітину рекомбінантною ДНК рекомбінантного вірусу FPV за будь-яким з варіантів реалізації винаходу, бажано з додаванням допоміжного вірусу для виробництва вірусних частинок FPV,

б) культивують інфіковану або трансфіковану клітину, і

10 в) ізолюють FPV вірус і/або антигенну детермінанту з вказаної клітини.

В іншому варіанті реалізації винаходу, винахід пов'язаний з рекомбінантним FPV вірусом і/або антигенною детермінантою, які отримані за способом створення рекомбінантного вектора.

В іншому варіанті реалізації винаходу, винахід пов'язаний із способом отримання рекомбінантного вектора MVA, що включає етапи, в яких:

15 а) інфікують клітину-господаря вірусом MVA,

б) трансфікують інфіковану клітину рекомбінантним вектором, який містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту будь-якого з філовірусних білків; зазначена нуклеотидна послідовність додатково містить геномну послідовність вірусу MVA, здатна направляти вбудовування щонайменше однієї нуклеотидної послідовності в геном вірусу MVA, і

20 в) ідентифікують, ізолюють і при необхідності очищують створений рекомбінантний вірус MVA.

В іншому варіанті реалізації винаходу, винахід пов'язаний зі способом отримання рекомбінантного вектора FPV, що включає етапи, в яких:

25 а) інфікують клітину-господаря вірусом FPV,

б) трансфікують інфіковану клітину рекомбінантним вектором, який містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенну детермінанту будь-якого з філовірусних білків; зазначена нуклеотидна послідовність додатково містить геномну послідовність вірусу FPV, здатна направляти вбудовування щонайменше однієї нуклеотидної послідовності в геном вірусу FPV, і

30 в) ідентифікують, ізолюють і при необхідності очищують створений рекомбінантний вірус FPV.

Інші варіанти реалізації винаходу будуть очевидні для фахівців в даній області при розгляді специфікації та практичній реалізації винаходу, як описано у цьому документі. Передбачається, що специфікація та приклади будуть розглядатися тільки як ілюстративні, при цьому справжній обсяг і суть винаходу вказуються у Формулі винаходу.

ПРИКЛАДИ

Детальні приклади, які слідує далі, призначені для сприяння кращому розумінню цього винаходу. Проте винахід не обмежується прикладами. Інші варіанти реалізації винаходу будуть очевидні для фахівців в цій області при розгляді специфікації та практичній реалізації винаходу, які описані у цьому документі.

Приклад 1: Конструювання рекомбінантного MVA

У наступних розділах описані конструкції рекомбінантних MVA, які містять одну або більше гетерологічних нуклеїнових кислот, що експресують антигенну детермінанту філовірусного глікопротеїну оболонки і/або додаткового філовірусного білка. Всі інші конструкції, які описані в цьому документі, створені з використанням аналогічних способів.

Конструювання MVA-mBN252B (PrS-GP-MARV-Musoke)

Повнорозмірна ДНК послідовність гена GP-MARV-Musoke природного походження (ізолят Lake Victoria) слугувала еталонною послідовністю для конструювання вакцини-кандидата MARV MVA-mBN252B. Нуклеотидна послідовність, яка кодує повнорозмірний GP-MARV-Musoke була синтезована в Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з використанням кодонів, які були оптимізовані для експресії в організмі людини, і для того, щоб звести до мінімуму або запобігти внутрішнім подіям гомологічної рекомбінації. Хоча кодонова оптимізація змінила послідовність ДНК дикого типу, кодон-оптимізована послідовність кодує амінокислотну послідовність, яка ідентична послідовності дикого типу GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:6; номер доступу NCBI-ABA87127.1). Експресія GP-MARV-Musoke керується за допомогою промотору PrS, синтетичного промотору, розробленого на основі ранніх і пізніх елементів промоторів вірусу вісповакцини (SEQ ID NO:23; див. також S. Chakrabarti et al., "Compact, Synthetic Vaccinia Virus Early/Late Promoter for Protein Expression", BioTechniques 23(6):1094-1097 (1997)). Кодон-оптимізований ген GP-MARV-Musoke був вбудований в геном MVA-BN за допомогою

стандартних способів (див. нижче), застосовуючи одну з декількох адаптованих рекомбінантних плазмід, які націлені на різні певні області генома MVA-BN, в тому числі і на сайти делецій або міжгенні (некодуючі) області (IGR).

Для того щоб вбудувати кодон-оптимізований ген GP-MARV-Musoke в геном MVA-BN, клітини курячих ембріональних фібробластів (клітини KEF) були інфіковані MVA-BN і згодом трансфіковані рекомбінаційною плазмідною рBN433 (Фіг. 5A). рBN433 містив кодон-оптимізований ген GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5 (ДНК), що кодує SEQ ID NO:6 (амінокислотна)) під контролем синтетичного PrS промотору, вбудованого за допомогою BspEI/NheI рестрикції в плазмиду рBNX197 (Фіг. 4B). PBN433 плазмід містить послідовності ДНК MVA-BN, які фланкують IGR 148/149 в геномі MVA-BN, і селекційну касету, яка фланкована сайтами loxP, які дозволяють наступне видалення касети за допомогою CRE рекомбіназо-опосередкованої рекомбінації. Після гомологічної рекомбінації між фланкуючими послідовностями в плазміді та гомологічними послідовностями в потрібному інсерційному сайті в геномі MVA-BN (тобто IGR 148/149), кодуєча частина плазмід була вбудована в потрібний сайт в геномі MVA-BN.

Після ампліфікації та клонування за допомогою методу бляшкоутворення (дев'ять пасажів; три з них включали клонування за допомогою методу бляшкоутворення) за селективних умов (мікофенолова кислота/ксантин і гіпоксантин), був отриманий рекомбінантний MVA-BN продукт, позначений як MVA-mBN252A (PreMaster A), що містить ген GP-MARV-Musoke. Рекомбінантний MVA-mBN252A PreMaster вихідний вірус був перевірений на викидання MVA-BN (батьківський вірус; дані не показані), на правильність послідовності вбудованого гена разом з інсерційними фланкуючими областями (за допомогою ген-специфічної ПЛР, застосовуючи праймери, специфічні для геномної MVA-BN послідовності, в яку був введений чужорідний ген; дані не показані), на відсутність мікроорганізмів (тест на стерильність; дані не показані), та на наявність і правильний розмір вставки (за допомогою секвенування; дані не показані). Також був визначений титр вихідного вірусу MVA-mBN252A PreMaster.

Наявність селекційної касети у вбудованій послідовності дозволяє виконувати позитивний відбір рекомбінантних вірусів MVA-BN в культурі. Щоб створити рекомбінантний MVA-mBN252B, селекційна касета була видалена з вихідного вірусу MVA-mBN252A PreMaster, застосовуючи систему Cre/loxP. Щоб видалити селекційну касету, KEF клітини, інфіковані рекомбінантним MVA-BN, що містить вставку плазмід рBN433 (наприклад, GP-MARV-Musoke під контролем PrS промотору, а також селекційна касета, яка фланкована loxP сайтами) були додатково трансфіковані за допомогою рBN274, плазмідною експресії, яка кодує CRE рекомбіназу (Фіг. 4B). Сайт-специфічна Cre-рекомбіназа каталізує точне вирізання послідовностей ДНК селекційної касети, яка фланкована цільовою послідовністю loxP, повністю видаляючи селекційну касету. Одержаний вірус був клонований за допомогою методу бляшкоутворення, при не селективних умовах (двадцять сім пасажів, дев'ять з них включали клонування за допомогою методу бляшкоутворення), та був виділений рекомбінантний вірус MVA-mBN252B, позбавлений селекційної касети. Повне видалення селекційної касети було підтверджено за допомогою "вкладеної" ПЛР (дані не показані). В результаті, експресія GP-MARV-Musoke за допомогою рекомбінантного MVA-mBN252B була підтверджена за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР; дані не показані).

Конструювання MVA-mBN226B (Мульти-антиген MVA-Filo)

Для всіх трансгенів, які були експресовані MVA-mBN226B, повнорозмірні ДНК послідовності генів природного походження служили еталонними послідовностями. Ці були синтезовані в Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з використанням кодонів, які були оптимізовані для експресії в організмі людини, і для того, щоб звести до мінімуму або запобігти внутрішнім подіям гомологічної рекомбінації. Оптимізація кодонів змінила послідовність ДНК дикого типу без зміни амінокислотної послідовності. MVA-mBN226B містить такі філовірусні гени: GP-SEBOV (SEQ ID NO:30); NP-EBOV-CdI (SEQ ID NO:28); GP-ZEBOV, штам Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga, SEQ ID NO:19) і GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5). GP-SEBOV і GP-MARV-Musoke експресуються під контролем PrS промотору (SEQ ID NO:23), NP-EBOV-CdI експресується під контролем PrLE1 або модифікованого PrLE1 промотору (SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:32), і GP-ZEBOV-Mayinga експресується під контролем Pr7.5 промотору (SEQ ID NO:25).

Промотор PrS є синтетичним промотором, який був розроблений на основі ранніх і пізніх елементів Vaccinia virus промоторів, який забезпечує експресію трансгену під час ранньої та пізньої фаз експресії генів. Аналогічним чином, Pr7.5 промотор з 7,5 кДа гена вірусу коров'ячої віспи є сильним раннім і пізнім промотором, і це означає, що трансгени під його контролем також будуть експресуватись під час ранньої та пізньої фаз експресії генів (SEQ ID NO:25; див. також M. A. Cochran et al., "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)). Промотор PrLE1 є штучним промотором, що складається з промотору вірусного включення А-типу вірусу коров'ячої віспи (ATI), злитого з п'ятьма оптимізованими ранніми елементами, які отримані з Pr7.5 (SEQ ID NO:27; див. також K. Baur et al., "Immediate-Early Expression of a Recombinant B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T-Cell Responses", J. Virol. 84(17):8743-8752 (2010)). Отже, NP-EBOV-CdI буде експресуватись під час ранньої та пізньої фаз експресії. Крім того, було показано, що PrLE1 викликає особливо сильну, клітинно-опосередковану імунну відповідь. При пасажуванні MVA-mBN226B, був втрачений один з п'яти ранніх елементів, які були отримані з Pr7.5, ймовірно, в результаті гомологічної рекомбінації; аналіз показав достатній рівень експресії NP-EBOV-CdI, проте (не показано), змінена конструкція була використана без заміни модифікованого промотору PrLE1.

Для вставки чужорідних генів у геном MVA-BN, було створено кілька рекомбінаційних плазмід, які націлені на різні області видалення і міжгенні області (IGR) генома MVA-BN. Для створення рекомбінантних MVA-BN продуктів, чужорідні послідовності інтересу можуть бути вбудовані в будь-який з цих базових векторів, наприклад, pBNX186 націлений на IGR 88/89 (див. Фіг. 4А) або pBNX197 націлений на IGR 148/149 (див. Фіг. 4Б), застосовуючи широко доступні ферменти рестрикції і звичайні методи молекулярної біології. Щоб отримати рекомбінантні ізоляти MVA-BN, які експресують потрібні трансгени, КЕФ клітини потім інфікували за допомогою MVA-BN, і потім трансфікували однією або кількома рекомбінаційними плазмідами, які експресують потрібний трансген або трансгени, і в тому числі селекційну касету, яка дозволяє проводити позитивний відбір рекомбінантних вірусів. В ході гомологічної рекомбінації, плазмідні фланкуючі послідовності рекомбінують з гомологічними послідовностями інсерційного сайту у вірусному геномі MVA-BN. Це введе до вбудовування плазмідних послідовностей в сайт, на який націлений базовий вектор, що застосований в якості вихідного матеріалу (наприклад, IGR 148/149, IGR 88/89 і т. д.) в геном MVA-BN. pBNX197 націлена на IGR 148/149 (Фіг. 4Б) і була застосована як початкова плазміда для конструювання остаточної рекомбінаційної плазмиди pBN384 (Фіг. 5Б). Плазміда pBN384 експресує GP-ZEBOV-Mayinga і GP-MARV-Musoke. pBNX 186 націлена на IGR 88/89 (Фіг. 4А) і була застосована як початкова плазміда для конструювання остаточної рекомбінаційної плазмиди pBN385 (Фіг. 5Б). Плазміда pBN385 експресує GP-SEBOV і NP-EBOV-CdI.

Щоб вбудувати трансгени GP-SEBOV, NP-EBOV-CdI, GP-ZEBOV-Mayinga, і GP-MARV-Musoke в MVA-BN, КЕФ клітини були інфіковані MVA-BN і згодом трансфіковані рекомбінаційними плазмідами pBN384 і pBN385. Після ампліфікації та клонування за допомогою методу бляшкоутворення (десять пасажів; три з них включали клонування за допомогою методу бляшкоутворення) при подвійних селективних умовах (мікофенолова кислота/ксантин і гіпоксантин також як і Geneticin), був отриманий рекомбінантний MVA-BN продукт, позначений як MVAmBN226A (Interim Premaster), що містить гени трьох глікопротеїнів, один нуклеопротеїн і дві селекційні касети. Рекомбінантний MVA-mBN226A PreMaster вихідний вірус був перевірений на викидання MVA-BN (батьківський вірус; дані не показані), на правильність послідовності вбудованого гена разом з інсерційними фланкуючими областями (за допомогою ген-специфічної ПЛР, застосовуючи праймери, які є специфічними для геномної MVA-BN послідовності, в яку був введений чужорідний ген; дані не показані), на відсутність мікроорганізмів (тест на стерильність; дані не показані), та на наявність і правильний розмір вставок (за допомогою секвенування; дані не показані). Також був визначений титр вихідного вірусу MVA-mBN252A PreMaster.

Після додаткової ампліфікації, видалення селекційної касети та клонування за допомогою методу бляшкоутворення при неселективних умовах (двадцять пасажів, шість з них включали клонування за допомогою методу бляшкоутворення), був виділений рекомбінантний вірус MVA-mBN226B, позбавлений селекційних касет. Повне усунення селекційних касет було підтверджено за допомогою "вкладеної" ПЛР (дані не показані). В результаті, експресія трансгену за допомогою рекомбінантного MVA-mBN226B була підтверджена за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР; дані не показані).

Конструювання MVA-mBN254A (MVA-GP-ZEBOV)

Для GP-ZEBOV трансгена, який був експресований з MVA-mBN254A, повнорозмірна ДНК послідовність гена природного походження слугувала в якості еталонної послідовності. GP-ZEBOV були синтезовані в Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з використанням кодонів, які були оптимізовані для експресії в організмі людини, і для того, щоб звести до мінімуму або запобігти внутрішнім подіям гомологічної рекомбінації, як описано вище у "Конструювання MVA-mBN226B". Оптимізація кодонів змінила послідовність ДНК дикого типу без зміни амінокислотної

послідовності. GP-ZEBOV-Mayinga експресувався під контролем PrS5E промотору (SEQ ID NO:24).

PrS5E (SEQ ID NO:24) є штучним сильним раннім і пізнім промотором, який був розроблений на основі штучного раннього і пізнього промотору (Chakrabarti et al., 1997) після якого йдуть 5
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

ранніх елементів Pr7.5 промотору з 7,5 кДа гена вірусу вісповакцини (SEQ ID NO:25; див. також M.A. Cochran et al., "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)). PrS5E промотор описаний більш детально в патентній заявці WO 2013/189611A1.

Для вбудовування чужорідних генів у геном MVA-BN, було створено кілька рекомбінаційних плазмід, які націлені на різні області видалення і міжгенні області (IGR) генома MVA-BN. Для створення рекомбінантних MVA-BN продуктів, чужорідні послідовності інтересу можуть бути вбудовані в будь-який з цих базових векторів, наприклад, pBNX197 націлений на IGR 148/149 (див. Фіг. 4Б), застосовуючи широко доступні ферменти рестрикції і звичайні методи молекулярної біології. Щоб отримати рекомбінантні ізоляти MVA-BN, які експресують потрібні трансгени, КЕФ клітини потім інфікували за допомогою MVA-BN, і потім трансфікували однією або кількома рекомбінаційними плазмідами, які експресують потрібний трансген або трансгени, і в тому числі селекційну касету, яка дозволяє проводити позитивний відбір рекомбінантних вірусів. В ході гомологічної рекомбінації, плазмідні фланкуючі послідовності рекомбінують з гомологічними послідовностями інсерційного сайту у вірусному геномі MVA-BN. Це введе до вбудовування цільових послідовностей в сайт, на який націлений базовий вектор, що був застосований в якості вихідного матеріалу (наприклад, IGR 148/149), в геном MVA-BN. pBNX197 націлена на IGR 148/149 (Фіг. 4Б) і була застосована як початкова плазміда для конструювання остаточної рекомбінаційної плазмиди pBN436 (Фіг. 5Г). Плазміда pBN436 містить GP-ZEBOV-Mayinga.

Щоб вбудувати трансген GP-ZEBOV-Mayinga в MVA-BN, КЕФ клітини були інфіковані MVA-BN, і згодом трансфіковані рекомбінаційною плазмідною pBN436 (Фіг. 5Г). Після ампліфікації та клонування за допомогою методу бляшкоутворення (дев'ять пасажів; включаючи три з клонуванням за допомогою методу бляшкоутворення) при селективних умовах (мікофенолова кислота/ксантин і гіпоксантин), був отриманий рекомбінантний MVA-BN продукт, позначений як MVA-mBN254A (Premaster), що містить ген GP-ZEBOV-Mayinga і злитий ген GPT-RFP, в якості маркера селекції (Фіг. 3В). Рекомбінантний MVA-mBN254A PreMaster вихідний вірус був перевірений на видалення MVA-BN (батьківський вірус; дані не показані), на правильність послідовності вставленого гена разом з інсерційними фланкуючими областями (за допомогою ген-специфічної ПЛР, застосовуючи праймери, специфічні для геномної послідовності MVA-BN, в яку був введений чужорідний ген; дані не показані), на відсутність мікроорганізмів (тест на стерильність; дані не показані), та на наявність і правильний розмір вставок (за допомогою секвенування; дані не показані). Також був визначений титр вихідного вірусу MVA-mBN254A PreMaster. В результаті, експресія трансгену рекомбінантним MVA-mBN254A була підтверджена за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР; дані не показані).

Інші конструкції були створені відповідним способом. Зокрема, MVA-mBN255 експресував NP-EBOV-CdI (SEQ ID NO:28) під контролем PrS промотору, що був вбудований в IGR 88/99, VP40 ZEBOV (SEQ ID NO:33) під контролем PrS промотору в IGR 136/137 і GP-ZEBOV (SEQ ID NO:19) під контролем PrS5E промотору в IGR 148/149 (Фіг. 13).

Конструювання FPV-mBN368A (FPV-GP-ZEBOV) і FPV-mBN391 (FPV-multi-filo)

Для GP-ZEBOV трансгену, який був експресований з FPV-mBN368A, повнорозмірна ДНК послідовність гена природного походження слугувала в якості еталонної послідовності. Ген GP-ZEBOV були синтезовані в Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з використанням кодонів, які були оптимізовані для експресії в організмі людини, як описано вище у "Конструювання MVA-mBN226B". Оптимізація кодонів змінила послідовність ДНК дикого типу без зміни амінокислотної послідовності. GP-ZEBOV-Mayinga експресувався під контролем промотору FPV-40K (SEQ ID NO:26). FPV-40K промотор є послідовністю промотору FPV-кодуючої послідовності 40K білка в FPV.

Для вбудовування чужорідних генів у геном FPV, було створено кілька рекомбінаційних плазмід, які націлені на різні сайти вбудовування генома FPV. Для створення рекомбінантних FPV продуктів, чужорідні послідовності інтересу можуть бути вбудовані в будь-який з цих базових векторів, наприклад, pBNX221 націлений на інсерційний сайт BamHI J (див. Фіг. 4Г), застосовуючи широко доступні ферменти рестрикції і звичайні методи молекулярної біології. Щоб отримати рекомбінантні FPV ізоляти, які експресують потрібні трансгени, КЕФ клітини потім інфікували FPV, і потім трансфікували однією або кількома рекомбінаційними плазмідами, які експресують потрібний трансген або трансгени, і в тому числі селекційні касети, що дозволяють

проводити позитивний відбір рекомбінантних вірусів. В ході гомологічної рекомбінації, плазмідні фланкуючі послідовності рекомбінують з гомологічними послідовностями інсерційного сайту в FPV вірусному геномі. Це введе до вбудовування цільових послідовностей в сайт, на який націлений базовий вектор, який був застосований в якості вихідного матеріалу (наприклад, інсерційний сайт BamHI J), в геномі FPV. pBNX221 націлена на інсерційний сайт BamHI J (Фіг. 4Г) і була застосована як початкова плазміда для конструювання остаточної рекомбінаційної плазмиди pBN555 (Фіг. 5Д). Плазміда pBN555 містить GP-ZEBOV-Mayinga під контролем FPV-40K промотору.

Щоб вбудувати трансген GP-ZEBOV-Mayinga в FPV, КЕФ клітини були інфіковані FPV, і згодом трансфіковані рекомбінаційною плазмідною pBN555 (Фіг. 5Д). Після ампліфікації та клонування за допомогою методу бляшкоутворення (тринадцять пасажів; включаючи чотири з клонуванням за допомогою методу бляшкоутворення) при селективних умовах (мікофенолова кислота/ксантин), був отриманий рекомбінантний MVA-BN продукт, позначений як FPV-mBN368A (Premaster), що містить ген GP-ZEBOV-Mayinga і злитий ген GPT-RFP, в якості маркера селекції (Фіг. 3Г). Рекомбінантний FPV-mBN368A PreMaster вихідний вірус був перевірений на видалення FPV (батьківський вірус; дані не показані), на правильність послідовності вбудованого гена разом з інсерційними фланкуючими областями (за допомогою ген-специфічної ПЛР, застосовуючи праймери, які є специфічними для геномної FPV послідовності, в яку був введений чужорідний ген; дані не показані), на відсутність мікроорганізмів (тест на стерильність; дані не показані), та на наявність і правильний розмір вставок FPV (за допомогою секвенування; дані не показані). Також був визначений титр вихідного вірусу FPV-mBN368A PreMaster. В результаті, експресія трансгену рекомбінантним FPV-mBN368A була підтверджена за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією (ВІД-ПЛР; дані не показані).

Додатково віспи курей конструкції були створені застосовуючи FP14 (IGR 60/61) і BamHI J області для вбудовування згідно способу, як описано вище. FPV-mBN391 експресувала GP-ZEBOV (SEQ ID NO:19 і 20) під контролем FPV-40K промотору (SEQ ID NO:26), GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5 і 6) під контролем PrS промотору (SEQ ID NO:23), обидва в FP14 сайті, і GP-MARV-Angola (SEQ ID NO:36 і 37) під контролем Pr13.5 довгого промотору (SEQ ID NO:35), GP-SEBOV (SEQ ID NO:30 і 31) під контролем FPV-40K промотору та NP-EBOV-Cdl (SEQ ID NO:28 і 29) під контролем PrLE1 промотору (SEQ ID NO:27), всі три були вбудовані в BamHI J область у порядку згадування.

Приклад 2: MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B) у нижчих приматів

Імуногенність і захисна ефективність MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B) була проаналізована в моделі зараження яванських макак вірусами Ебола і Марбург. Мавп розмістили і годували згідно з відповідними інституційними рекомендаціями з догляду і годівлі лабораторних тварин.

Дизайн експерименту наведено в Таблиці 1 нижче.

Таблиця 1:

Протокол вакцинації для MVA-BN-Filo в яванських макак.

Група	Розмір Групи	Тестування/Пункти протоколу введення				Вірус для зараження Введення	
		Вакцинація	Доза на кожне введення	Шлях введення	Розклад (Дні)	Вірус	Розклад (День)
1	1	Контроль носія (ТСБ)	-	підшкірно	0 і 28	EBOV	42
2	1	Контроль носія (ТСБ)	-	підшкірно	0 и 28	MARV	42
3	3	MVA-BN [®] -filo	5 × 10 ⁸ ІДКТ ₅₀	підшкірно	0 і 28	EBOV	42
4	3	MVA-BN [®] -filo	5 × 10 ⁸ ІДКТ ₅₀	підшкірно	0 і 28	MARV	42

Внутрішньом'язове введення (1,000 pfu) або штаму Zaire EBOV або штаму Musoke MARV; всі тварини які вижили підлягали евтаназії в День 63.

О'єм дози становив 0,5 мл для групи контролю і групи вакцинації, всі щеплення були виконані шляхом підшкірних ін'єкцій. Перший день вакцинації позначений як День 0. Всі тварини

отримали дозу збудника від 1,000 pfu ZEBOV (Групи 1 і 3) або MARV-Musoke (Групи 2 і 4) за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції в День 42. Всі тварини які вижили підлягали евтаназії в День 63.

5 GP-специфічні антитіла були виміряні методом імуноферментного аналізу. Як і очікувалося, невакциновані контрольні тварини, що були заражені MARV-Musoke, не мали GP-MARV-специфічних антитіл при перевірці в будь-який час до зараження (тобто, в День 0, День 28 та 36 (дані не показані) і захворіли. В той же час, дві з трьох тварин, які були вакциновані MVA-BN-Filo (номери тварин 30766 і 30768) мали низький GP-MARV титр антитіл через 28 днів після першого щеплення (після першого щеплення; див. також Фіг. 6), і кожна з трьох вакцинованих тварин 10 продемонструвала явну посилену імунну відповідь через вісім днів після другого щеплення (після бустерної вакцинації; див. Фіг. 6). Всі три тварини пережили в іншому випадку летальне внутрішньом'язове зараження MARV-Musoke.

Аналогічним чином, невакциновані контрольні тварини, які були заражені ZEBOV, були негативними за GP-ZEBOV-специфічним антитілам, в усіх часових точках тестування (дані не показані). Контрольна тварина, також як і вакциновані тварини, захворіла, після зараження ZEBOV за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Дивно, але всі три вакциновані тварини, продукували GP-ZEBOV-специфічні антитіла перед зараженням, на рівнях, більших за величиною, ніж ті, які були виміряні в гіперімунній сироватці, які були продукуювані в нижчих приматів при вакцинації ZEBOV-GP. Були виконані повні розтини, тканину розміщували в 10 % 20 нейтральному забуференому формаліні в момент смерті. Зрізи тканин були оброблені за допомогою стандартних методів, зрізи були виконані товщиною 5 мкм, і пофарбовані гематоксиліном та еозином для гістологічного дослідження. Результати узагальнені у Таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Гістологічна оцінка вакцинованих і контрольних тварин.

Тварина №	30763	30766	30765	30768	30764	30770	30769	30767
Розтин	N11-05	N11-04	N11-06	N11-10	N11-07	N11-08	N11-09	N11-03
Зараження	Марбург	Марбург	Марбург	Марбург	Ебола	Ебола	Ебола	Ебола
Експериментальна група	контроль	вакцина	вакцина	вакцина	контроль	контроль	контроль	контроль
Вживаність	9 д Є	21 д	21 д	21 д	5 д (У)	7 д (СС)	6 д (У)	6 д (У)
Печінка:								
множинні ураження печінки								
некроз	++	-	-	-	+	++	++	-
васкуліт	+	++*	-	++*	-	-	-	-
Легені:								
внутрішньо-альвеолярний набряк	+	-	-	-	+	+	+	-
септальний набряк	+	-	-	-	+	+	+	-
крововилив	+	-	-	-	+	+	-	-
інтерстиціальний пневмоніт	-	-	-	-	-	+++	++	-
Селезінка:								
гіперплазія	-	++	+++	+++	-	-	-	-
виснаження лімфоїдної тканини	++	-	-	-	++	+++	+++	++
фібринові відкладення в червоній пульпі селезінки	+++	-	-	-	++	+++	+	++
селезінковий васкуліт	+++	-	-	-	++	++	+	++
Пахові лімфатичні вузли:								

інфільтрація макрофагів	++	-	++	-	+	+	+	+++
виснаження лімфоїдної тканини	+++	-	-	-	+++	+++	++	-
Пахвові лімфатичні вузли:								
інфільтрація макрофагів	-	-	-	-	-	-	-	-
виснаження лімфоїдної тканини	+	-	-	-	++	++	++	+
Брижові лімфатичні вузли:								
інфільтрація макрофагів	-	-	-	-	-	-	-	-
виснаження лімфоїдної тканини	++	-	-	-	++	++	++	+
Надпирник:								
некроз	-	-	-	-	+++	++	-	-

* васкуліт у тварин 30766 і 30768, мабуть, вже був в наявності. У - піддані евтаназії; СС - спонтанна смерть

5 Аналіз підтвердив типові симптоми геморагічної лихоманки в MARV-Musoke-інфікованих, невакцинованих контрольних тварин, а також у всіх ZEBOV-заражених тварин, у той час як вакциновані тварини, які були заражені MARV-Musoke, продемонстрували кілька гістологічних змін, за винятком селезінкової гіперплазії, яка узгоджується з імунною відповіддю після зараження і В-клітинною гіперплазією.

10 Результати експерименту представлені на Фіг. 7. Фіг. 7А ілюструє, що вакцинація за допомогою MVA-BN-Filo захищала 100 % тварин від зараження MARV-Musoke. Фіг. 7Б ілюструє клінічні показники після зараження; вакциновані тварини, заражені MARV-Musoke, не продемонстрували жодних симптомів або гістологічних змін, які пов'язані з геморагічною лихоманкою, і не містили вірус в печінці, селезінці, надпирниках, лімфатичних вузлах або легенях.

15 Приклад 3: MVA-BN-Filo в нижчих приматах

У цьому експерименті тестували MVA-BN-Filo на нижчих приматах за аналогічним протоколом дослідження, як описано в Прикладі 2, але зараження проводили іншим штамом вірусу Марбург, тобто Marburg-Angola замість Marburg-Musoke в Прикладі 2.

Таблиця 3

Дизайн дослідження та результати для MVA-BN-Filo в нижчих приматах.

Група	N	Випробування/Протокол контрольного введення			Зараження	Вживання
		Вакцинація	Доза	Розклад		
1	2	MVA-BN® Filo	5×10^8 ІДКТ ₅₀	0, 28	Marburg Angola День 56	2/2
2	3	MVA-BN® MARV-IL15sushi	1×10^8 ІДКТ ₅₀			2/3
3	3	MVA-BN® MARV-CD40L	1×10^8 ІДКТ ₅₀			3/3
4	3	MVA-BN® MARV-TRICOM	1×10^8 ІДКТ ₅₀			2/3
5	1	ТСБ	n/a			0/1

20

Внутрішньом'язове зараження (1,000 pfu) штамом MARV Angola; тварини які вижили були піддані евтаназії у День 70 Таблиця 3 показує, що MVA-BN-Filo повністю захищає нижчих приматів від штаму Angola вірусу Марбург. На відміну від цього, невакциновані тварини в групі 5 захворіли. Це також показує, що захисна ефективність залежить від дози, оскільки доза в 5 разів менша, застосовуючи MVA-BN-MARV, який також кодує GP вірусу Марбург, лише частково є захисною, до тих пір, поки він експресує CD40L як ко-стимулюючу молекулу. Всі щеплені кандидати продукують специфічні антитіла для вектора MVA (Vaccinia специфічні антитіла), а

25

також антитіла, специфічні для MARV GP вставки, як показано в Таблиці 4.

Таблиця 4:

Антитіла, індуковані MVA-BN-Filo в нижчих приматів.

День 35	MVA-Multivalent	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

Приклад 4: Гетерологічне примування/бустування

У цьому експерименті протестували комбінацію рекомбінантного MVA і рекомбінантного FPV в примуючих/бустуючих імунізаціях.

H-2K^bB6CBA F1 миші (Janvier Labs, Франція) були імунізовані підшкірно (підшкірно) за допомогою 5×10^7 ИДКТ₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN254A, Фіг. 3В) або FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPVmBN368A, Фіг. 3Г). Доза вірусу була введена в обидві бічні поверхні живота в загальному об'ємі 100 мкл/сторона.

Для виявлення ZEBOV-GP-специфічних IgG, 96-лункові планшети (Корнінг, штат Массачусетс, США) були покриті ZEBOV GP антигеном (IBT Bioservices, Меріленд, США) при 4 °C протягом ночі. Дублікати двукратних розведень сироватки були додані у вимиті і блоковані планшети, було застосовано IgG-ПХ анти-миша-вівця антитіло (AbD Serotec, Великобританія) в якості антитіла виявлення. Субстрат ТМВ був доданий на 30 хвилин при кімнатній температурі, і реакцію зупиняли додаванням 1М розчину H₂SO₄. Абсорбцію вимірювали при 450 нм. Мишачі моноклональні антитіла 13F6 були використані в якості стандарту для розрахунку концентрації ZEBOV-GP IgG в сироватці крові.

Лімфоцити миші були свіжо виділені з селезінки за допомогою обережного подрібнення і продавлювання тканини через 70 мкм клітинне сито (BD Bioscience, Каліфорнія, США). Після лізису еритроцитів, клітини інкубували з 5 мкг/мл ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ пептиду (TELRTFSI) (GenScript, Нью-Джерсі, США) протягом 6 годин при 37 °C у повному RPMI в присутності 10 мкг/мл брэфелдину А і CD107a-FITC. Для розпізнавання живого/неживого, клітини фарбували за допомогою Zombie Aqua™ Fixable Viability kit (BioLegend, Каліфорнія, США). Внутрішньоклітинне фарбування ІФН-γ і ФНП-α проводили після поверхневого фарбування CD4-BV605, CD8α-BV421 (BioLegend, Каліфорнія, США) і CD44-APC-eFluor780 (eBioscience, Каліфорнія, США) і фіксацію/пермеабілізацію згідно інструкцій виробника (BD Cytofix/Сytoperm, BD Biosciences). Всі клітини були отримані за допомогою цифрової проточної цитометрії (LSR II, BD Biosciences, Каліфорнія, США) і дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення FlowJo (FlowJo, Орегон, США).

Чотири можливі комбінації рекомбінантних MVA і FPV примуючих/бустуючих імунізацій були протестовані в H-2K^bCBAB6 F1 мишах, тому що сильний CD8 Т-клітинний епітоп із штаму глікопротеїну (GP) Zaire вірусу Ебола (ZEBOV) був описаний для цього гаплотипу МНС класу I, а саме GP₅₇₇₋₅₈₄ (TELRTFSI) (Rao et al., Vaccine 17(23-24):2991-8 (1999)). Концентрацію в сироватці ZEBOV-GP-специфічних IgG аналізували у День 21 і День 41 після підшкірної імунізації в День 0 і 21. У той час як в День 21 всі MVA-імунізовані миші мали надійні титри IgG, лише 20 % від FPV-імунізованих мишей мали сероконверсію. Після другої імунізації, всі тварини були серопозитивними за ZEBOV-GP-специфічними IgG. Найбільш низькі титри спостерігалися після гомологічної імунізації за допомогою FPV. Між тваринами, які були імунізовані двічі за допомогою MVA, і тими, які були примовані за допомогою FPV, та які були бустовані за допомогою MVA, не було виявлено жодної різниці в концентрації GP-специфічних IgG в День 41. Миші, які були примовані за допомогою MVA, та які були бустовані FPV, проте, мали трохи більш високі титри, ніж всі інші групи в День 41 (Фіг. 8А).

Цікаво, що така ж комбінація, яка призводила до сильної імунної відповіді, також викликала сильну CD8 Т-клітинну відповідь. Знову ж таки, гомологічна імунізація за допомогою FPV призводила до слабкої CTL відповіді, за якою слідували MVA-MVA і FPV-MVA імунізації. Примування за допомогою MVA, після якого слідувало бустування за допомогою FPV, індукували ~ в 5 разів більше цитотоксичних CD8 Т-клітин, ніж при гомологічній комбінації 2× MVA (Фіг. 8Б).

Взяті разом, ці дані дають змогу припустити, що гетерологічна імунізація за допомогою першого MVA і другого FPV, викликає найсильнішу ZEBOV-GP-специфічну гуморальну

відповідь, а також найсильнішу CTL відповідь, що продемонстровано присутністю високофункціональних CD8 Т-клітин.

Приклад 5: Посилена ZEBOV-GP специфічна CD8 Т-клітинна відповідь

Н-2Kk+CBA миші були імунізовані підшкірно за допомогою 5×10^7 ІДКТ₅₀ MVA або FPV в День 0 і 21 День. Миші (5 у кожній групі) були принесені в жертву в День 42 для Т-клітинного аналізу шляхом внутрішньоклітинного фарбування цитокінів спленоцитів. Були застосовані такі примуючі/бустуючі режими: 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). Дані представлені на Фіг. 9.

Реакції CD8 Т-клітин селезінки були проаналізовані в День 42 після стандартних 6 годин *in vitro* повторної стимуляції за допомогою 5 мкг/мл ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ пептиду (TELRTFSI) у присутності 10 мкг/мл берефелдину А і анти-CD107a-FITC. Клітини були пофарбовані за допомогою анти-CD4-BV605, анти-CD8-BV421, CD44-APC-eFluor780 і внутрішньоклітинно пофарбовані за допомогою анти-IFN- γ -PECy7 і анти-TNF- α -PerCP-eFluor710. Розпізнавання живий/мертвий було виконано за допомогою LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit згідно інструкції виробника (Life Technologies). Гістограми показують загальну кількість CD107a+, ІНФ- γ + та ФНП- α + CD8 Т клітин. Показано середнє $\pm$ стандартна помилка середнього по 5 мишей/група. CD8 Т-клітинна відповідь проти ZEBOV-GP-похідного пептиду TELFRTSI була посилена приблизно у два рази, коли MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 був застосований як примуюча конструкція в MVA-FPV гетерологічному примуючому-бустуючому режимі у порівнянні з MVA-ZEBOV-GP (mBN254) або MVA-multi-filo (MVA-mBN226) в якості конструкцій для примування (Фіг. 9).

Приклад 6: Посилений захист нижчих приматів проти ZEBOV після вакцинації за допомогою MVA-GP-VP40

Яванські макаки (*Macaca fascicularis*) були вакциновані двічі (в День 0 і 28) підшкірно дозою 5×10^8 ІДКТ₅₀ або MVA-BN-ZEBOV/GP (n=3), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (n=3), або отримували Трис-сольовий буферний розчин (ТСБ) в якості негативного контролю (плацебо група, n=2). До вакцинації і за тиждень до контрольного зараження (Дні 7, 14, 21, 28, 35 і 40) була зібрана сироватка крові для аналізу за допомогою імуноферментного аналізу, специфічного для глікопротеїну (GP) Ebola virus Zaire і специфічного для спинно-мозкового MVA. Через чотири тижні після повторної вакцинації, тварини були заражені Ebola virus Zaire (штам Kikwit), за допомогою внутрішньом'язового введення близько 1000 pfu.

Таблиця 5:

Дизайн дослідження:

Група	Вакцинація			Зараження		Вижива-ння
	Вакцина	Доза	Розклад (Курс)	Вірус	Розклад	
1	MVA-BN-ZEBOV/GP	5×10^8 ІДКТ ₅₀	День 0+28 (підшкірно)	ZEBOV Kikwit Близько 1000 pfu внутріш-ньо-м'язово	4 тижня після останньої вакцинації	0/3
2	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 ІДКТ ₅₀	День 0+28 (підшкірно)			2/3
3	ТСБ-контроль	n/a	День 0+28 (підшкірно)			0/2

Zaire Ebola virus (ZEBOV)-специфічний імуноферментний аналіз

Був виконаний імуноферментний аналіз для визначення ZEBOV/GP-специфічних антитіл, які були імібілізовані за допомогою рекомбінантного ZEBOV/GP, і детекція виконувалася за допомогою пероксидази хрому (ПХ), кон'югованої з антитілами проти NHP IgG. Кількість зв'язаних ПХ-мічених антитіл була поражена після субстратної реакції, в якості значення оптичної густини (ОГ) при 450 нм. Концентрація антитіл була розрахована згідно регресійного аналізу з чотирма параметрами, і на основі стандартної кривої з застосуванням моноклональних антитіл миші.

Результати ІФА представлені на Фіг. 10. Всі тварини які були вакциновані MVA-BN-ZEBOV/GP або MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 конструктами мали спинномозкові- і ZEBOV-специфічні антитіла, які можна було виявити, вже після примуючої вакцинації, і гуморальні відповіді були підвищені другою вакцинацією.

У другому дослідженні яванські макаки (*Macaca fascicularis*) були вакциновані тричі (День 0,

- 28 і 56) підшкірно дозою 5×10^8 ІДКТ₅₀ або MVA-BN-multi-filo (MVA-mBN226, n=2), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255, n=2), або отримували Трис-сольовий буферний розчин (ТСБ) в якості негативного контролю (плацебо група, n=2). До вакцинації і за тиждень до контрольного зараження (Дні 0, 27, 41, 55, 35, 67) була зібрана сироватка крові для аналізу за допомогою Ebola virus Zaire глікопротеїн (GP)-специфічного нейтралізуючого аналізу (Фіг. 11). Через чотири тижні після останньої вакцинації, тварини були заражені вірусом Ebola virus Zaire (штам Kikwit), за допомогою внутрішньом'язового введення близько 100 pfu.

Таблиця 6:

Дизайн дослідження:

Група	Вакцинація				Зараження Розклад	Виживання
	Вакцина	Доза	Розклад	Вірус		
1	Негативний контроль	n/a	День 0+56	ZEBOV Kikwit близько 100 pfu внутрішньом'язово	4 тижні після останньої вакцинації	0/2
2	MVA-BN-multi-filo	5×10^8 ІДКТ ₅₀	День 0+28+56			0/2
3	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 ІДКТ ₅₀	День 0+28+56			2/2

- Вакцинація за допомогою MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 привела до продукування нейтралізуючих антитіл, що виявляються відразу ж після вакцинації примування, в той час як MVA-BN-multi-filo не викликав продукування нейтралізуючих антитіл на рівні, який можна виявити, після примування в День 27 (Фіг. 11). Тварини, які були вакциновані MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40, мали більш високі титри нейтралізуючих антитіл, ніж MVA-BN-multi-filo вакциновані тварини, у всіх часових точках аналізу. Після ZEBOV зараження MVA-BN-multi-filo захворіли до 7 дня після контрольного зараження, тоді як MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 вакциновані тварини вижили без симптомів або тимчасових епізодів лихоманки.

Приклад 7: формування ВПЧ і експресія білків VP40 і GP

- Клітини лінії HeLa були інфіковані зазначеними вірусами при MOI, який дорівнює 10. Після двох днів інфекції, супернатанти збирали, і потім ВПЧ в очищених супернатантах (CH) були осаджені через 20 % шар сахарози шляхом ультрацентрифугування (УЦ-CH). Клітинні лізати були приготовлені шляхом прямого лізису клітин в буфері 1x Laemmli. Клітинні лізати розбавляли 1:5 до розділення за допомогою SDS-PAGE для імуноблотингу. УЦ-CH не розбавляли перед SDS-PAGE. ZEBOV-GP було виявлено за допомогою моноклонального антитіла миші (клон 6D8) з USAMRIID, і ZEBOV-VP40 було виявлено за допомогою очищеного поліклонального антитіла кролика від IBT Bioservices.

- Експресія GP і VP40 була підтверджена у свіжих препаратах за допомогою імуноблотингу. Обидва білки були присутні в клітинних лізатах, а також були збагачені при УЦ-CH (Фіг. 12В). Відомо, що експресії матричного білка VP40 достатньо для формування ВПЧ, і не надходило інформації про пряму взаємодію білка VP40 і білка GP. Щоб показати, що GP дійсно включений у ВПЧ разом з VP40, GP був імунопреципітований з CH інфікованих клітин. Для цього, клітини лінії HeLa були заражені MVA-ZEBOV/GP-VP40, контрольні клітини - MVA-ZEBOV/GP і BAC-отримані MVA wt. BAC-отримані MVA wt були описані раніше в Meisinger-Henschel et al (Meisinger-Henschel et al. (2010), J Virol. 84(19):9907-9919). CH із заражених клітин піддавали імунопреципітації (ІП) за допомогою анти-GP-специфічного антитіла. CH аліквоти були оброблені 1 % Triton X-100 (TX-100) впродовж 30 хвилин до імунопреципітації, яка, як було показано раніше, руйнує більшість зрілих упакованих ВПЧ вірусу лейкозу мишей (Davidoff et al. (2012), Virology 433(2):401-409).

- Потім ІП-комплекси були проаналізовані за допомогою імуноблотингу на наявність GP і ко-осадженого VP40. Для імунопреципітації (ІП), очищені CH інкубували з анти-ZEBOV-GP (клон 6D8, USAMRIID) антитілами разом з Protein G-Agarose (10 мкл) при 4 °C протягом ночі. Імуноблоти імунопреципітатів потім інкубували з антитілами до ZEBOV-GP (моноклональне антитіло 6D8) і ZEBOV-VP40 (IBT). GP білок був ефективно імунопреципітований з супернатанту клітин, що експресують лише GP (Фіг. 12Г, верхня панель), і експресія не залежить від наявності VP40. Важливо, VP40 імунопреципітувалось разом з GP з супернатантів MVA-ZEBOV/GP-VP40 заражених клітин лише у відсутності TX-100 (Фіг. 12Г, нижня панель, лінія 2), вказуючи на те, що GP дійсно були включені в вірусоподібні частинки. Оскільки передбачається, що TX-100 руйнує

ВПЧ, і оскільки не існує прямої GP-VP40 взаємодії, VP40 не може бути ко-преципітовано в TX-100-оброблених зразках (Фіг. 12Г, нижня панель, лінія 4). Таким чином, було показано, що дійсно, ВПЧ які представляють GP, були продукovanі після зараження рекомбінантними MVA.

Приклад 8: формування ВПЧ в 293Т/17

Є можливим отримати більш високі концентрації ВПЧ після зараження клітин, 293Т/17 клітини для приготування свіжих ВПЧ. Білковий вміст препаратів було проаналізовано на наявність GP і VP40 за допомогою Вестерн-Блотингу.

293Т/17 клітини в Т175 культуральних чашках були заражені зазначеними вірусами при MOI, який дорівнював 10. Супернатанти збирали 24 години після зараження, і, або безпосередньо змішували з трьохкратним буфером для нанесення (сирий СН), або концентрували через 20 % шар сахарози (УЦ-пригот.). Клітинні лізати (КЛ) були підготовлені в одноразовому буфері для нанесення. Білки були розділені за розміром за допомогою денатуруючого SDS-PAGE. Імуноблоти інкубували з анти-GP антитілом (клон 6D8, 1:2500, USAMRIID) або анти-VP40 антитілом (поліклональне, 1:1000, IBT) і були оброблені застосовуючи хемілюмінісцентний субстрат.

Експресію глікопротеїну EBOV (GP) було легко виявити після зараження клітин MVA-ZEBOV/GP і MVA-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-filo-VLP), VP40 після зараження MVA-filo-VLP, обидва в клітинному лізаті (КЛ) і супернатанті (СН) із заражених клітин. Несподівано виявилось, що MVA-ZEBOV/GP-заражені клітини експресують більше GP у порівнянні з клітинами, які були заражені MVA-filo-VLP, в той час як при зараженні MVA-filo-VLP було знайдено більше GP в СН. Це, можливо, відображає той факт, що з MVA-filo-VLP, ко-експресія GP і VP40 посилює вивільнення GP (у формі ВПЧ) із заражених клітин. Обидва, GP та VP40 білки були представлені в УЦ-прегот., вказуючи на те, що GP і VP40 були зібрані УЦ. Деякі GP і також VP40 раніше були присутні в СН після УЦ, хоча й у меншій кількості в порівнянні з неочищеним СН, що особливо актуально для VP40. Таким чином, VP40 - головним чином присутній у формі ВПЧ, разом з GP - значною мірою вичерпаний з СН, у той час як частини GP пулу (можливо, у вигляді плеоморфних часток) залишаються в СН після УЦ.

Трансмійсна електронна мікроскопія (ТЕМ) та імуно-електронно-мікроскопічний аналіз ВПЧ з 293Т/17 клітин показали, що MVA-filo-ВПЧ продукovanі відповідним MVA рекомбінантом, були щільно декоровані GP, GP шипами, які вистилають всю поверхню filo-ВПЧ. Крім того, препарати з клітин, інфікованих MVA-wt або MVA-ZEBOV/GP, були проаналізовані за допомогою імуно-ЕМ; вірусоподібні частинки були виявлені в цих пробах.

Приклад 9: Імуногенність гетерологічної примуючої-бустуючої імунізації в нижчих приматів

Чотири яванських макака були щеплені (підшкірно) в День 0 і 28. Дві тварини отримали в якості примуючої дози 5×10^8 ІДКТ₅₀ MVA-mBN226 в День 0 і в якості бустуючої дози 1×10^9 ІДКТ₅₀ FPV-mBN368 в День 28. Одна тварина отримала в якості примуючої дози 1×10^9 ІДКТ₅₀ FPV-mBN368 в День 0 і в якості бустуючої дози 5×10^8 ІДКТ₅₀ MVA-mBN226. Одна контрольна тварина отримала лише ТСБ. У День 0, 7, 28, 35 і 49 були ізольовані моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК). Кров була зібрана в День 0, 28 і 49 для гематології, клінічної хімії, параметрів коагуляції, ізоляції МКПК або сироватки для аналізу Т-клітин та гуморальної відповіді, відповідно, і аналізу вірусного навантаження. Зразки сироватки були проаналізовані на Ебола-специфічні гуморальні реакції за допомогою ІФА та FRNT. GP - і Vaccinia - специфічні Т-клітини були проаналізовані за допомогою in vitro повторної стимуляції МКПК за допомогою ZEBOV/GP бібліотеки пептидів з Vaccinia Wyeth, після чого проводили виявлення ІФН-γ секретуючих клітин за допомогою ELISPOT. Всі тварини були заражені внутрішньом'язово (в/м) (100 pfu) EBOV Kikwit-9510621 в День 56. Всі три тварини, які отримали гетерологічну примуючу бустуючу ін'єкцію MVA і FPV, вижили. Повна сероконверсія вже була отримана після примування імунної системи, яка була додатково вдосконалена шляхом бустування.

ОПИС ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 [послідовність ДНК, що кодує GP-SEBOV-Maleo (номер доступу ГенБанку U23069.1)]

SEQ ID NO:2 [амінокислотна послідовність GP-SEBOV-Maleo (номер доступу ГенБанку U23069.1)]

SEQ ID NO:3 [послідовність ДНК, що кодує NP-SEBOV-Boniface (номер доступу ГенБанку AF173836.1)]

SEQ ID NO:4 [амінокислотна послідовність NP-SEBOV-Boniface (номер доступу ГенБанку AF173836)]

SEQ ID NO:5 [кодон-оптимізована послідовність ДНК, що кодує GP-MARV-Musoke (номер доступу ГенБанку ABA87127.1 для білкової послідовності)]

SEQ ID NO:6 [амінокислотна послідовність GP-MARV-Musoke (номер доступу ГенБанку

ABA87127.1)]

SEQ ID NO:7 [послідовність ДНК, що кодує TTC]

SEQ ID NO:8 [амінокислотна послідовність TTC]

SEQ ID NO:9 [послідовність ДНК, що кодує hCD40L]

5 SEQ ID NO:10 [амінокислотна послідовність hCD40L]

SEQ ID NO:11 [послідовність ДНК, що кодує hIL15R-Sushi]

SEQ ID NO:12 [амінокислотна послідовність hIL15R-Sushi]

SEQ ID NO:13 [послідовність ДНК, що кодує людський LFA-3/CD58 (номер доступу EMBL-CDS CAA75083.1)]

10 SEQ ID NO:14 [амінокислотна послідовність людського LFA-3/CD58 (номер доступу UniProtKB/SwissProt P19256)]

SEQ ID NO:15 [послідовність ДНК, що кодує людський ICAM-1/CD54 (номер доступу ГенБанку BT006854)]

SEQ ID NO:16 [амінокислотна послідовність людського ICAM-1/CD54 (номер доступу UniProtKB/SwissProt P05362)]

15 SEQ ID NO:17 [послідовність ДНК, що кодує людський B7.1/CD80 (номер доступу EMBL-CDS AAA58390.1)]

SEQ ID NO:18 [амінокислотна послідовність людського B7.1/CD80 (номер доступу UniProtKB/SwissProt P33681)]

20 SEQ ID NO:19 [кодон-оптимізована ДНК, що кодує GP-ZEBOV-Mayinga (номер доступу ГенБанку ABX75367.1)]

SEQ ID NO:20 [амінокислотна послідовність GP-ZEBOV-Mayinga (номер доступу ГенБанку ABX75367.1)]

SEQ ID NO:21 [послідовність ДНК, що кодує якір VV B5R]

25 SEQ ID NO:22 [амінокислотна послідовність якоря VV B5R]

SEQ ID NO:23 [послідовність ДНК промотору PrS]

SEQ ID NO:24 [послідовність ДНК промотору PrS5E: 1x (PrS) + 5x (Pr7.5e)]

SEQ ID NO:25 [послідовність ДНК промотору Pr7.5]

SEQ ID NO:26 [послідовність ДНК FPV-40K промотору FPV]

30 SEQ ID NO:27 [послідовність ДНК промотору PrLE1 – 1x (ATI) + 5x (Pr7.5e)]

SEQ ID NO:28 [кодон-оптимізована послідовність ДНК, що кодує NP-EBOV-Cdi (номер доступу ГенБанку ACI28629.1)]

SEQ ID NO:29 [амінокислотна послідовність NP-EBOV-Cdi (номер доступу ГенБанку ACI28629.1)]

35 SEQ ID NO:30 [кодон-оптимізована послідовність ДНК, що кодує GP-SEBOV-Gulu (номер доступу ГенБанку AAU43887.1)]

SEQ ID NO:31 [амінокислотна послідовність GP-SEBOV-Gulu (номер доступу ГенБанку AAU43887.1)]

SEQ ID NO:32 [послідовність ДНК промотору PrLE1 – 1x (ATI) + 4x (Pr7.5e)]

40 SEQ ID NO:33 [кодон-оптимізована послідовність ДНК, послідовність ДНК кодує послідовність VP40-ZEBOV-Mayinga]

SEQ ID NO:34 [амінокислотна послідовність VP40-ZEBOV-Mayinga]

SEQ ID NO:35 [послідовність промотору Pr13.5]

SEQ ID NO:36 [кодон-оптимізована послідовність ДНК, послідовність ДНК кодує GP-MARV-Angola]

45 Angola]

SEQ ID NO:37 [амінокислотна послідовність GP-MARV-Angola]

Перелік послідовностей

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> ФІЛОВІРУСНА ВАКЦИНА НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО МОДИФІКОВАНОГО ВІРУСУ ВІСПОБАКЦИНИ АНКАРА (МВА)

<130> BN89PCT

<150> US 62/045538

<151> 2014-09-03

<150> US 62/055154

<151> 2014-09-25

<160> 37

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 2362

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДНК послідовність, яка кодує GP-SEBOV-maleo (U23069.1 - номер доступу генбанку)

<400> 1

atttgatgaa gattaagcct gattaaggcc caaccttcac ctttttacca taatcttggt	60
ctcaataacca tttaatatggg gtatacttgc caaagcgccc ceatcttcag gatctcgcaa	120
tggagggtct tagcctactc caattgcccc gagataaatt tcgaaaaagc tctttctttg	180
tttgggtcat catcttattt caaaaaggcct ttccatgcc tttgggtggt gtgaccaaca	240
gcactttaga agtaacagag attgaccagc tagtcgtcaa ggatcatctt gcaccaactg	300
accagctgaa atcagtttgt ctcaacctcg aggggagcgg agtatctact gatatccat	360
ctgcgacaaa gcgttggggc ttcagatctg gtgtgcctcc ccaagtggtc agctatgaag	420
caggagaaat ggctgaaaat tgctacaatc ttgaaataaa gaaaccggac gggagcgaat	480
gcttaccccc accgcgggat ggtgtcagag gctttccaag gtgccgctat gttcacaaag	540
ccccaggaac cgggccctgc ccgggtgact atgaccttca caaggatgga gctttcttcc	600
tctatgacag gctggcttca actgtaattt acagaggagt caattttgct gagggggtaa	660
tcgcattctt gatattggct aaactaaagg aaacgttctt tcaatcctcc cccattcgag	720
aggcagcaaa ctacactgaa aatacatcaa gttactatgc cacatctac ttggagtacg	780
aaatcgaaaa ttttgggtgt caacactcca cgacctttt caaaattaac aataatactt	840
ttgtttctct ggacaggccc cacacgcctc agttcccttt ccagctgaat gataccattc	900
aacttcacca acagttgagc aacacaactg ggaaactaat ttggacacta gatgctaata	960
tcaatgctga tattgggtgaa tgggcttttt gggaaaataa aaaaatctct ccgaacaact	1020
acgtggagaa gagctgtctt tcgaaacitt atcgctcaac gagacagaag acgatgargc	1080
gacatcgtcg agaactacaa agggagaaga ctccgacctg gccaccagga agtattcgga	1140
cctgggttcca aaggattccc ctgggatggt ttcattgcac gtaccagaag gggaaacaac	1200
attgccgtct cagaattcga cagaaggctc aagagtagat gtgaatactc aggaactat	1260


```

cacagagaca actgcaacaa tcataggcac taacggtaac aacatgcaga tctccaccat 1320
cgggacagga ctgagctcca gccaaatcct gagttcctca ccgaccatgg caccaagccc 1380
tgagactcag acctccacaa ectacacacc aaaactacca gtgatgacca ccgaggaacc 1440
aacaacacca ccgagaaaact ctcttggtct aacaacagaa gcacccactc tcaccacccc 1500
agagaatata acaacagcgg ttaaaactgt ttgggcacaa gagtccacaa gcaacggctt 1560
aataacttca acagtaacag gtattcttgg gagccttggg cttcgaaaac gcagcagaag 1620
acaagttaac accagggcca cgggttaaat caatcccaac ttacactact ggactgcaca 1680
agaacaacat aatgctgctg ggattgcctg gatcccgtac ttiggaccgg gtgcagaagg 1740
catatacact gaaggcctta tgcacaacca aaatgcctta gtctgtggac tcagacaact 1800
tgcaaatgaa acaactcaag ctctgcagct tttcttaagg gccacgacgg agctgcccac 1860
atataccata ctcaatagga aggccataga ttctcttctg cgacgatggg gcgggacatg 1920
taggatcctg ggaccagatt gtgcatatga gccacatgat tggacaaaaa acatcactga 1980
taaaatcaac caaatcctcc atgatttcat cgacaaccct ttacccaatc aggataatga 2040
tgataattgg tggacgggct ggagacagtg gatccctgca ggaataggca ttactggaat 2100
tattattgca atcattgctc ttctttgcgt ctgcaagctg ctttgttgaa tatcaacttg 2160
aatcattaat ttaaagttga tacatttcta acattatata ttataatctg atattaatac 2220
ttgaaaataa ggctaattgcc aaattctgtg ccaaacttga aagtaggttt accaaaatcc 2280
tttgaactgg aatgctttta tgctctttct caatactata taagtctctt cccaaaataa 2340
tattgatgaa gattaagaaa aa 2362

```

```

<210> 2
<211> 676
<212> NPT
<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 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 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
 225 230 235 240
 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
 305 310 315 320
 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
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
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
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
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 Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu Cys Val Cys
 660 665 670

Lys Leu Leu Cys
 675

<210> 3
 <211> 2926
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> ДНК послідовності, яка кодує NP-SEBOV-boniface (AF173836.1 - номер доступу Генбанку)

<400> 3
 ctcaaaactca aactaataatt gacattgaga ttgatctcat catttaccaa ttggagacaa 60
 tttaactagt taatccccc ttgggggca ttctaaagt gtggcgaagg tatgtgggtc 120
 gttttgcttg gccctttcct aacttggctt ctcttacaat tctaaccctt ttgataagtg 180
 tggttaccag agtaatagac taaatttgct ctggttagtta gcatttctta graagaccga 240
 tactatccca agtttcaaga gagggtaga ggaggggccc gaggtatccc tttagtccac 300
 aaaatctagc caatttttag taagtggact gattacctt atracacgct atctactaag 360
 ggtttacctg agagcctaca acarggataa acgggtaga gggttcaggg ccttgggagg 420
 acaatctgag gttgatcttg actatcaca gatattaaca gccgggcttt cagtccaaca 480
 ggggatcttg cgacagagag tcatccgggt atatgtcgtg aatgatcttg agggtaattg 540
 tcaacatate attcaggctt ttgaagcagg tgtagatttc caggataatg ctgatagctt 600
 ccttttactt ttatgtttac atcatgctta ccaaggagat cataggctct tcttcaaaag 660
 tgatgcagtt caataittag agggccatgg cttcagggtt gaggtccgag aaaaggagaa 720
 tgtgcaccgt ctggatgaat tgttgcccaa tgttaccggg ggaanaaatc tcaggagaaac 780
 attggctgct atgccegaag aggagacaa ggaagctaat gctggctagt ttctatcctt 840
 tgcagtttg tttctaccca aacttgtcgt tggggagaaa gcgtgcttgg aaaaagtaaa 900
 aaggcaaatc caggctcagc cagaacaagg gctcattcaa tatccaactt ctgggcaatc 960
 agttggacac atgatggtga tcttccgttt gatgaggaca aactttttaa tcaagtttct 1020
 actaatatcat caagggatgc acatggttgc aggtcatgat gcgaatgaca cagtaatatc 1080
 taattctgtt gcccaggcaa ggttctcttg tcttctgatt gtaagactg ttctggatca 1140
 catcttaca aaaacagatc tggagtagc atttcatcca ctggcctagg cagcaaaagt 1200
 gaagaatgag gtcagttcat tcaaggcggc tcttggttca ctggcctagg atggagaata 1260
 tgcctcgctt gcacgtctcc ttaattcttc tggagtcac aacttggaac atgggcttta 1320
 tctacaactt tcagccatcg ctttgggtgt tgcaactgce caggggagta cgtttgcttg 1380
 tgtgaatgta ggggagcaat atcagcaact gcgtgaggct gctacigagg ctgaaaagca 1440
 actccaacaa tatgctgaaa cactgaggtt ggataacctt gggcttgatg aacaggagaa 1500

```

gaagattctc atgagcttcc accagaagaa gaatgagatc agcttccagc agactaatgc 1560
aarggtaacc ttaaggaaag aacggctggc taaattgacc gaagecatca cgactgcate 1620
gaagatcaag gtggagacc gtatctctga tgacaatgat attccatttc cggggccgat 1680
ctatgatgac actcacccca atccctctga tgacaatctt gatgattcac gtgatacaac 1740
taticcaggt ggtgttgttg acccgtatga tgatgagagt aataattatc ctgactacga 1800
ggattcggct gaaggeacca caggagatct tgatctcttc aatttggacg acgacgatga 1860
tgacagccga ccaggaccac cagacagggg gcagaacaag gagagggcgg cccggacata 1920
tggcctccaa gatccgacct tggacggagc gaaaaagggt cgggagtga ccccggttc 1980
ccatcaacca ggcaactccc acatcaccaa gtccgggtca aacaccaacc aaccacaagg 2040
caatatgtca tctactctcc atagtatgac cctatacag gaagaatcag agcccgatga 2100
tcaaaaagat aatgatgacg agagtctcac atcccttgac tctgaagggt acgaagatgg 2160
tgapagcctc tctgaggaga acaccccaac tgtagctcca ctgacccag tctacaaaga 2220
cactggagta gacactaatc agcagaatgg accaagcagt actgtagata gtcaagggtc 2280
tgaaggtgaa gctctcccaa tcaattctaa aaagagttcc gcactagaag aaacatatta 2340
tcatctctta aaacacacgg gtccatttga ggcaatcaat tattatcacc taatgagtga 2400
tgaaccctat gcttttagca ctgaaagtgg caaggaatat atctttccag actcccttga 2460
agaagcctac ccgcccgggt tgagttagaa ggaggcctta gagaaggaaa atcgtrtct 2520
ggtcattgat ggccagcaat tctcttgccc ggtaatgagc ctacgggaca agttccttgc 2580
cgttcttcaa catgactgag gacctatgat tgggtgatct tgtttattcc gagectgatt 2640
ataattgttc tgataartca agtataagca cttaccacca aatataaace ctatctatgt 2700
tataaggaaa ttaaataaat aacctgtaag ttataggact argaagagct gcttgtgtca 2760
atttatcatg ggttgatacc cgtaccgcaa gaaccattat ttagtagttt tggtcagcct 2820
ctgatatgta ccaataagaa aacattatag cattaataca taaggtatct ttaatgagc 2880
ttaggaggat aatatectga taaattctat agaacttaag attaaag 2926

```

<210> 4
 <211> 738
 <212> NPT
 <213> SE80V-Boniface

<400> 4

Met Asp Lys Arg Val Arg Gly Ser Trp Ala Leu Gly Gly Gln Ser Glu
 1 5 10 15

Val Asp Leu 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 Pro Val Tyr Val Val Asn Asp
 35 40 45

Leu Glu Gly Ile Cys Gln His Ile Ile Gln Ala Phe Glu Ala Gly Val
 50 55 60

Asp Phe Gln Asp Asn Ala Asp Ser Phe Leu Leu Leu Leu Cys Leu His
 65 70 75 80
 His Ala Tyr Gln Gly Asp His Arg Leu Phe Leu Lys Ser Asp Ala Val
 85 90 95
 Gln Tyr Leu Glu Gly His Gly Phe Arg Phe Glu Val Arg Glu Lys Glu
 100 105 110
 Asn Val His Arg Leu Asp Glu Leu Leu Pro Asn Val Thr Gly Gly Lys
 115 120 125
 Asn Leu 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 Ala Glu Gln Gly Leu Ile Gln Tyr Pro Thr Ser 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 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
 465 470 475 480
 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
 545 550 555 560
 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
625 630 635 640

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> S
<211> 2046
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> нуклон-оптимізована ДНК послідовність, яка кодує GP-MARY-Musoke
(AB487127.1 - номер доступу генбанку для білкової послідовності)

<400> S
atgaaaacaa cctgcctcc ctcagccctg atcctgatcc agggcaccac gaacctgccc 60
atcctggaaa tcgccagcaa caaccagccc cagaacgtgg atagcgtgtg cagcggcacc 120
ctgcagaaaa ccgaggacgt gcacctgatg ggccttcacac tgagcggcca gaaggtggcc 180
gatagccccc tggaaagccag caagcgttgg gccttcagaa caggggtgcc acctaaagac 240
gtggagtaca cagagggcga ggaagccaag acctgctaca acatcagcgt gaccgacccc 300
agcggcaggt ccttgcctgt ggacctcccc accaacatca gagactatcc taagtgcag 360
accatccacc acatccaggg ccagaatcct cagcctcagg gcattgcctt gcacctgttg 420
ggcgcattct tcctgtatga cagaatgcc tcacaccacca tgtaacgggg caaggtgttc 480
acagagggca atatcgccgc catgatctg aacaagaccg tgcacaagat gatcttcagc 540
agacagggcc agggctaccg gcacatgaac ctgaccagca ccaacaagta ctggaccagc 600
agcaacggca cccagaccaa cgacacgggc tgccttggcg ccttcagga atacaacagc 660
accaagatc agacctgggc cccagcaag atcctctctc ccttgcctac cgcagacccc 720
gagatcaagc tgacaagcac cccaccgac gccaccaagc tgaacaccac cgaacccccc 780


```

agcgacgatg aggacctggc aactagtggg agcggcagcg gagagagaga gccccacacc      840
acctccgatg cagtgaacaa gcaggggcttg agcagcacaa tgccccctac cccagacctt      900
cagcctagca caccctcagc gggcggtcaat aacaccaacc actcccagga cgccttgacc      960
gagctggaca agaacaatac caccgcccag cctagcatgc cccccacaa cactactacc     1020
atctccacca acaataaccg caagcaccaac ttcagcacc ctagcgcctc tetgcagaac     1080
accaccaacg acacacacca gaggaccatc acagagaacg agcagaccag cgcctcttcc     1140
atcaccaccc tgccccccac cggcaatctt accaccgcca agagcaccag ctccaagaag     1200
ggtctctgaa ctaccgcccc caacacaaac aacgagcact tcaccagccc tcccccaacc     1260
cttagctcca cagcccagca cctgggtgtac ttcggcgga agcgggtccat cctgtggcgg     1320
gagggcgaca tgttccccct tctggatggc ctgattaacg cccccatga cttagacccc     1380
gtgccaata ccaagaccat cttagacgag agtagtctat cagggtgcat agccgaagag     1440
gacagcacg ccagcccaa catctccttg acctgagct acttcccaa catcaatgag     1500
aacaccgctt acagcggcga gaacgagaac gactgcgacg ccgagctgag aatttggagc     1560
gtgcaggaa atgacctggc cgtcggcctg agtgggatac cattcttcgg cccaggcate     1620
gagggcttgt acactcgctt gctgatcaag aaccagaaca acctcgtgtg cagactgcgg     1680
agactggcca accagaccgc caagtccctg gaactgtctg tgagagtga caccgaagag     1740
agaacttctt ccctgatcaa cgggcacgct attgattttc tgcagacctg ctggggcgga     1800
acatgcaagg tcttgggtcc agactgttgt atcgggctcg aggacctcag caagaacatc     1860
agcgaacaga ttgaccgat caagaaggac gaggagaaag agggcacagg ctggggcctg     1920
ggcggcaagt ggtggaaccg cgaactggggc gtgctgacaa acctgggcat cctgctgctg     1980
ctgtctatcg ctgtcctgat tgccctgagc tgcactgtc ggatcttcac caagtacatc     2040
ggctga                                         2046

```

<210> 6
 <211> 681
 <212> NPT
 <213> MARY-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	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	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	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 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 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> днк
<213> штучна послідовність

«226»
«273» ДНЕ ПОСЛАДОВИСТЬ, ЯКА КОДУЕ ТТХ

[illegible]

ctggaaactgg	aaaagaccac	gcagctgcgg	ctggacacgg	accaggtgta	cggcaatata	1440
gccacctaca	acttcgagaa	cggcagagtg	cgcgtggaca	ccggcagcaa	ttggagcgag	1500
gtgctgcctc	agatccagga	aaccactgcc	cggatcatct	tcaacggcaa	ggacctgaac	1560
ctggtggagc	ggcggatcgc	cgcctgaac	ccctccgacc	ccctggaaac	caccaagctc	1620
gacatgacct	tgaagagggc	ctgaagatc	gccttcggct	tcaacgagcc	caacggcaac	1680
ctgcagtacc	agggcaaggc	catcacggag	ttcgacttca	acttcgacca	gcagacctcc	1740
cagaacatca	agaatcagct	ggccgaactg	aargtgacca	acatctacac	agtgcctggac	1800
aagatcaagc	tgaatgccaa	gatgaacatc	ctgatccggg	acaagcgggt	ccactacgac	1860
cggacaata	tcgctgtggg	cgcgcagcag	agcgtgtgta	aagaagccca	ccgggaagtc	1920
attaacagct	ccaccgaggg	gctgctgctg	aacatcgaca	aggacatccg	caagatcctg	1980
agcggctaca	tcgtggagat	cgaggacacc	gagggcctga	aagaagttat	taacgaccgc	2040
tacgaentgc	tgaatatcag	cagcctgcgg	caggacggca	agaccttcat	cgacttcaag	2100
aagtaacaac	acaagctgcc	ctgtacatc	agcaacccca	actacaaagt	gaacgtgtac	2160
gccgtgacca	aagagaatac	catcatcaac	ctagcgaga	acggcgatcc	ctccaccaac	2220
ggcatcaaga	agatcctgat	cttcagcaag	aagggctacg	agatcggcgg	accgggcctt	2280
aagaacctgg	actgctgggt	ggacaacgaa	gaggacatcg	actgtatcct	gaagaagtct	2340
accatccctg	atcgggacat	caacaargac	atcatcagcg	acatctcggg	cttcaacagc	2400
agcgtgatca	cttaccctga	cgcacagctg	gtgcctggca	tcaatggcaa	ggccatccac	2460
ctggtgaaca	acgagagcag	cgaagtgate	gtgcacaagg	ccatggacat	cgagtacaac	2520
gatatgttca	acaacttcac	cgtgtccttt	tggctgcggg	tgcacaagg	gtccgccagc	2580
cacctggaac	agtacggcac	caacgagtac	agcatcatca	gcagcatgaa	gaagcacagc	2640
ctgttccatg	gcagcgggtg	gagcgtgtcc	ctgaaggcca	acaacctgat	ctggaccttg	2700
aaggactctg	ccggcgaagt	gcggcagatc	accttccggc	acctgccrca	caagttcaac	2760
gcctacctgg	tcaataagtg	gggtttcatc	accatcacca	acgacagact	gtccagcgcc	2820
aacctgtata	tcaacggcgt	gtgatgggc	agcgcggaga	ttacaggcct	gggcgcctac	2880
cgggaggaca	acaacatcac	cctgaagctg	gaccggtgca	acaacaacaa	ccagtacgtg	2940
tccatcgaca	agttccgcat	cttctgcaag	gccttgatc	tcaaaagagat	cgagaagctg	3000
tacaccagct	acctgtccat	cacctttctg	cgggatttct	ggggcaaccc	tttgagatac	3060
garaccaggt	actacctgat	cctcgtggcc	agcagctcca	aggacgtgca	gtgaagaac	3120
atcaccgact	acatgtacct	gaccaacgcc	cccagctaca	tcaatggcaa	gtgaacatc	3180
tactaccggc	ggcigtacaa	ggcctgaag	ttcatcatca	agcgggtacac	ccccacaac	3240
gagatcgaca	gcctcgtgaa	gtccggcgac	ttcatcaagc	tgtatgtgtc	ctacaacaac	3300
aatgagcaca	tcgtgggcta	ccccaggac	gggaacgcct	tcaacaacct	ggaccggatc	3360
ctgagagtgg	gtcacaacgc	ccctggcatc	ccctgtata	agaaaaatga	agcctgtgaag	3420
ctgctgggac	tgaaaacctc	ctctgtgcag	ctgaactgt	acgacgacaa	gaacgcagc	3480

ctgggctctgg tggggaccca caacggccag atcggaacg accccaatcg ggataicctg 3540
atgcacagca actggtacit caaccacrtg aaggacaaga tcttgggctg cgatttggtac 3600
ttcgtgccc a cgcgcgaggg ctggaccaac gacaagcttt ga 3642

<210> 8
<211> 1213
<212> BPT
<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 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 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
 785 790 795 800
 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
 865 870 875 880
 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
 945 950 955 960
 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> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДНК послідовність, яка кодує hCD40L

<400> 9

atgatacgaac catacaacca aactctctccc cgatctgcgg ccactggact gcccatcagc	60
atgaaaattt tcargtattt acttactgtc tttttatca cccagatgat tgggtcagca	120
ctttttgctg tgcacrttca tagaagggtg gacaagatag aagaiganag gaattttcat	180
gaagattttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaaag atccattatcc	240
ttactgaact gtagggagat taaaagccag ttggaaggct ttgrgaagga tataatgta	300
aacaagagg agacgaagaa agaaaacagc ttgaaatgc aaaaaggtga tcagaatccc	360
caaattgcgg cacatgcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg	420
gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtaa ccttggaaaa tgggaaacag	480
ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgcc aagtaacctt ctgttccat	540
cgggaagctt cgagtcaagt tccatttata gccagctct gctaaagtc tcccgtaga	600

tttgagagaa tcttactcag agctgcataat acccacagtt cgcaccaatc ttgcgggcaa 660
 caatccattc acttgggagg agtatitgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgcatt 720
 gtgactgata caagccaagt gagccatggc actggtctca cgtcccttgg cttactcaaa 780
 ccttga 786

<210> 10
 <211> 261
 <212> NPT
 <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 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> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ДНК послідовність, яка кодує HILIR-Sushi

<400> 11
 atggccctca gatgggcccag aggcctgtaga accctgggac tgccctgccc gctgctgctc 60
 cctctgctga ggctctctgc caccgggggc atcaccctgc ccccaeccat gaggctggaa 120
 cagcccgata tctgggtcaa gagctacagc ctgtacagca gagagcggta catctgcaac 180
 agcggcttca agcgggaaggc cggcaccagc agcctgaccg agtgcgtgct gaacaaggcc 240
 accaacgtgg cccactggac caccctcagc ctgaagtgc tcaaggaccc cgccttgggtg 300
 catcagaggc ctgctctctc aagcggcgga tctggcggcg gaggaagtgg cggaggatca 360
 ggcygaggcg gcagcctgca gaactgggtc aacgtgatca gcgacctgaa gaagatcgag 420
 gascctgctc agagcctgca catcgacgcc accctgtaca ccgagagcga cgtgcacccc 480
 agctgcaaaag tgaccgccat gaagtgcctt ctgctgggaa tcagagtcac cagcctggaa 540
 agcggcgagc ccagcatcca cgaraccgtg gaaaaccrga tcctctctgg caacaacagc 600
 ctgagcagca accgcaacgt gaccgagagc ggctgcdaag agtgcgagga actggaagag 660
 aagaatatca aagagttcct gcagagcttc gtgcacatcg tgcagatgtt catcaacacc 720
 agctga 726

<210> 12
 <211> 241
 <212> PPT
 <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 Gly Ser Gly 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
145 150 155 160
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> RHK
<213> Homo sapiens
<400> 13
atggttgctg ggagcgacgc ggggcgggcc ctgggggtcc tcagcgtggt ctgctgctg 60
cactgctttg gtttcacag ctgtttttcc caacaaatat atggtgtgt gtatgggaat 120
gtaactttcc atgtaccaag caatgtgcct ttaaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag 180
gataaagttg cagaactgga aaattctgaa ttcagagcct tctcatcttt taaaaatagg 240
gtttatttag acactgtgtc aggtagcctc actatctaca acttaacatc atcagatgaa 300
gatgagtatg aaatggaatc gccaaatatt acgataacca tgaagtctct tctttatgtg 360

```

cttgagtcctc ttccatctcc cacactaact tgtgcattga ctaatggaag cattgaagtc      420
caatgcatga taccagagca ttacaacagc catcgaggac ttataatgta ctcattggat      480
tgtccatagg agcaatgtaa acgtaactta accagtatat attttaagat ggaaaatgat      540
ctttcacaaa aaatcacagt tactcttagc aatccartat ttaatacaac atcatcaatc      600
attttgacaa cctgtatccc aagcagcggc cattcaagac acagatatgc acttataccc      660
ataccartag cagtaattac aacatgtatt gtgctgtata tgaatggat tctgaaatgt      720
gacagaaaac cagacagaac caactccaat tga                                     753

```

```

<210> 14
<211> 250
<212> NPT
<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> DHX
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 atggctccca gcagcccccg gcccgcgctg cccgcactcc tggctctgct cggggcctcg 60
 ttcccaggac ctggcaatgc ccagacatct gtgtccccct caaaagtcac cctgcccccg 120
 ggaggctccg tgcctggtgac atgcagcacc tccgtgacc agcccaagtt gttgggcata 180
 gagaccccg tgcctaaaaa ggagttgctc ctgcctggga acaaccggaa ggtgtatgaa 240
 ctgagcaatg tgcaagaaga tagccaacca atgtgctatt caaactgccc tgatgggtag 300
 tcaacagcta aaaccttcct caccgtgtac tggactccag aacgggtgga actggcacc 360
 ctcccccttt ggcagccagt gggaagaac ctaccctac gctgccaggc ggagggtggg 420
 gcaccccggg ccaacctcac cgtggtgctg ctccgtgggg agaaggagct gaaacgggag 480
 ccagctgtgg gggagccgac tgaggtracg accacgggtc tggtaggag agatcaecat 540
 ggagccaatt tctcgtgccc cactgaactg gacctgcggc cccaagggtc ggagctgttt 600
 gagaacacct cggcccccta ccagctccag acctttgtcc tgccagcgac tccccacaa 660
 cttgtcagcc cccgggtcct agaggtggac acgcagggga ccgtggtctg ttccctggac 720
 gggctgttcc cagtcctgga gggccaggtc cactgtggac tgggggacca gaggttgaa 780
 cccacagtc cctatggcaa cgactccttc tggccaagg cctcagtcag tgtgaccgca 840
 gaggacgagg gcacccagcg gctgacgtgt gcagtaatac tggggaacca gagecaggag 900
 acactgcaga cagtgaacct ctacagcttt ccggcgccca acgtgattct gacgaagcca 960
 gaggtctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg cccaccctag agccaagggt 1020
 acgttgaatg ggggtccagc ccagccactg ggcggagggg cccagctcct gctgaaggcc 1080
 accccagagg acaacgggag cagcttctcc tgccttgcaa cctggagggt ggccggccag 1140
 ctatatacaca agaaccagac cggggagctt cgtgtcctgt atggcccccg actggacgag 1200
 agggattgtc cgggaaactg gacgtggcca gaaaattccc agcagactcc aatgtgccag 1260
 gcttggggga acccattgcc cgagctcaag tgtctaaagg atggcacitt cccactgccc 1320
 atcggggaat cagtgaactg cactcgagat ctgaggggca cctacctctg tcgggcccag 1380
 agcactcaag gggaggtcac ccgcaagggt accgtgaatg tgctctcccc ccggtatgag 1440

attgtcatca tcactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcacg 1500
 tacctctata accgccagcg gaagatcaag aaatacagac tacaacaggc ccaaaaaggg 1560
 acccccatga aaccgaacac acaagccacg cctccctag 1599

<210> 16
 <211> 532
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ala Leu Pro Ala 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 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> DHK
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 atggggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
 cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
 gaagtgaag aagtggcaac gctgtctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
 caaaetcgca tctactggca aaaggagaag aaaatgggtgc tgactatgat gtctggggac 240
 atgaatatat ggcccagta caagaactgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
 atgtgatcc tggctctgcy cctatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
 tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
 gacttcccta caccragtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
 atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
 gaattaaatg ccatcaaac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgtgttt 600
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca ccaagcaaga gcattttctt 720
 gataacctgc tcccatectg ggccattacc ttaattctag taaatggaat ttttgtgata 780
 tgctgectga cctactgctt tgcaccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
 agaagggaaa gtgtacgcc tgtataa 867

<210> 18
 <211> 288
 <212> NPT
 <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> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> кодон-оптимізована ДНК, яка кодує GP-ZEROV-Mayinga (ABX75367.1 - номер доступу генбанку)

<400> 19

atgggcctga caggcattct gcagctcccc agagacagat tcaagcggac ctcccttttc 60

ctctgggtca tcattctgtt tcagcggacc ttctccatcc ctctgggcgt gatccacaat 120

```

agcaccctcc aggtgtccga cgtggacaag ctctgtgtcc gggacaagct gtectccacc 180
aaccagctga gaagcgtggg gctgaatctc gagggcaatg gctgtggccac agacgtgccc 240
tccgccacaa agcgcctggg ctttcggagc ggcttccctc cttaagtcgt gaactacgag 300
gcaggggaat gggtgaaaa ttgttacaat ctcgagatca aaaaaccaga tggctctgag 360
tgcctgcctg ccgcaccaga cggcatcagg ggcttcccta gatgccgcta tctgcacaag 420
gtgagtggta caggcccttg tgcggcgat tttgcccttc acaaagaggg ggctttcttt 480
ctgtacgaca ggctcgccag tacagtata taccgaggta ctaccttcgc cgaaggcgtg 540
gtggcctttc tgattctgcc ccaggccaag aaggacttct tcagcagcna ccccttgaga 600
gaaccctgta acgccacaga ggacccagc agcggctact acagcaccac aatcagatac 660
caggccacag gcttcggcac caatgagaca gagtacctgt tcgaggtgga caacctgacc 720
tacgtgcagc tggaaagccg gtttacctct cagttctctc tgcagctcaa cgagacaatc 780
tacacctcgc gcaagcggag caacacaaca ggcgaagctc tctggaaagt gaaccccgag 840
atcgatacca ctataggggg gtgggccttc tgggaaacta agaagaacct caccgggaag 900
atcagatccg aggaactgtc ctccaccgtg gtgtccaacg ggcaccaaga catttcagga 960
cagagccccc ccagaacaag cagcgacccc ggcaccaaca ccacaactga ggaccacaag 1020
atcatggcca gcgagaactc cagcgccatg gtgcaggctc acagccaggg aagagaagcc 1080
gccgtgagcc acctgaccac actggccaac atcagatcca gcccacagag cctgacccc 1140
aagcctggcc ccgacaacag cacacacaa acccccgtgt acaagctgga catcagcgag 1200
gccacccagg tggagcagca ccacagacgg accgacaacg acagcaccgc cagcgatacc 1260
ccttttgcca ccacagcgc cggacccctt aaggccgaga ataccaaac cagcaagagc 1320
accgacttcc tggatccagc caccaccacc agtccacaga accacagcga aatcgccggc 1380
aacaacaata cccaccacca ggaraccggc gaggaagcg ccagctctgg caagctgggc 1440
ctgattacca acacaatcgc cggcgtggcc ggaactgatc ccggcggcag acggaccaga 1500
cgggaggcca tctggaacgc ccagcccaaa tgtaatccta atttccacta ttggaccaca 1560
caggacgagg gcgctgccat cggactggca tggattcctt acttcggacc agccgctgaa 1620
gggatctata tctaggggct catgcataac caggatgggc tgatttctgg tctccggcag 1680
ctggctaatt agacaacaca ggctctccag ctgtttctga gagccacaac agagctgaga 1740
accttcagca ttctcaaccg caaggctatt gacttctgc tccaacgatg gggaggcaca 1800
tgccacatcc tggggcctga ttgttgtatc gaacctcacg attggacaaa gaacattaca 1860
gataagatcg atcagattat ccattgacttt gtggacaaga ccttgcctga tcagggcgac 1920
aacgataatt ggtggacagg gtggagacag tggattccag ccgggattgg cgtgaccggc 1980
gtgattatcg ccgtgatcgc cctgttctgc atctgcaagt tctgtttctg a 2031

```

```

<210> 20
<211> 676
<212> NPT
<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                               560
Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr
565
Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
590
Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
600
Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp
610
Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp
620
Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile
645
Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys
660
Lys Phe Val Phe
675

```

<210>	21
<211>	159
<212>	ДНК
<213>	штучна послідовність

<223> ДНК послідовність, яка кодує уу 85R якір

```

<400> 21
cctaagcctt ctacacctcc tggcagcagc gccacctacc acatcatcat cgtggccctg      60
acaattatgg gcgtgatctt cctgatcagc gtgatcgtgc tcgtgtgcag ctgcgacaag      120
aacaacgacc agtacaagtt ctacaagctg ctgccctga      159

```

```
<210> 22
<211> 42
<212> npr
<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>	ДНК		
<213>	штучна послідовність		
<220>			
<223>	послідовність промотору		
<400>	23		
	aaaaattgaa attttatattt ttttttttgg aatataaata		40
<210>	24		
<211>	234		
<212>	ДНК		
<213>	штучна послідовність		
<220>			
<223>	послідовність промотору		
<400>	24		
	aaaaattgaa attttatattt ttttttttgg aatataaata aaaaattgaa aaactattct		60
	aatttattgc acgggtccggt aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acgggtccggt		120
	aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acgggtccggt aaaaattgaa aaactattct		180
	aatttattgc acgggtccggt aaaaattgaa aaactattct aatttattgc acgg		234
<210>	25		
<211>	104		
<212>	ДНК		
<213>	штучна послідовність		
<220>			
<223>	послідовність промотору		
<400>	25		
	tccaaaccsa ctcgtttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa tacaataatt		60
	aatttctcgt aaagtagaaa aatataattct aatttattgc acgg		104
<210>	26		
<211>	119		
<212>	ДНК		
<213>	Fowlpox virus		
<400>	26		
	ttaatgtata gaactaatft ataataaaca tagtaaatat gggtaacttc ttaatagcca		60
	taattaaaat tgaaaaaaa atatcattat aaaacgtaaa cgaacaaaaa acattaatt		119
<210>	27		
<211>	227		
<212>	ДНК		
<213>	штучна послідовність		
<220>			
<223>	послідовність промотору		
<400>	27		
	gttttgaaaa tttttttata ataataatcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat		60
	tgcacgggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgggtcc ggtaaaaatt		120
	gaaaaactat tctaatttat tgcacgggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat		180

tgcacgggtcc ggtaaaaact gaaaaactat tctaatitiat tgcacgg

227

<210> 28

<211> 2220

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> клон-оптимізована ДНК послідовність, яка кодує NP-180V-CdI (AC128629.1 - номер доступу Генбанку)

<400> 28

atggaaagca gggcccaaca ggcctggatg acacacaacg ccagcggctt cgagacagac 60
taccacaaga tcccgacagc cggcctgtct gtgcagcagg gcacgtgagc gcagcgcgtg 120
atccaggtgc accaggtgac caacctgaa gagatctgcc agctgacat ccaggccttc 180
gaggccggcg tggacttcca ggaagcgcc gacagcttcc tgctgatgct gtgcctgcac 240
cacgcctacc agggcgacta caagcagttc ctggaaagca acgcctgaa gtaacctgaa 300
gggcacggct tcagattcga agtgcggaag aagaagggc tgaagcggct ggaagaactg 360
ctgcctgccg ccagctcagg caagagcacc agacgaccc tggccgccat gcccgaggaa 420
gagacaaccg agggcaacgc tggcagttc ctgagcttgc ccagcctgtt cctgcttaag 480
ctggtggtgg gcgagaaggc ctgcctgaa aaggtagcgc ggcagattca ggtgcacagc 540
gagcagggcc tgatccagta cctaccgcc tggcagagcg tggccacat gatggtgac 600
ttccggtga tgcggacca cttcctgac aagtttctgc tgatccacca ggaatgcac 660
atgggtgctg gccacgacgc caatgacgcc gtgatcgcca atagcgtggc ccaggccaga 720
ttcagcggcc tctgatcgt gaaaacagt ctggaccaca tctgcagaa aaccgagcac 780
ggcgtgagac tgcacctct ggcctggacc gccaaagtga agaaccgaagt gaacagcttc 840
aaggcgcgcc tgtctagcct ggcctagcac ggcgagtagc ccccttccgc cggcttgcgt 900
aacctgagcg gcgtgaacaa tctggaacac ggactgttcc cccagctgag cgccttgc 960
ctgggagtg ccacagccca cggctctaca ctggccggcg tgaacgtggg cgagcagtac 1020
cagcagctga gagaggccgc catagaggtc gagaagcagc tgcagaagta cgtcgagagc 1080
cgggagctgg atcacctggg cctggacgac caggaaaaga agatcctgaa ggacttccac 1140
cagaagaaga acgagatcag cttccagcag accacgcga tggtagacct gcggaagag 1200
cggctggcca agctgaccca ggcacacacc tccaccagc tgcgaaaae cggcaagcag 1260
tacgacgacg acaatgacat ccccttccct ggcacacaca acgacaacga gaactccgag 1320
cagcaggagc atgacccac cgatagccag gataccacca tcccagacat catcgtggac 1380
cccgacgacg gccggtaaca caactacggc gactacccca gcgagacagc caatgcccc 1440
gaggacctgg tgcgttcca cctggaagat ggcgacgagg acgaccacag acccagcagc 1500
tcagcggga acaacaaca gcacagcctg accggcaccg acagcaaca gaccagcaac 1560
tggacccgga accccacca catgcccag aaggacagca cccagaaca cgacaacccc 1620
gccagagag cccaggaata cgcctgggac aacattcagg acacccctac cctcacaga 1680

```

gccctgacct ccattcagcga ggaaccggc tccaacggc acaacgagga cgataicgac 1740
agcattcccc ccttggaate cgacgaggaa aacaacacg aaaccaccat caccaccaca 1800
aagaacacca ccgcccctcc cgcacctgtg taecgggtcca acagcgagaa agagcccttg 1860
cctcaggaaa agagccagaa acagcccaat cagggtgtccg gcagcgagaa taccgacaac 1920
aagccccaca gcgaacagag cgtggaggaa atgtaccggc acattctgca gaccaggggc 1980
cccttgacg ccattctgtt ctactacatg atgacagagg aacctatcgt gttcagcacc 2040
tcgcagcgca aagaatagct gtaccccgac agccttgaag gcgagcacc tccctggctg 2100
agcgaaadaag aggccctgaa cgaggacaac cgggttcatc ccatggacga tcagcagttc 2160
tactggcccg tgatgaacca ccggaacaag ttcattggca tccctgcagca ccacaagtga 2220

```

<210> 29
 <211> 739
 <212> NPT
 <213> EBOV-Cd1

<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 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
 465 470 475 480
 Glu Asp Leu Val Leu Phe Asp Leu Glu Asp Gly Asp Glu Asp Asp His
 485 490 495
 Arg Pro Ser Ser Ser Ser Glu Asn 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
 545 550 555 560
 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 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
 625 630 635 640
 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> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> кодон-оптимізована ДНК послідовність, яка кодує GP-SEBOV-Gu1u (AAU43887.1

- номер доступу

Генбанку)

<400> 30

atggggcgcc	tgagcctgct	gcagctgccc	cgggacaagt	tccggaagtc	cagcttcttc	60
gtgtgggtga	tcacctgttt	ccagaaagcc	ttcagcatgc	ccctgggcgt	ggtgaccaac	120
agcaccctgg	aagtgaccga	gacgaccag	ctggtgtgca	aggaccacct	ggccagcacc	180
gacagctga	agtcctgtgg	cctgaacctg	gaaggcagcg	gcgtgagcac	cgacatcccc	240
agcgccacca	agagatgggg	cttcagatcc	ggcgtgcccc	ccaaggctgt	gtcttatgag	300
gcctggcgagt	gggcccagaa	ctgctacaac	ctggaaatca	agaagcccca	ctggcagcag	360
tgtctgcttc	ccctctccga	tggcgtgaga	ggcttccccc	gggtgcagata	cgtgcacaag	420
gcacaaggca	ccggtccatg	cccaggcgac	tacgcccttc	acaaggacgg	cgcctttttc	480
ctgtacgacc	ggctggcctc	caccgtgatt	taccggggcg	tgaactttgc	cgaggggcgt	540
atcgcttccc	tgatcctggc	caagcccaaa	gagacatttc	tgcagagccc	ccccatccgg	600
gaggccgtga	actacaccga	gaacaccagc	agctactacg	ccacctccca	cctggaatac	660
gagatcgaga	acttcggcgc	ccagcacagc	accacctctg	tcaagatcga	caacaacacc	720
tttgtgcggc	tggacagacc	ccacaccccc	cagtttctgt	tccagctgaa	cgacaccatc	780
catctgcatt	agcagctgtc	caacaccacc	ggcagactga	tctggacctt	ggacgccaac	840
atcaacgccg	acatcgttga	atgggctttt	tgggagaaca	agaagaatct	gagcagcag	900
ctgcggggcg	aagaactcag	cttcgaggcc	ctgagcctga	acgagacaga	ggacgacgac	960
gccgccagca	gccggatcac	caagggcggg	atcagcgacc	gggccaccag	aaagtacagc	1020
gacctgggtc	ccaagaacag	ccccggcatg	gtgcctctgc	acatccccga	gggcgagaca	1080
actctcccta	gtcagaatag	caccgagggc	agacgggtgg	gcgtgaacac	ccaggaaacc	1140
atcaccgaga	cagccggcac	cattcattgg	actaacggca	accacatgca	gacagcacc	1200
atrggcattc	ggcccagcag	cagccagatc	ccaagtagta	gtcctaccac	agcccttagc	1260
cctgaggccc	agacccctac	cacacacacc	agcggcccta	gggtgatggc	caccgaggaa	1320
ctaacacccc	ctcctggcag	cagcccaggt	ccaactaccg	aggcaccaac	cctgaccacc	1380
cccgagaaca	tcaccaccgc	ctgaaaaacc	gtgctgcccc	aggaagcac	cagcaacggc	1440
ctgataccca	gcacgtgac	cggcatcctg	ggcagcctgg	gcctgcggaa	gcggagcaga	1500
cggcagacca	acaccaaggc	caccggcaag	tgcaccccca	acctgcacta	ctggaccggc	1560
caggaacagc	acaacgcgcg	tgggatcgcc	tggatccctc	acrttggtcc	tgggtctgag	1620
ggaatataca	cagagggcct	gattcacaac	cagaacgccc	tgggtgtcgg	cctgagacag	1680

```

ctggccaacg aaaccactca ggcactgcag ctgttctctgc gggccaccac cgagctgcgg 1740
acctacacca tctgaacag gaagggccatc gaatttctgc tgcggagatg gggcggcacc 1800
tgtagaatcc tgggccccga ctgctgcattc gagccccacg actggaccac gaataacc 1860
gacaagatca accagatcat ccacgacttc atcgacaacc cctgcccac ccaggacaac 1920
gacgacaact ggtggactgg ttggcgacag tggatccctg ccggcatcgg catcacccgc 1980
atcatcattg ccattatcgc tctctctctgc gtgtgcaagc tctctctctg a 2031

```

```

<210> 31
<211> 676
<212> nPT
<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 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
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 Ser Gln Ile Pro Ser 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
		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 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 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 Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu Cys Val Cys
 660 665 670
 Lys Leu Leu Cys
 675

<210> 32
 <211> 187
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність промотору

<400> 32	
gttttgaaaa ttittttata ataatatccc ggtaaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	60
tgcacgggcc ggtaaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgggcc ggtaaaaaatt	120
gaaaaactat tctaatttat tgcacgggcc ggtaaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	180
tgcacgg	187

<210> 33
 <211> 984
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> кодон-оптимізована VP40 послідовність

<400> 33
 atgctggcgcg tgatcctgcc caccgccctt ccagagtaca tggaaagcat ctaccccggtg 60
 cggagcaaca gcacaatcgc cagagggcggc aacagcaata ccggcttctt gacccccgag 120
 agcgtgaacg gcgatacccc cagcaacccc ctgagggccta tcgccgacga caccatcgac 180
 cagcccgagcc acacccctgg cagcgtgtcc agcgccttca tcctggaagc catggtgaac 240
 gtgatcagcg gccccaaggt gctgatgaag cagatcccca tctggctgcc cctgggcgtg 300
 gccgaccaga aaacctacag ctccgacagc accaccgccg ccacatgctt ggccagctac 360
 accatcaccg acttcggcaa ggccaccaac cccctgggtgc gcgtgaacag actgggacct 420
 ggcatccccc accatccctt gagactgctg cggatcggca accaggcctt cctgcaggaa 480
 ttctgtctgc ccccggtgca gctgccccag tacttcacct tggacctgac cgccttgaag 540
 ctgattaccc agcctctgcc tgcgcctacc tggaccgatg atacccccc acggcagcaac 600
 ggccgacctga ggcccgccat cagcttccac cccaagctga ggccatcctt gctgcccaac 660
 aagagcggca agaagggcaa cagcggcgac ctgacctccc ccgagaagat ccaggccatc 720
 atgaccagcc tgcaggactt caagatcgtg cccatcgacc ccaccaagaa catcatgggc 780
 atcgagggtgc ccgagacact ggtgcacaag ctgaccggca agaaagtac cagcaagaac 840
 ggccagccca tcatccctgt gctgtgcctt aagtacatcg gcctggaccc cgtggccctt 900
 ggccagcctga ccatgggtgat cacacaggac tgcgatacct gccacagccc cgcagcctg 960
 cccgcctgga ttgagaagta atag 984

<210> 34
 <211> 326
 <212> NPT
 <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 80

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
 145 150 155 160
 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
 225 230 235 240
 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> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність промотору
 <400> 35
 taataataga aactataatc atataatagt gtaggttggg agtattgtc ttgtgactag 60
 agactttagt taaggctacg taataataga aactataatc atataatagt gtaggttggg 120
 agta 124
 <210> 36
 <211> 2046
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> кодон-оптимізована ДНК послідовність GP-MARV-Angola
 <400> 36
 atgaagacga cctgcctgct gatctcgctg attctgattc agggagtga aacccttccc 60
 attctcgaga ttgcctctaa tatccagcca caaaatgtcg acagtgtgtg ttccggaacc 120
 ctccagaaga cagaggatgt tcacctcatg ggattcactc tgtctggaca gaaagtgcga 180
 gactctcttc tggaggctag caaaagatgg gctttccggg cagggtgtcc accaaaaaac 240
 gtcgagtata ctgaaggcga agaagctaag acttgtrata acatttccgt caccgatccc 300
 agtggaaaaat cctctcttct ggatccacca actaacatta gggattacc gaaatgtaag 360
 acaattcatc acattcaagg acagaacctt catgcccaag ggattgccct ccattctctgg 420
 ggtgcattct ttctgtacga caggatcgca tctacaacaa tgtatagagg caaagcttc 480
 acggaagggg acatagctgc tatgatagtt aacaaaacag ttcacaaaat gattttcagt 540
 cggcaagggc agggataccg ccataigaat ttgacctcga ctaacaaata ctggacatcc 600
 tcgaacggaa cccaaacaaa cgatactggc tgtttcggga cactccagga gtacaactct 660
 acaagaagacc aaacgtgtgc tccctcraag aagccactgc ctcttcccac cgtccacctt 720
 gaagtgaagc tcacatctac cagcacagat gccactaagc tcaacacgac agaccctaatt 780
 tctgatgacg aggatctcac cacatcggc tccgggagcg gcgagcaaga accctacacc 840
 acatctgacg cagccacaaa gcaagggtcg tccagcacta tgccacctac tcttagccca 900
 caaccagta cactcaaca gggagggaac aatacaaatc attctcaggg cgtgggcaca 960
 gagcccgga agaccaatc aactgctcag cttctatgc ctctcaca taccacaacg 1020
 atttcgacga ataacacgag caaacacaat ctgagcacac ccagcgtgcc catccagaac 1080
 gccacaaatt acaatacaca gtctacagct ccagagaatg aacagacatc cgtccctagc 1140
 aagaccacgc tgcctgctac cgagaatcca acaaccgta aatccaccaa tagcaccacg 1200
 tctccacca ccaccgtgcc taacaccaca aacaagta gacccctcc cagccctaca 1260
 cctaactcca ccgctcagca tctcgtgtat ttctgcgca agagaaacat cctctggaga 1320
 gagggagata tgtttccatt tctcgacggg ctcatatg cgcctatcga ttttgatccg 1380
 gtccgaaca caaagacgat ctctgatgag tctagctcta gggagcctc agcagaggaa 1440
 garcaacatg ctagtccaa tatttccctc accctgacct atttccctaa agtgaatgaa 1500

```

aatacgcctc actctggaga aaacgaaaat gactgtgacg ctgaactctg gatttggtcc 1560
gttcaggagg atgattctgc cgcaggactc tcttggtatc ccttcttttg accagggatc 1620
gaaggactgt atacagctgg actcatcaaa aatcagaaca atctcgtgtg tcggctcagg 1680
cggctcgcta accaaactgc caaaagcctt gagctccttc tgcgggtcac cacagaggaa 1740
agaacatttt ctctgattaa tcgtcacgct atagactttc tctcgcctcg gtgggggtga 1800
acctgcaaag tctcggacc tgattgctgt atcggaattg aagatctgtc gcggaatatc 1860
tctgagcaaa tcgattcagat taagaaagat gagcaaaagg aaggtacagg gtggggattg 1920
gggtgaaaaa ggtggacttc cgattggggg gtctcacta atctcgggat cctcctctg 1980
ctctccattg ccgtccrgat cgctctgtca tgtatttga gaatctttac aaagtatat 2040
gggtga 2046

```

```

<210> 37
<211> 681
<212> NPT
<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 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	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	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	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 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 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

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Застосування рекомбінантного вектора на основі модифікованого вірусу вісповакцини (MVA), що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує глікопротеїн оболонки (GP) вірусу Марбург (MARV), для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики викликаного MARV захворювання, причому рекомбінантний вектор MVA містить:
 - першу нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше один імуногенний білок глікопротеїну оболонки MARV;
 - другу нуклеїнову кислоту, яка кодує імуногенний білок глікопротеїну оболонки Zaire Ebola virus (ZEBOV);
 - третю нуклеїнову кислоту, яка кодує імуногенний білок глікопротеїну оболонки Sudan Ebola virus (SEBOV); і
- 10

четверту нуклеїнову кислоту, яка кодує імуногенний білок нуклеопротеїну Cote d'Ivoire Ebola virus (EBOV-CdI).

2. Застосування за п. 1, в якому глікопротеїн оболонки MARV являє собою повнорозмірний глікопротеїн оболонки MARVMusoke.

5 3. Застосування за п. 2, в якому перша нуклеїнова кислота кодує імуногенний білок, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 6.

4. Застосування за п. 3, в якому перша нуклеїнова кислота містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5.

10 5. Застосування за п. 1, в якому рекомбінантний вектор MVA містить нуклеїнову кислоту, яка кодує імуногенний білок, що має послідовність, вибрану з групи, яка складається із: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 і SEQ ID NO: 37.

6. Застосування за п. 1, в якому рекомбінантний вектор MVA містить нуклеїнову кислоту, яка кодує імуногенний білок, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29 або SEQ ID NO: 31.

15 7. Застосування за п. 6, в якому вказана нуклеїнова кислота містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28 або SEQ ID NO: 30.

8. Застосування за будь-яким із пп. 1-7, в якому введення забезпечує захисний імунітет або захисну імунну відповідь у суб'єкта.

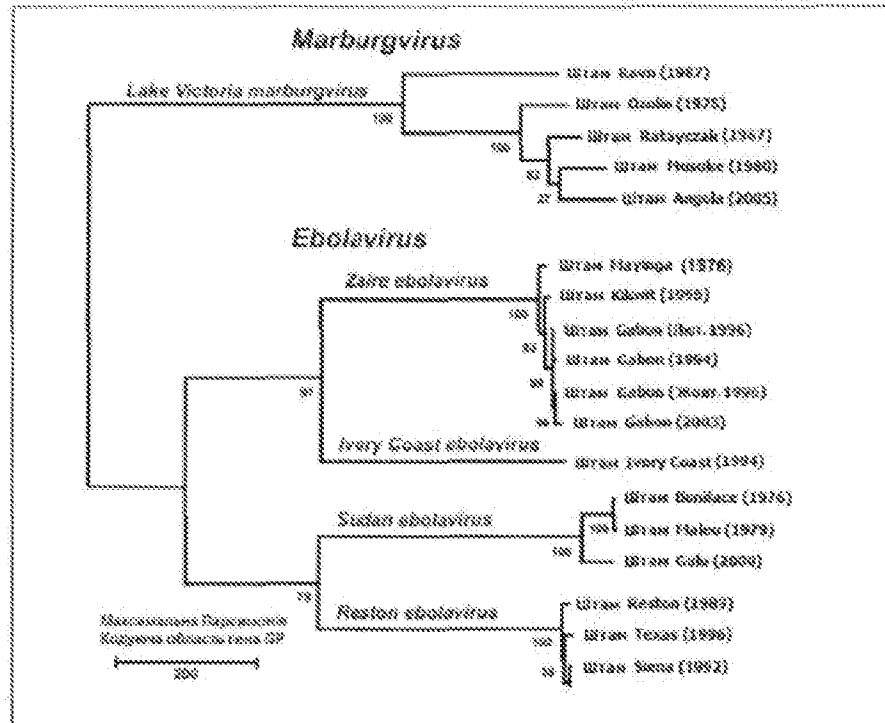
20 9. Застосування за п. 1, в якому рекомбінантний вектор MVA містить щонайменше одну нуклеїнову кислоту, яка кодує послідовності, вказані в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 31.

10. Застосування за будь-яким із пп. 1-9, в якому рекомбінантний MVA додатково містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CD40L.

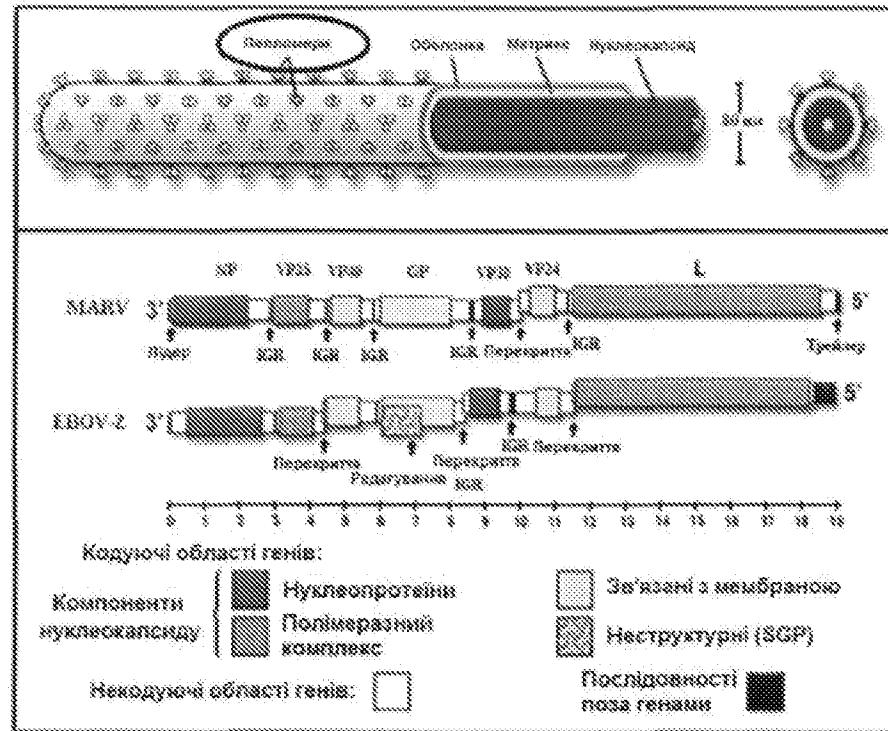
25 11. Застосування за п. 10, в якому CD40L містить амінокислотну послідовність, вказану в SEQ ID NO: 10.

12. Застосування за п. 11, в якому нуклеїнова кислота, яка кодує CD40L, містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9.

Фігура 1

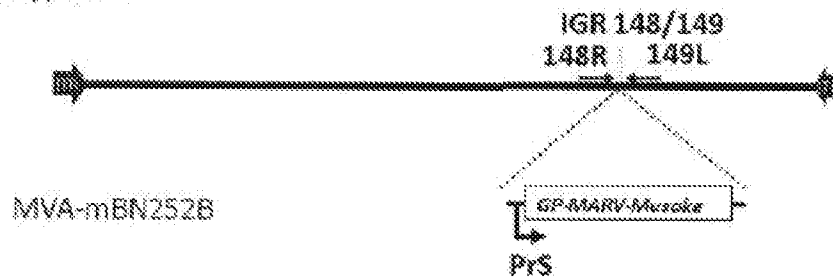


Dirya 2

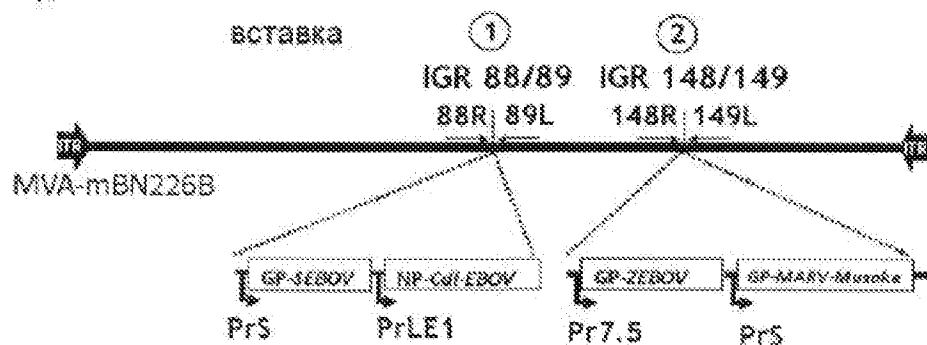


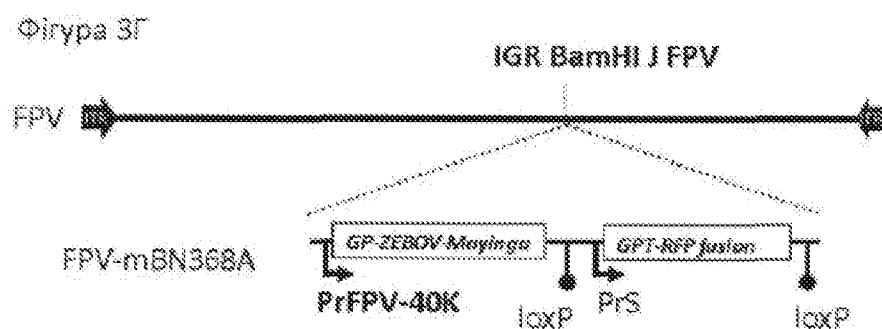
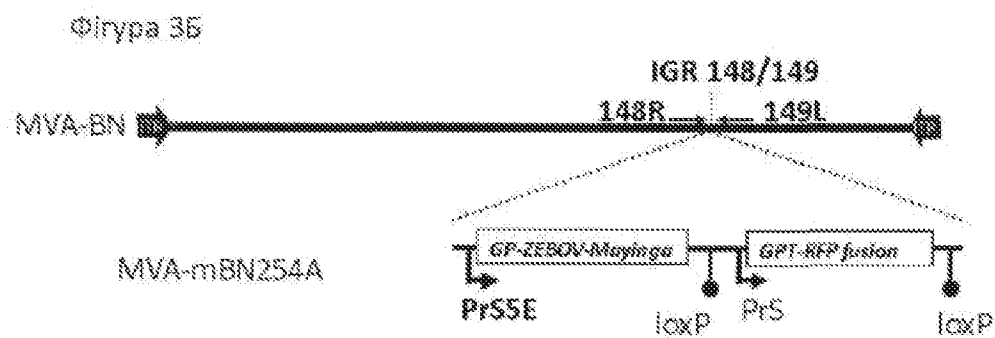
Zancovvero & Fields ed.: Virology

Фирма 3А

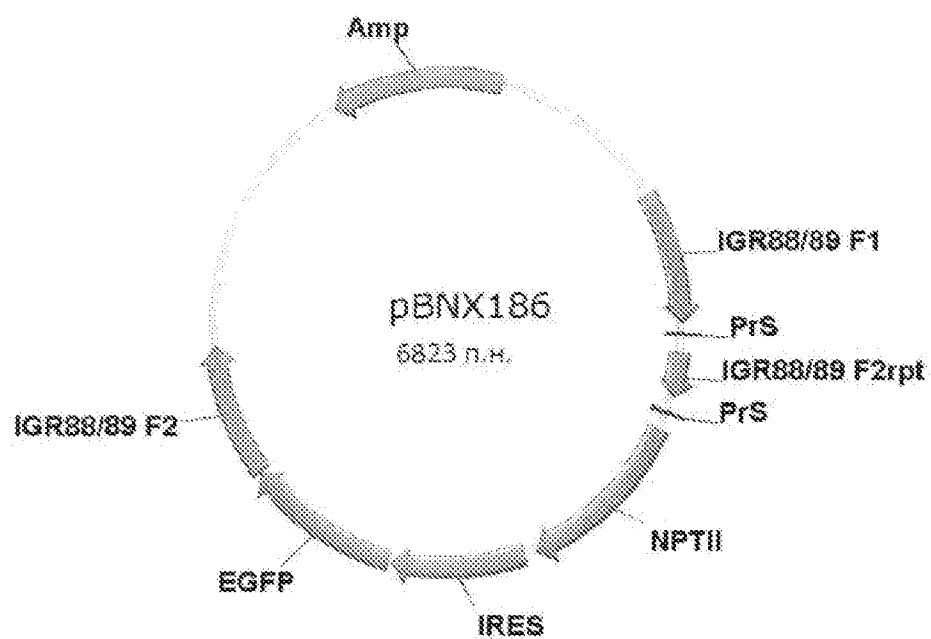


Q1708 35

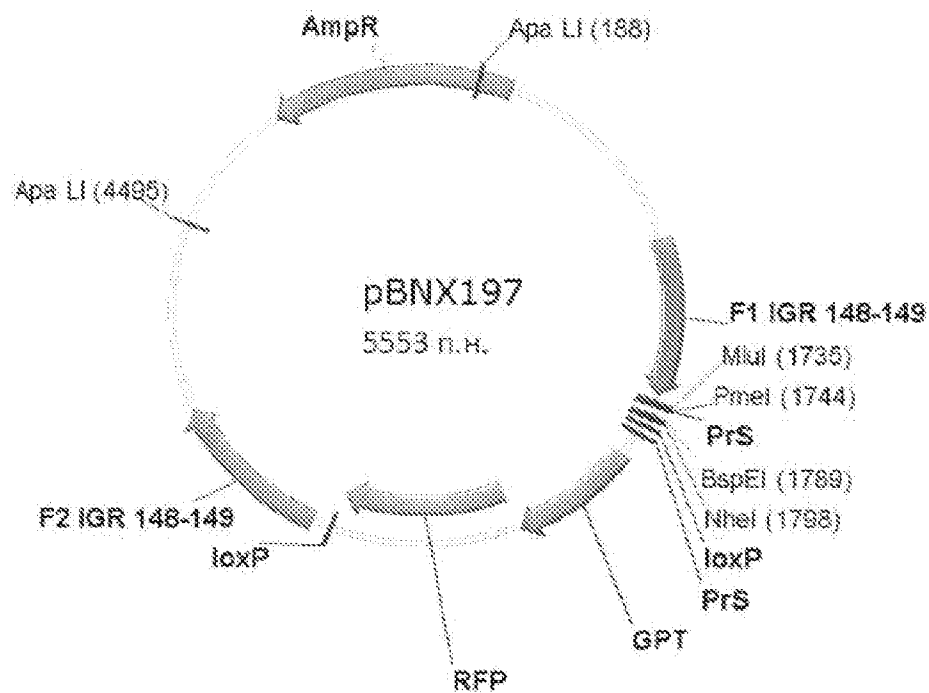




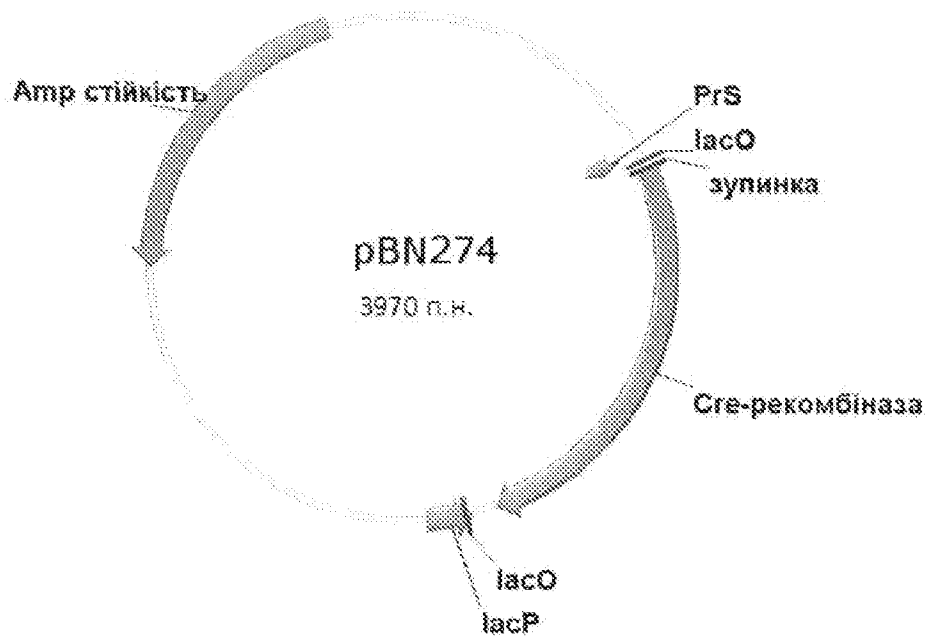
Φirypa 4A



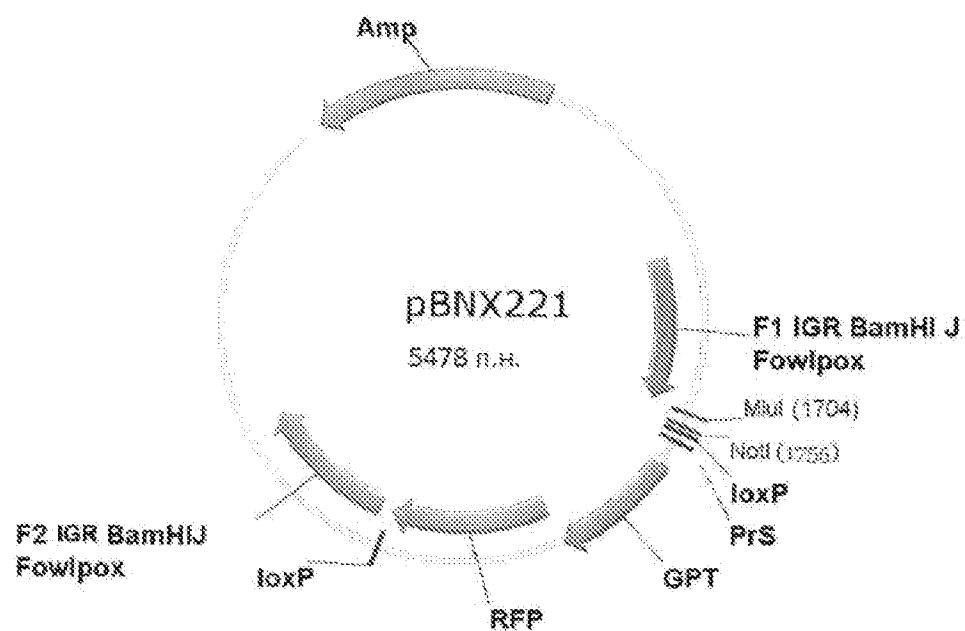
Фігура 4Б



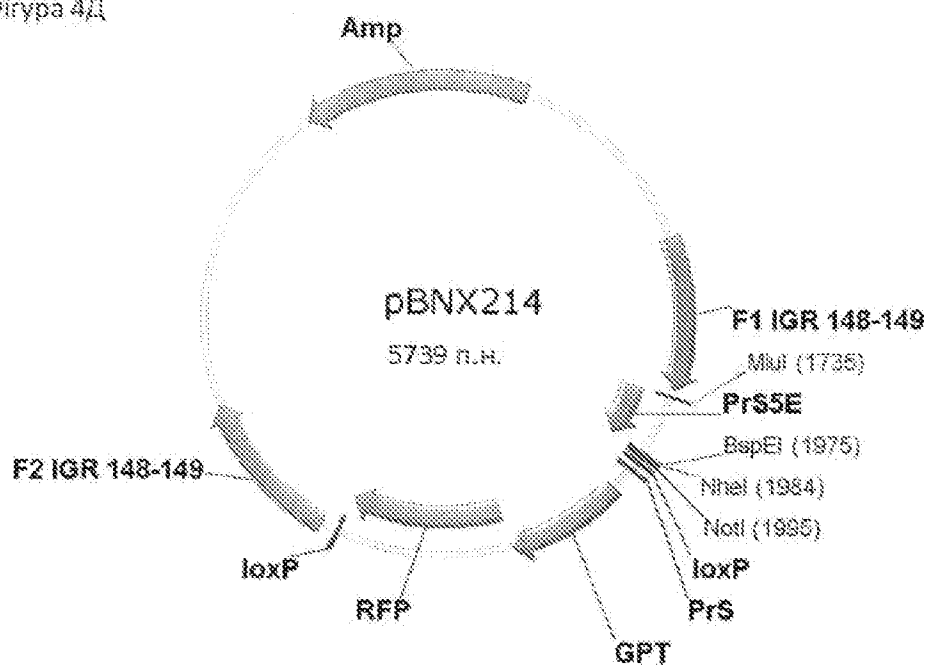
Фігура 4В



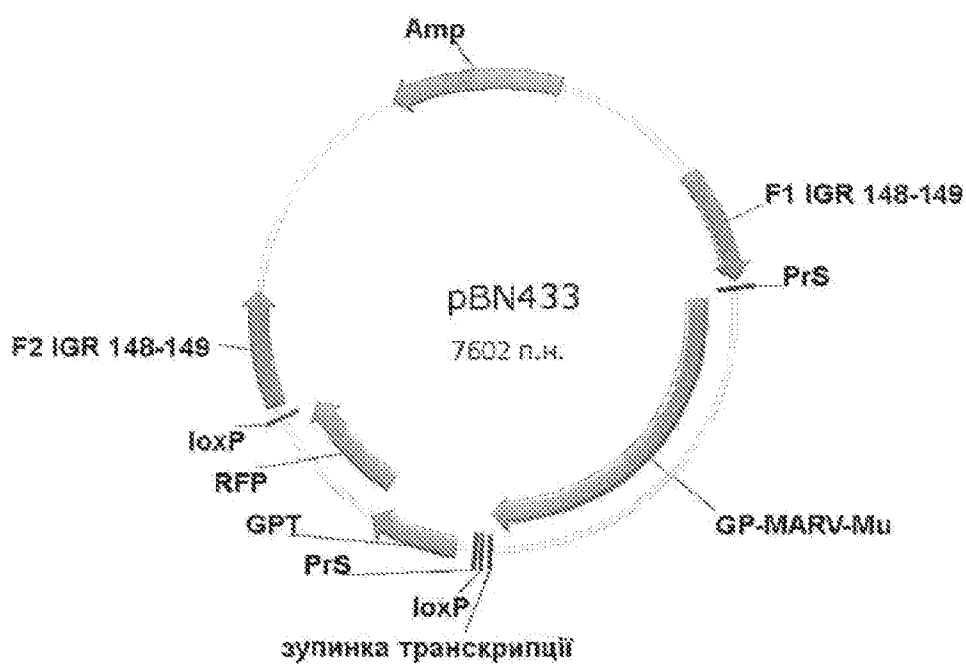
Фігура 4Г



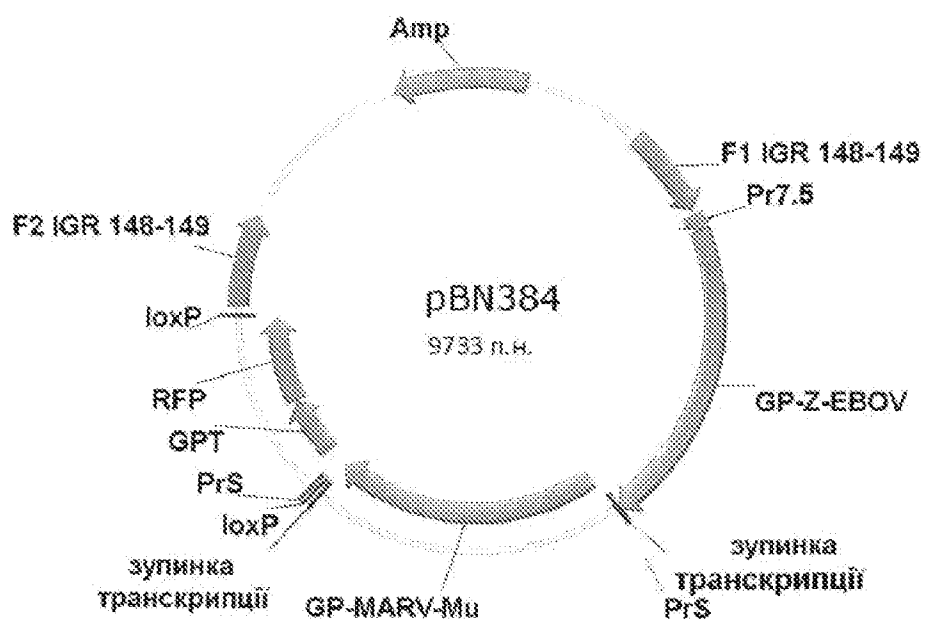
Фігура 4Д



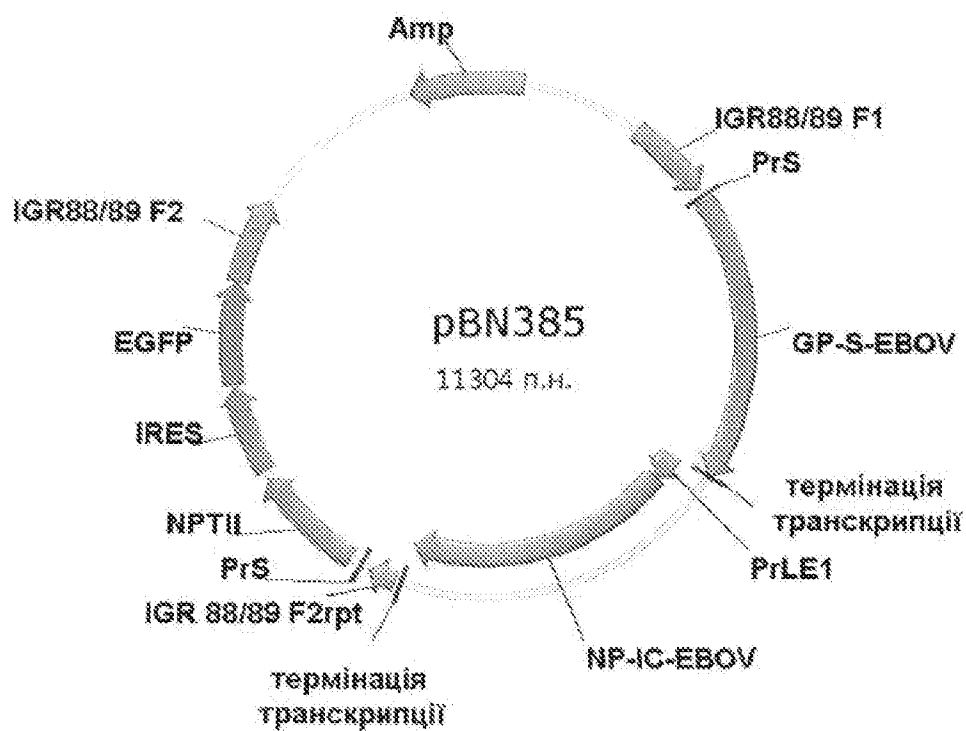
Фірма 5А



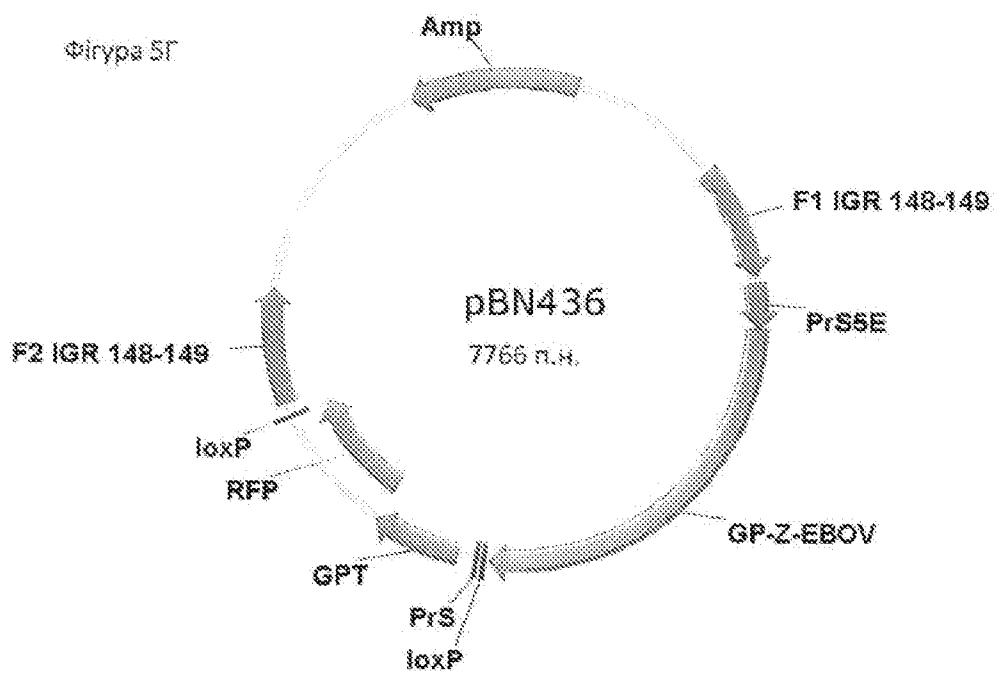
Фірма 5Б



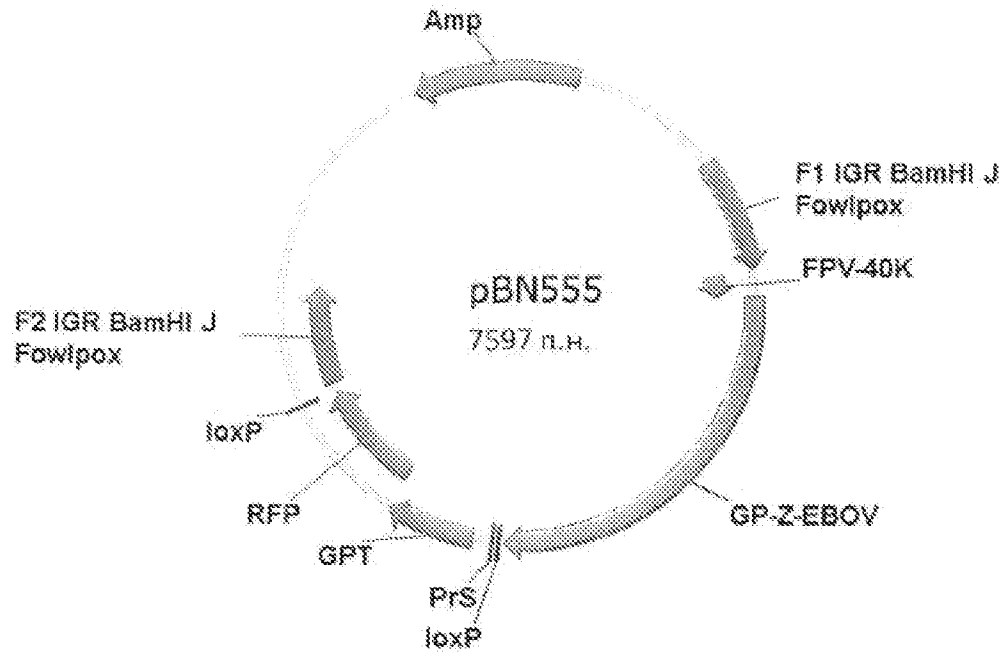
Фігура 5В



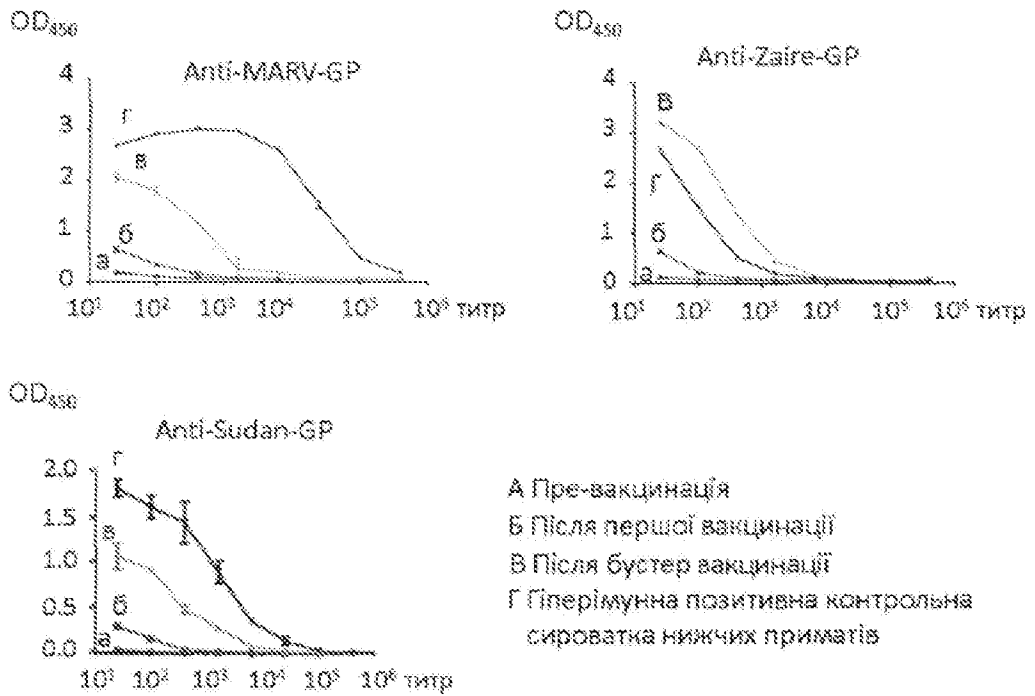
Фігура 5Г



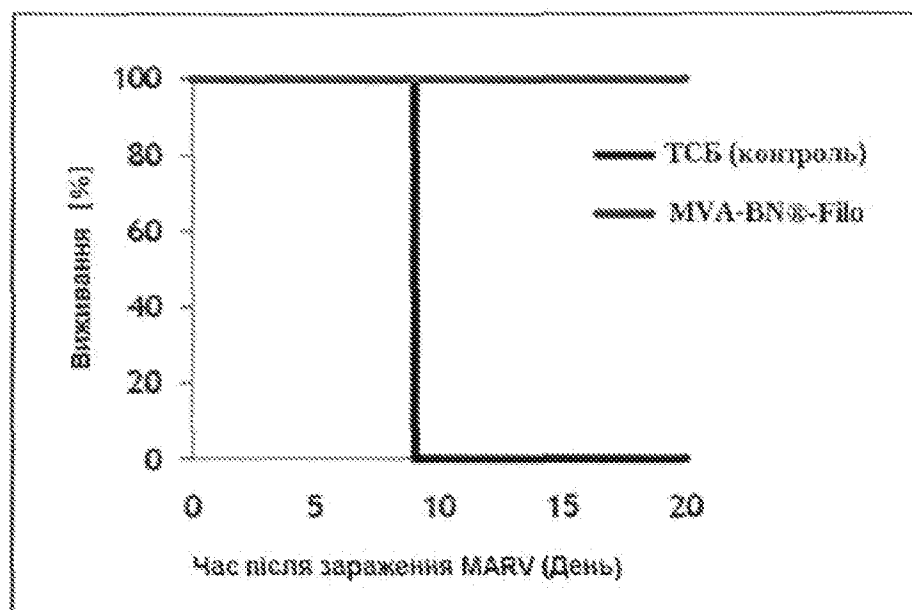
Фігура 5Д



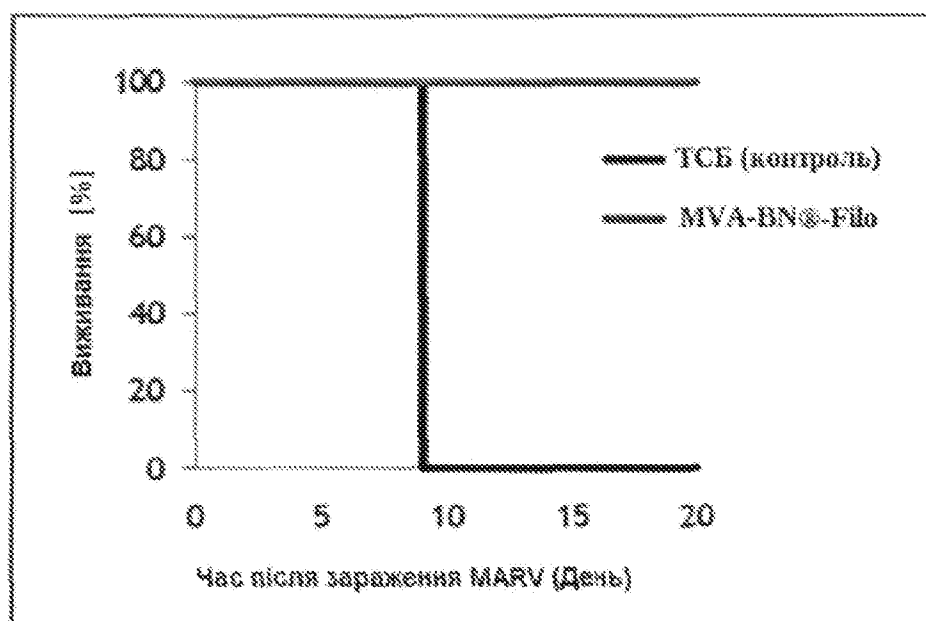
Фігура 6



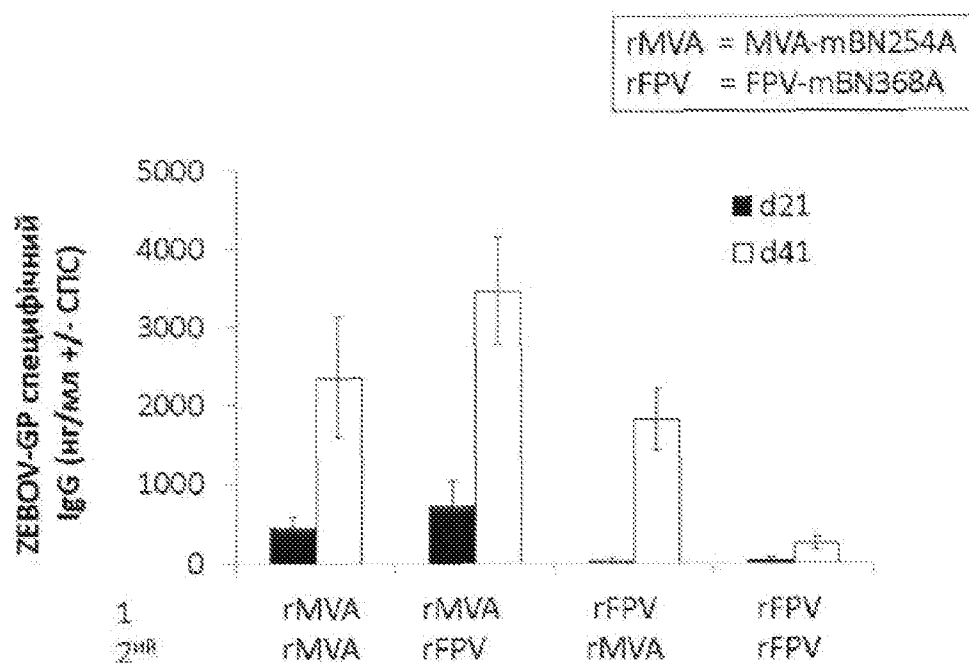
Фігура 7А



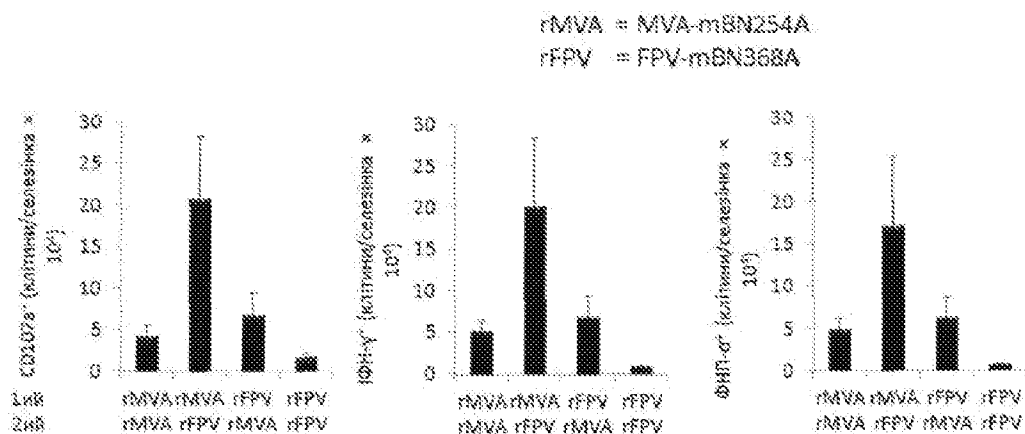
Фігура 7А



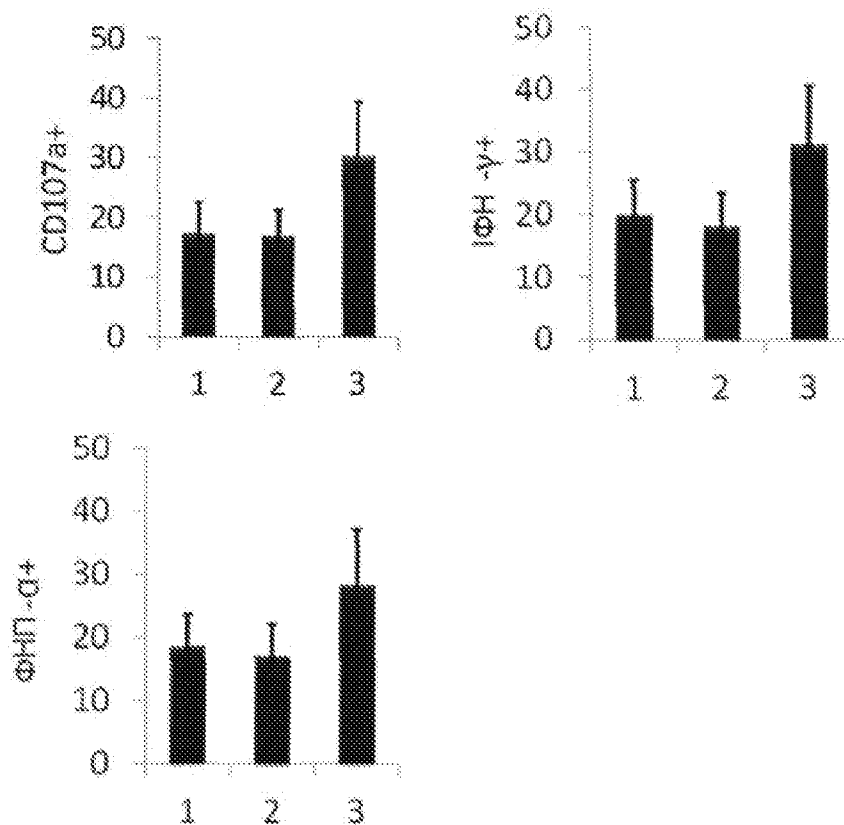
Фігура 8А



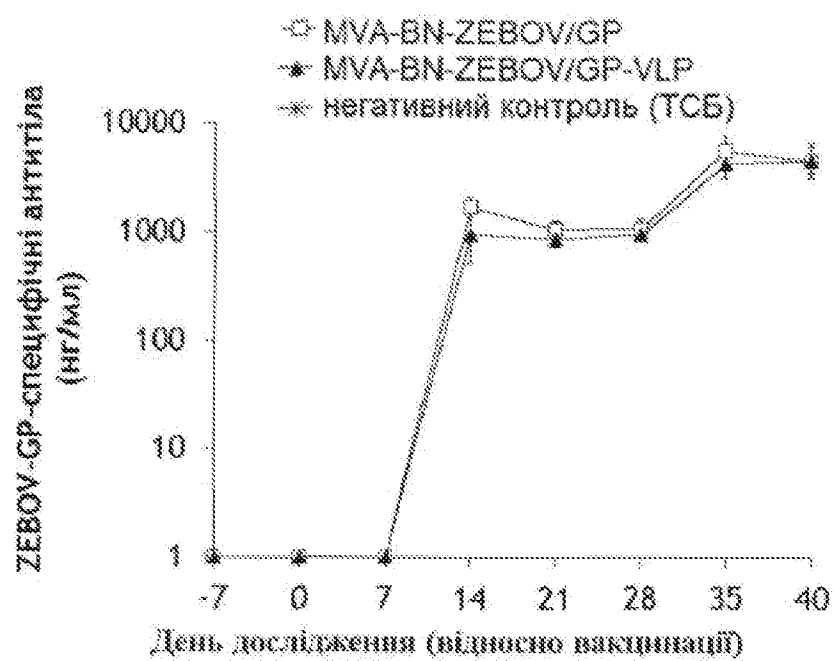
Фігура 8Б



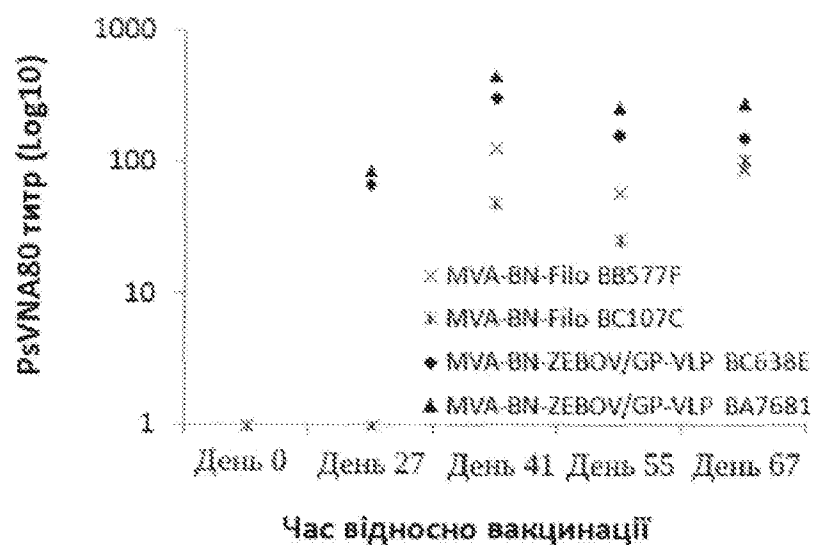
Фігура 9



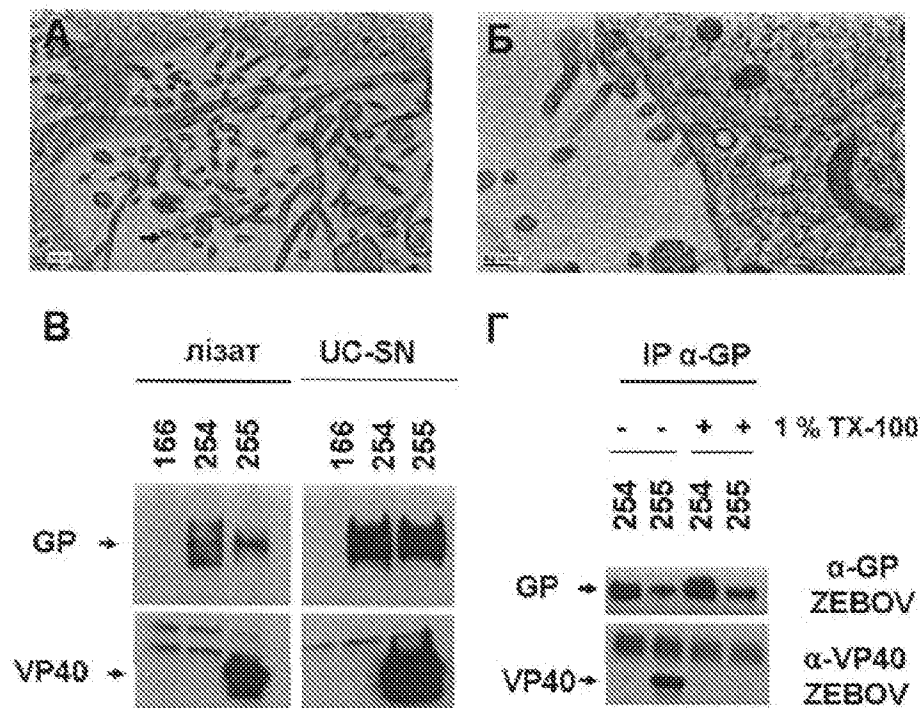
Фігура 10



Фігура 11



Фігура 12



Фігура 13

