

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201800108 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C12N 7/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.07.15

(54) ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АБРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 3652/CHE/2015

(32) 2015.07.16

(33) IN

(86) PCT/IN2016/050241

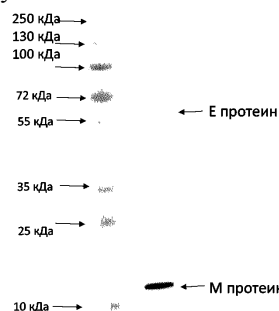
(87) WO 2017/009873 2017.01.19

(71) Заявитель:
БХАРАТ БАЙОТЕК ИНТЕРНЭШНЛ
ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Суматхи Кандасвами, Элла Кришна
Муртхи (IN)

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Представленное раскрытие предусматривает вакцинные композиции для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, содержащих антигены вируса Зика в иммуногенных композициях, и в комбинации антигенов Зика с одним или несколькими антигенами арбовируса, такими как антигены вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, способы получения и производства таких композиций для применения в качестве вакцины для индуцирования иммунного ответа у млекопитающих против указанных выше патогенов.



201800108

A1

A1

201800108

ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АБРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Представленное изобретение раскрывает вакцинные композиции содержащие антигены вируса Зика для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика у млекопитающих. Изобретение также раскрывает стабильные вакцинные композиции, содержащие антигены вируса Зика с одним или несколькими антигенами арбовируса, такими как вирусные агенты Чикунгуны и/или Японского энцефалита. Настоящее изобретение также касается способов получения, формулирования и применения данного средства для одновременного вызывания иммунного ответа к каждому из указанных выше патогенов у млекопитающих и приемлемого для иммунизации субъектов-людей.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время в мире не существует доступной вакцины для профилактики или лечения против вирусных инфекций Зика. Таким образом, не существует никаких данных из предыдущего уровня техники, релевантных изобретению, раскрытому в данной заявке. Однако, для общего понимания предпосылки и задачи, лежащие в основе данного изобретения, обсуждаются далее в данном документе в параграфах ниже.

Авторы изобретения данной патентной заявки предусматривали эпидемический потенциал вируса Зика в регионах с высокой распространенностью комаров *Aedes*, в частности *Aedes aegypti*, передающие вирус. Интерес к инициированию проекта вакцины «Зика» на ранней стадии, за несколько месяцев до того, как причинная связь вирусной инфекции Зика с синдромом Гиелла Берра и микроцефалией стала общедоступной в декабре 2015 года, заключалась в том, что ни в одной стране мира не было ни готовности, ни мероприятий, инициированных кем-либо в то время для разработки вакцины, чтобы остановить продолжающуюся передачу вируса в таких странах, как Бразилия, и предотвратить дальнейшую передачу в странах, находящихся под угрозой вируса Зика. Увеличение международных поездок в регионы и из регионов из которых продолжается передача вируса, создает серьезный риск начала вспышки заболевания в странах с высокой распространенностью комаров *Aedes*, в частности *Ae. aegypti*, и тех, которые имеют большое наивное население, которое не подвергалось воздействию вируса. Клиническая картина вирусной инфекции Зика на ранних стадиях с характерной высокой температурой, макулопапулярной сыпью и артралгией удивительно похожа на ранние симптомы вирусных инфекций Чикунгуны и денге, что делает дифференциальную диагностику особенно сложной.

Проект вакцины против вируса Зика был инициирован в то время, когда было, очень мало или не было никакой информации о вирусном патогенезе, генетическом разнообразии, передаче, диагностике, серологических коррелятах для защиты или модели животных для исследования концепций вакцины. С точки зрения вакцины, отсутствовали сведения о возможности культивирования вируса *in vitro* на клеточных субстратах, и если возможно, то какие клеточные субстраты наиболее приемлемы, механизм адаптации к клеткам, потенциальные титры вирусов и возможность осуществления производства вакцинного продукта для введения человеку, так как опубликованная информация в то время касалась прохождения вируса в мозг мыши, что не приемлемо для производства вакцины. В конце 2014 года Bharat Biotech сделал шаги, для запуска проекта вакцины Зика, и в скорое после

этого начал экспериментальную работу, которая в результате привела к заявленной патентной заявке.

Инфекции арбовируса (распространяющиеся членистоногими) вызваны вирусами, которые распространяются членистоногими, такими как комары. Они вызывают значительные заболевания человека, начиная от мягкой, бессимптомной инфекции до острого энцефалита или геморрагической лихорадки, которые могут оказаться фатальными. Наиболее значимые арбовирусы, вызывающие заболевание человека, принадлежат к трем вирусным семействам, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, и *Bunyaviridae*. Арбовирусные инфекции являются «буйными» в развивающихся странах, и вызывают серьезную заболеваемость, особенно у пожилых людей. Общей характерной особенностью арбовирусных инфекций, вызванной вирусами Денге, Чикунгунья, Зикой, японским энцефалитом и Западного Нила, среди других: лихорадка, головная боль, миалгия, боли в суставах с отеком и макулопапулярная сыпь во время острой фазы вирусной инфекции. Артралгия является особенно характерным признаком для лихорадки вируса Чикунгунья, денге и Зика. Со-инфекции являются общими, поскольку арбовирусы в основном распространяются одинаковыми комарами-переносчиками, такие как, например, вирусы денге, Чикунгунья и Зика, которые передаются комарами *Aedes*. Вирус японского энцефалита и вирусы Западного Нила передаются преимущественно комарами *Culex*. Проблема остро стоит в развивающихся странах, где программы борьбы с комарами-переносчиками были неэффективными и в основном неудачными. Проблема осложняется тем, что не существует надежных способов диагностики для диагностики заболевания, вызываемого вирусами с уверенностью. Международные путешествия способствовали широкому распространению данных инфекционных агентов, и заболевания, такие как денге и Чикунгунья, которые до сих пор ограничивались только тропическими странами, теперь распространяются географически на новые районы и в регион с умеренным климатом. Как сообщается, вирус Зика распространился на более чем 65 стран за последние два года. Профилактика аутохтонных эпидемий, о которых сообщают в нескольких странах в данных регионах, поддерживается местной популяцией комаров-переносчиков.

Вирус Зика (ZIKV) представляет собой возникающий зоонозный арбовирус, который относится к семейству *Flaviviridae*. Подобно вирусам Денге и Чикунгунья, вирус Зика также может передаваться комарами *Aedes*, в частности *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus*, *A. albopictus* и преимущественно *A. aegypti*. Туристические поездки в страны, где сообщалось о недавних эпидемиях, такие как Полинезия, способствовали географическому распространению вирусной инфекции в Бразилию, Колумбию, Италию и другие страны. Сообщалось о аутохтонных вспышках вируса в Италии, вызванных из-за локализованных комаров *Aedes*. В Азии вирусная инфекция Зика наблюдалась эпизодически в Камбодже, Таиланде, Индонезии, Малайзии и Бангладеш, хотя в данных регионах не сообщалось о больших эпидемических вспышках.

Вирус Чикунгунья (CHIKV) представляет собой *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Вирус вызывает самоограничивающую фебрильную инфекцию, которая характеризуется острым началом с высокой температурой, головной болью, миалгией, артралгией, отеками суставов и макулопапулярной сыпью. Сильные симптомы, такие как геморрагия, фульминантный гепатит и неврологические симптомы, были зарегистрированы в последних эпидемиях. Вирус Чикунгунья передается как комарами *Aedes aegypti*, так и *Aedes albopictus*. Вирус японского энцефалита (JEV) также представляет собой флавивирус семейства *Flaviviridae* и передается преимущественно комарами *Culex*. JEV связан с Денге, вирусом желтой лихорадки, вирусами Зика и Западного Нила. Инфекция JEV является очень бессимптомной, но в целом она вызывает недомогание с лихорадкой,

головной болью и другими гриппоподобными симптомами. Редко клиническая инфекция развивается до энцефалита с приступами, спастическим параличом, комой и смертью. Дети особенно чувствительны. В странах, эндемических для JEV, большинство взрослых имеют естественный иммунитет после детской инфекции. Взрослые, которые не подвергались инфекции в детстве, чувствительны в любом возрасте. Частота смертности от JEV, вызванная энцефалитом, может составлять до 30%. Неврологические осложнения или психиатрические симптомы возникают в большинстве случаев с энцефалитом. Во всем мире примерно 3 миллиарда населения находится под угрозой заражения JEV. Несколько вакцин для профилактики инфекции JEV были успешно проданы. Вирус денге (DENV) является членом семейства *Flaviviridae*. Арбовирусная инфекция больше не может рассматриваться как специфическая для региона, поскольку сейчас она широко географически распространена и является значительной проблемой общественного здоровья во многих частях мира. Заболеваемость, вызванная упомянутыми выше арбовирусными инфекциями, обычно высокая, и артралгия, в частности, неблагоприятно влияет на физическую мобильность пациентов. Вирус Зика вызывает более серьезные врожденные деформации при рождении, во время инфицирования, во время беременности, и Зика, связанные с синдромом Гиелла Берра, были подтверждены в текущих эпидемиях. Как и любые другие вирусные инфекции, не существует специальных терапевтических средств. Профилактическая вакцинация может эффективно прерывать передачу вируса Зика, и вакцина будет фронтом защиты от вирусного заболевания Зика.

Учитывая это, была разработана эффективная стратегия предотвращения дальнейшей передачи вируса Зика для защиты наивного населения, в странах, где наблюдается эпидемия, и в странах, где еще не было сообщено об активной передаче вируса Зика. Комбинированная вакцина для арбовирусных инфекций представляет собой хорошую стратегию защиты уязвимых групп населения от изнурительных заболеваний, вызванных Денге, Чикунгунья, Зика, японским энцефалитом, вирусами Западного Нила и желтой лихорадки. Вакцины для JEV, желтой лихорадки и одного из серотипов денге есть в продаже, и вакцины для Западного Нила и CHIKV находятся в клинической разработке. Пока не существует вакцины для вирусной инфекции Зика, и в данном изобретении раскрываются способы разработки первой вакцины кандидата Зика.

Однако выбор антигенов для включения в такой комплект вакцины, зависит от нескольких факторов. Зависящее от антитела усиление вируса, вызванное серотипами лихорадки Денге, хорошо исследуемо и опубликовано, и также кросс-реактивность флавиовирусных антител. Но непонятно то, как бы такая интерференция или перекрестная реактивность распространенности антител Чикунгунья в одной и той же популяции, подверглась экспозиции вируса Зика. Аналогичным образом не было известно, могут ли антитела к вирусу японского энцефалита вызвать антигенные вмешательства в развитие иммунитета к вирусу Зика, и было интересно думать о том, что они так же изучаются. Предлагаемая работа также дает представление о любой возможной иммунной интерференции, вызванной распространенными антителами JE и CHIKV к вакцине кандидату Зика.

В данном изобретении вакцины с вирусом кандидата Зика были разработаны и испытаны относительно эффективности с использованием различных композиций для обнаружения соответствующего уровня иммунного ответа для защиты от вирусного заболевания Зика. Поскольку отсутствие значительной антигенной интерференции к Зика вызванной иммунной реакцией вакцины против вируса японского энцефалита и вакцины против вируса Чикунгунья при одновременном введении или в комбинации в качестве комбинированной вакцины, препараты были эффективными для выявления высокого

уровня нейтрализующих антител, способных обеспечить защиту против каждого из вирусов.

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Одна из задач изобретения заключается в обеспечении стабильных иммуногенных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика.

Другая задача изобретения заключается в обеспечении способов адаптации и роста вируса Зика в клетках Vero.

Иная задача изобретения заключается в обеспечении способов получения инактивированной вакцины против вируса Зика и очистки вирусного объемного антигена Зика.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов инактивации вируса Зика химическими средствами с формалином, бета-пропиолактоном и пероксидом водорода.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов инактивации вируса Зика физическими средствами, такими как нагревание, гамма-излучение и ультрафиолетовое излучение.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов получения и формулирования рекомбинантных вирусных антигенов Зика, включающих протеин rgME, и исследования относительно иммуногенности у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов формулирования антигенов вируса Зика с различными адъювантами и оценке иммунного ответа на композиции у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении кинетики иммунного ответа на однократную дозу, две и три дозы формалина и BPL инактивированной вакцины против вируса Зика у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении иммуногенных композиций для профилактики вирусных инфекций Зика и Чикунгунья.

Другая задача изобретения заключается в обеспечении иммуногенных композиций для профилактики вирусных инфекций Зика, Чикунгунья и японского энцефалита.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Представленное изобретение касается композиций и способов изготовления вакцинных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, а также инфекций вызванных другими арбовирусами, такими как вирус Чикунгунья и вирус японского энцефалита.
- В одном аспекте, изобретение касается вакцинных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, где указанные композиции содержат антигены вируса Зика в иммуногенных композициях и также могут содержать один или

более антигенов арбовируса, такого как вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита, вместе с приемлемыми адъювантами и эксципиентами.

- В другом аспекте, изобретение касается способа получения вакцинных композиций согласно процессу, который включает:
 - (a) Применение клеточной линии Vero в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика
 - (b) Масштабирование культивирования вируса Зика вплоть до объема сбора клеток 10 л
 - (c) Инаktivирование вирусной культуры
 - (d) Очистка вирусной культуры
 - (e) В другом аспекте, рекомбинантное клонирование и экспрессирование протеина pRME вируса Зика.
- В одном варианте осуществления изобретения, клеточную линию Vero использовали в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика и выращивали в культуральной среде с или без применения сыворотки.
- В другом варианте осуществления изобретения, вирус Зика был адаптирован путем повторного серийного пассажа в клетках Vero для получения более высоких титров.
- В другом варианте осуществления изобретения, вирус Зика был пассирован в клетки C6/36 *Ae. Albopictus* с последующим ростом в клетках Vero для увеличения титра.
- В другом варианте осуществления изобретения, раскрыты способы масштабирования вирусной культуры и последующей очистки масштабируемых вирусных культур, причем объем сбора клеток составлял примерно 8-10 л. Собранные вирусные клетки были инаktivированы с использованием различных способов. Вирус затем чистили.
- В другом варианте осуществления изобретения, способ инаktivации выбирают из группы инаktivации формалином, инаktivации бета-пропиолактоном (BPL), инаktivации нагреванием, инаktivации УФ, гамма-инаktivации, в присутствии или при отсутствии стабилизирующих агентов и аминокислот.
- В предпочтительном варианте осуществления изобретения, аминокислоты были отобраны индивидуально или в комбинации из группы L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-глицина и L-аспарагиновой кислоты и L-глутамина и альбумина сыворотки человека.
- В другом предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, способ очистки выбирают с помощью использования целюфинсульфата, DEAE-сефадекса CM-сефадекса с градиентом соли, с использованием гель-фильтрации на Capto core-700, Sepharose CL-4B, керамической гидроксипатитной колонки с градиентом от 0,2М до 0,8М фосфата, с последующей диафильтрацией и ультрацентрифугированием на 20-60% градиента сахарозы, наиболее предпочтительно с использованием колонки Capto core 700.
- Другой вариант осуществления изобретения касается рекомбинантного клонирования, и предполагается экспрессия протеина pRME вируса Зика. Способ рекомбинантного клонирования использует сайт-специфическую транспозицию экспрессионной кассеты с клонированными вставками в бакуловирусный шаттл-вектор, который распространяется в *E. coli* и экспрессируется в клетках насекомых.
- В другом варианте осуществления изобретения, предусмотрены вакцинные композиции. Вакцина может содержать один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вирусов японского энцефалита.
- В другом варианте осуществления адъюванты могут быть выбраны из группы из алюминиевых солей, инулина, альгамулина, комбинации из инулина и гидроксида

алюминия, монофосфориллипида А (MPL), резиквимоида, мурамилдипептида (MDP), N-гликолилдипептида (GMDP), поли IC, CpG олигонуклеотида, резиквимоида, гидроксида алюминия с MPL, любой эмульсии вода-в-масле, любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги, или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбитана триолеат, альфа-токоферол, холекальциферол или любой из аналогов и производных их молекул, или фосфата кальция или любой комбинации адъювантов.

- В другом варианте осуществления изобретения, композиции получают с эксципиентами и консервантами.
- В другом варианте осуществления изобретения, стабилизирующие агенты в вакцинных препаратах использовались индивидуально или в комбинациях с сорбитом, L-глицином, маннитом, L-глутаминовой кислотой и альбумином сыворотки человека, в различных концентрациях использовались для исследования вакцинного препарата.
- В другом варианте осуществления изобретения, эффективность вакцинных композиций исследовалась в моделях на животных, для демонстрации полной защиты от вирусемии в широком диапазоне дозирования.
- В другом варианте осуществления изобретения, комбинированные вакцинные композиции были также эффективными для обеспечения адекватной защиты против японского энцефалита, а также вирусов Чикунгунья.
- В другом варианте осуществления изобретения, антисыворотка предоставляет пассивный иммунитет у кролика против инфекции вируса Зика, для обеспечения полной защиты от вирусемии, тогда как вирусемия была детектирована у контролируемых животных, которая персистировала вплоть до 6 дней после обнаружения вируса.
- В другом варианте осуществления изобретения, вакцина с кандидатным инактивированным вирусом Зика может вводиться или однократно, или двумя или более дозами внутримышечным способом.
- В другом варианте осуществления изобретения, анализы по нейтрализации титров антител проводили для проверки уровней антитела по отношению к вакцинным композициям по представленному изобретению, которые, как показано, вызывают высокий уровень нейтрализующих антител.
- В другом варианте осуществления изобретения, исследования кросс-нейтрализации демонстрировали, что инактивированные вакцинные композиции по представленному изобретению были бы одинаково защитными и эффективными против любого штамма вируса Зика.
- В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, титры антител как для BPL инактивированных, так и инактивированных формалином Зика вакцинных композиций были выше с гидроксидом алюминия, чем с антигеном самостоятельно.
- В другом варианте осуществления изобретения, качество ответа антител к вакцинной композиции по представленному изобретению с помощью анализов авидности антител, показало, что антитела с высокой аффинностью были разработаны в течение времени с повторными иммунизациями.

Соответственно, изобретение обеспечивает стабильную вакцинную композицию, содержащую один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, причем указанные антигены формулируются с или без адъюванта в фармацевтически приемлемом буфере, где вакцинная композиция вызывает защитный иммунный ответ к каждому из вирусов у

млекопитающих. Вирусный антиген Зика композиции является эффективным для лечения, диагностики и профилактики по отношению к любому генотипу/генотипным вариантам/штаммам вируса Зика, причем композиция является эффективной против любого генотипа/генотипных вариантов/штаммов/синтетических вирусов Зика, которые распространяются где-либо от 50% до 100% идентичности на аминокислотном уровне в любом участке генома. Композиция по изобретению содержит антигены вируса Зика любого генотипа/генотипического варианта/штаммов/синтетического вируса Зика, причем антитела против любого из указанных выше типов вируса Зика перекрестно нейтрализуют гомологический вирус или любой гетерологичный штамм вируса Зика, которые распространяются по меньшей мере по 50%-100% аминокислотной идентичностью в любой области всего его генома, в частности протеина оболочки Е.

Антигены вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита композиции инаktivированы целыми вирионными (вирусными) антигенами. В свою очередь, антигены вируса Зика и Чикунгунья представляют собой очищенные рекомбинантные антигены.

Вирусный антиген Зика по изобретению получают с использованием клеток Vero, в качестве клеточного субстрата путем адаптации вируса к клеткам Vero.

Вирусный антиген Зика композиции по изобретению представляет собой очищенный и концентрированный антиген, полученный по одному или несколькими способами, выбранными из:

- a. ультрацентрифугирования;
- b. центрифугирования по градиенту плотности;
- c. осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации, с последующей очисткой с использованием колоночной хроматографии; и
- d. тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 кДа до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инаktivации вируса.

При этом очистка с использованием колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, ионообменную колоночную хроматографию, аффинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями. Колоночная хроматография элюирует предпочтительное большинство вирусного антигена в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, где образец вируса очищен на Capto Core 700 колонке и является элюированным в потоке.

Вирус Зика композиции инаktivирован, по меньшей мере, одним или несколькими из химического инаktivировующего агента, физического инаktivировующего агента и облучающего агента, где инаktivацию вируса Зика осуществляют перед или после очистки вируса. В иллюстративном варианте осуществления вирус Зика инаktivирован с использованием химического инаktivировующего агента, выбранного из формалина (формальдегида), бета-пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.

В одном предпочтительном варианте осуществления вирус Зика инаktivирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из:

- a. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1: 500 вплоть до 1: 4000 об./об. формалин: вирус, при от 8°C до 37°C, предпочтительно 25 ± 3°C, в течение, по меньшей мере, от 1 до 7 дней;

- b. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1: 4000 об./об. формалин : вирус, при от 2⁰С до 8⁰С в течение, по меньшей мере, от 10 до 30 дней;
- c. Бета-пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1: 4000 об./об. BPL : вируса, в течение, по меньшей мере, от 24 до 48 часов при температурах, которые находятся в диапазоне от 8⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение 48 часов;
- d. Бета-пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1: 500 вплоть до 1:4000 (BPL : вируса, об./об.), при от 2⁰С до 8⁰С в течение, по меньшей мере, 3-7 дней;
- e. Комбинации из BPL и формалина при любых из указанных выше условий, предпочтительно инаktivация BPL при 1:3000 (BPL : вируса, об./об.) в течение 24 часов с последующей инаktivацией формалином при 1: 3000 (формалин : вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 часов при от 15⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С;
- f. Пероксида водорода при любой концентрации, от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30⁰С в течение от 5 минут до 120 минут.

В одном варианте осуществления, инаktivация вируса Зика с использованием облучающего агента включает инаktivацию гамма-облучением путем экспозиции от 20 кГр (Кило Грей) вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 кГр до 30 кГр из ⁶⁰Со источника.

В другом варианте осуществления инаktivация вируса Зика с использованием облучающего агента включает инаktivацию облучением УФ путем экспозиции до 254 нм в течение 30 - 60 минут.

В следующем варианте осуществления, вирус инаktivирован путем термической обработки при температуре от 50 °С до 65 °С в течение от 30 минут до 2 часов.

Буфер, используемый в данном изобретении, может быть выбран из списка, включающего фосфатный буфер, цитратный буфер, фосфатно-цитратный буфер, боратный буфер, буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris), сукцинатный буфер, буферы, содержащие глицин или гистидин, в качестве одного из буферирующих агентов, где фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер при концентрации от 5 mM вплоть до 200 mM фосфатных ионов с любым pH от 6,50 до pH 9, и необязательно содержащие натрия хлорид при концентрации от 50 до 200 mM. Буфер поддерживает pH в жидкой композиции выше pH 6,5, предпочтительно выше pH 7,0 в течение всего биологического процесса от вирусной культуры до получения очищенного инаktivированного вируса.

В одном варианте осуществления инаktivацию вируса Зика осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, не ограничивается этим, изо-мальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L -гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций. Однако, в одном предпочтительном варианте осуществления, стабилизирующий агент может быть выбран из:

- a. 2% сорбита и 1% L-глицина;
- b. 1% сорбита и 0,5 % L-глицина;
- c. 1% маннита и 0,5% L-глицина;

- d. 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; и
- e. 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.

В иллюстративном варианте осуществления инаktivация вируса Зика включает инаktivацию любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности, протеин Е в любом гетерологическом вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo*, используя последовательность любого генома вируса Зика.

Очищенный рекомбинантный вирус Зика по изобретению содержит антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (Е), мембранный (М) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика, причем вирус Зика имеет структурные протеиновые последовательности, как раскрыто в SEQ. ID No. 3 и SEQ. ID No. 4, что соответствует нуклеотидной последовательности SEQ ID. No. 1 и SEQ ID No. 2 соответственно, для применения в качестве вакцинных антигенов против вирусных инфекций Зика, вызванных генотипами или их вариантами. Рекомбинантные ДНК конструкторы содержат (i) вектор, (ii) по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, соответствующей SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, кодирующий аминокислотную последовательность протеинов SEQ ID NO.3, SEQ ID NO. 4, соответственно, который является применяемым к любой протеиновой последовательности вируса Зика, которая имеет по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность с указанными выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4. Композиция по изобретению содержит рекомбинантный ДНК конструктор, причем вектор представляет собой эукариотический плазмидный вектор, который является клонированным в эукариотическом хозяине, таком как бакуловиром для экспрессии в клетках насекомых как вирусоподобных частицах (VLP).

Рекомбинантный протеин вируса Зика получают способом, включающем следующие стадии:

- a. трансфекция рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
- b. сбор клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;
- c. очистка протеина способом, выбранном из ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, аффинной хроматографии, гидрофобной колонной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом смол, диафильтрации, ультрацентрифугирования, центрифугирования по градиенту плотности и фракционирования с солью.

Структурные антигены вируса Зика экспрессируются в любой прокариотической или эукариотической системе экспрессирования, включающей экспрессию, опосредованную бакуловиром в клетках насекомых.

Вакцинная композиция по изобретению получается способом, в котором нейтрализующие антитела в значительной степени индуцированы против протеина оболочки, такого как оптимально инаktivированный вирус, живой ослабленный вирус, дезактивированный вирус, ДНК вакцина, вирусоподобные частицы, химерные вирусные частицы, показывающие протеин Е вируса Зика в любом гетерологичном вирусном скелете, такую как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.

Вакцинная композиция по изобретению может дополнительно содержать адъювант, причем адъювант выбранный из группы, состоящей из а) солей алюминия, содержащих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию инулина и алюминия гидроксида; d) монофосфориллипида А (MPL) e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP) g) N-гликолилдипептида (GMDP) h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) алюминия гидроксида с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален, или его аналоги, или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или любой из аналогов и производных их молекул i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда они формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления композиция содержит гидроксид алюминия в концентрации в диапазоне от 0,1 мг до 1,5 мг алюминия на дозу вакцины, предпочтительно от 0,25 до 0,5 мг алюминия на дозу вакцины.

Адъювант композиции по изобретению обеспечивает мукозный иммунитет и системный иммунитет при введении млекопитающим.

Вакцинная композиция с антигеном вируса Зика вводится в любой дозе, которая находится в диапазоне от 0,125 мкг до 100 мкг на дозу с или без адъюванта, либо в виде однократной дозы или двух или более доз для индуцирования иммунного ответа у млекопитающего.

В одном варианте осуществления изобретение предусматривает способ индуцирования защитного иммунного ответа у млекопитающих, включая людей, включающий введение вакцинной композиции по пункту 1 любым способом, который включает внутримышечный, интрадермальный, подкожный, внутривенный, пероральный, интраназальный или транскутанный способы введения.

Композиция по изобретению может вводиться любым способом, включающим иглы и шприцы, включая предварительно заполненные шприцы, микроигольный пластырь, безигольный пластырь, ингаляционные и назальные спреи.

Изобретение также предусматривает способ *in vitro* или *in vivo* применения антител вируса Зика композиции для приготовления иммунодиагностических и иммунотерапевтических агентов для вирусных инфекций Зика.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика и антигены вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем вирусный антиген Зика и инаktivированные антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине при концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адъюванта или с адъювантом.

Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, содержащих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL) e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP) g) N-гликолилдипептида (GMDP) h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей

один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или любой из аналогов и производных их молекул i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда они формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления, адъювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,0 мг на вакцинную дозу.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика и антигены вируса Чикунгунья в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем антигены вируса Зика и Чикунгунья присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адъюванта или с адъювантом.

Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающие гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги, или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или любой из аналогов и производных их молекул i) двух или более комбинаций из любого из указанных выше адъювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления, адъювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,5 мг на вакцинную дозу.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика, вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем вирус Зика, вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине при концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адъюванта или с адъювантом.

Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающие гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги, или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или любой из аналогов и производных их молекул i) двух или более комбинаций из любого из указанных выше адъювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. Предпочтительно, адъювант представляет собой алюминия гидроксид с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,0 мг на вакцинную дозу.

Вакцинная композиция по изобретению необязательно содержит 2-феноксизтанольный консервант в концентрации от 2,5 до 5 мг/мл.

Вакцинная композиция при введении в однократной дозе или двумя или более дозами у млекопитающих вызывает как Th1, так и Th2 иммунный ответ против любого из антигенов арбовируса, содержащий вирус Зика, вирус Чикунгунья и вирус японского энцефалита и являются приемлемыми для введения людям.

В одном варианте осуществления изобретение предусматривает способ получения вакцинной композиции, содержащей один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, где способ включает одну или несколько стадий инактивации, продуцирования рекомбинантного протеина, экспрессирования структурных антигенов, очистки и концентрации вирусного антигена, причем указанные очистка и концентрация вируса Зика включает одну или несколько стадий, выбранных из:

- a. ультрацентрифугирования;
- b. центрифугирования по градиенту плотности;
- c. осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации;
- d. очистки с использованием колоночной хроматографии;
- e. тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 кДа до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инактивации вируса.

Способ колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, любую ионообменную колоночную хроматографию, аффинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, причем колоночный хроматографический способ элюирует большую часть вирусного антигена в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, причем вирусный образец очищен на колонке Capto Core 700 и элюирован в потоке.

Вирус Зика инактивируют одним или несколькими инактивирующими агентами, выбранными из химического инактивирующего агента, физического инактивирующего агента и облучающего агента.

Способ получения включает инактивацию вируса Зика, которая может быть осуществлена до или после очистки вируса, причем вирус Зика может быть инактивирован химическим инактивирующим агентом, выбранным из формалина (формальдегида), бета-пропиолактоном (BPL) и пероксида водорода.

В одном варианте осуществления способ получения включает инактивацию объемного вируса Зика, который инактивирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из:

- a. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1: 500 вплоть до 1: 4000 об./об. формалин : вирус, при от 8⁰С до 37⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;
- b. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1: 4000 об./об. формалин : вирус, при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;
- c. Бета-пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1: 4000 об./об. BPL: вируса, в течение

по меньшей мере от 24 до 48 часов, если не более, при температурах, которые находятся в диапазоне от 8⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение 48 часов;

d. Бета-пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1: 500 вплоть до 1:4000 (BPL: вируса, об./об.), при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере от 3 до 7 дней;

e. Комбинации BPL и формалина при любых из указанных выше условий, предпочтительно BPL инаktivация при 1:3000 (BPL : вируса, об./об.) в течение 24 часов с последующей инаktivацией формалином при 1: 3000 (формалин : вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 часов при от 15⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С;

f. Пероксида водорода при любой концентрации, от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30⁰С в течение от 5 минут до 120 минут.

В варианте осуществления способа получения, вирус инаktivирован гамма-облучением путем экспозиции от 20 кГр (Кило Грей) вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 кГр до 30 кГр от источника ⁶⁰Со.

В другом варианте осуществления способа получения, вирус Зика инаktivирован облучением УФ путем экспозиции на 254 нм в течение 30 - 60 минут.

В другом варианте осуществления способа получения, вирус Зика инаktivирован путем термической обработки от 50 °С до 65 °С в течение от 30 мин. вплоть до 2 часов, предпочтительно, при 65 °С в течение 1 часа.

В одном варианте осуществления способа получения, инаktivацию осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, не ограничивается этим, изо-мальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L -гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций. В одном предпочтительном варианте осуществления стабилизирующий агент выбран из:

- a. 2% сорбита и 1% L-глицина;
- b. 1% сорбита и 0,5 % L-глицина;
- c. 1% маннита и 0,5% L-глицина;
- d. 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; и
- e. 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.

Способы инаktivации, описанные выше в данном документе, применяются к вирусу Зика любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности, Е протеин в любом гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности любого генома вируса Зика.

В одном варианте осуществления изобретение раскрывает способ продуцирования рекомбинантного протеина, включающий стадии:

- a. трансфекции рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
- b. сбор клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;
- c. очистку протеина по меньшей мере одним из способов, включающим ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, аффинную хроматографию,

гидрофобную колоночную хроматографию, хроматографию со смешанным режимом смол, диафильтрацию, ультрацентрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности, фракционирование с солью.

В другом варианте осуществления изобретение раскрывает способ экспрессирования структурных антигенов вируса Зика, включающий систему экспрессирования, представляющую собой любую прокариотическую или эукариотическую систему экспрессирования, включающий экспрессию, опосредованную бакуловирусом, в клетках насекомых.

В другом варианте осуществления изобретение раскрывает способ, причем способ включает нейтрализующие антитела, предпочтительно индуцирующиеся против протеина оболочки, такого как в оптимально инактивированном вирусе, живом ослабленном вирусе, дезактивированном вирусе, ДНК вакцине, вирусоподобных частицах, химерных вирусных частицах, демонстрирующих протеин Е вируса Зика в любом гетерологичном вирусном скелете, таком как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.

Вакцинная композиция по изобретению может вводиться в прайм-буст стратегии, причем первичной является кандидатная инактивированная вакцина, и вторичной является или такая же вакцина или любая другая вакцина, такая как ДНК вакцина, вакцина химерного вируса Зика, вирусоподобные частицы, дезактивированная вакцина Зика, вакцина с живым ослабленным вирусом, рекомбинантная субъединичная вакцина, векторная вакцина или любая вакцина, полученная из синтетического вируса Зика, причем нейтрализующие антитела в каждой из них индуцируются против протеина оболочки вируса Зика.

КОРОТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Фиг. Очищенный вирус Зика масса в 12,5% SDS-PAGE геле, обнаруженный с использованием окрашивания серебром. Протеин оболочки (Е) и мембранные (М) протеины являются основными протеинами, обнаруженными в очищенном антигене.

Фигура 2: Фиг. 2А – Кинетика инактивации вируса Зика формалином в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 1:1000 об./об. формалин : вирус вплоть до 1:4000 об./об. формалин : вирус при $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. Фиг. 2В – кинетика инактивации вируса Зика бета-пропиолактоном в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 1:1000 вплоть до 1:3500 об./об. ВРЛ : вируса при $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. В обоих процедурах инактивации в качестве стабилизаторов добавляли 1% сорбита и 0,5% L-глицина (конечная концентрация), которые не имели экспозиции на кинетику инактивации. Инактивированные образцы серийно амплифицировали три раза *in vitro* в клетках Vero, и анализировали в конце трех пассажей с помощью TCID₅₀.

Фигура 3: Фиг. 3А: ~2,1 т.п.н. гена рgME вируса Зика SEQ ID NO. 1 амплифицировали ген-специфическими праймерами для иницирования клонирования в рFastBac вектор для экспрессии в клетках насекомых. Фиг. 3В: образец Sf9 клеточный лизат исследовали вестерн-детектированием экспрессии протеина рgME с использованием Зика кроличьей поликлональной антисыворотки по стандартным процедурам. Протеин оболочки ~ 55 кДа может быть обнаружен в качестве основной полосы.

Фигура 4: Оценка нейтрализующих титров антител, индуцированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Адъюванты сокращаются следующим

образом: рIC (поли-IC) С-холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил) RP (резиквимонид + поли-IC) RM (резиквимонид + OWEM2) I (инулин) OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2) AI (гидроксид алюминия + инулин) MDP (мурамилдипептид) OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1). Ни одни значимые титры антител не могут быть выявлены в соответствующих контрольных группах и поэтому не показаны на фигуре. Во всех случаях, 10 мкг двух доз вакцинного антигена Зика было сформулировано для введения мышам Balb/c в.м. способом.

Фигура 5: Фиг. 5А: Оценка нейтрализующих титров антител с использованием PRNT₅₀ в исследовании дозой, находящейся в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу адъювантного гидроксида алюминия инаktivированного формалином вакцины вируса Зика, которую вводят в.м. способом мышам Balb/c в двух дозах. Фиг. 5В: вакцинированных животных подвергали контрольному заражению внутривенно 10e5 PFU/вируса Зика штамма на животное через 7 дней после бустерной дозы, и вирусемию контролировали каждые 24 часа в течение 7 дней (изображено на графике в течение 6 дней). Все животные продемонстрировали полную защиту от вирусемии, тогда как животные, которым вводили контрольное плацебо показали вирусемию, которая сохранялась вплоть до 6 дней. Инфекционный вирус оценивали в образцах крови с помощью TCID₅₀.

Фигура 6: Вирусное контрольное заражение мышей Balb/c возрастом 4 - 6 недель после введения от 1 мкг до 40 мкг BPL инаktivированной, алюмокалиевыми квасцами адсорбированной вакцины вируса Зика. Животные из всех групп вакцинной дозы и группы плацебо подвергались контрольному заражению 10e5 PFU вируса Зика штамма MR766 через 7 дней после введения бустерной дозы. Вирусемию контролировали каждые 24 часа после вирусного контрольного заражения, и титры инфекционных частиц в крови оценивали с помощью TCID₅₀. Кандидатная вакцина Зика предоставляла полную защиту от вирусного контрольного заражения во всех группах дозы.

Фигура 7: Пассивная иммунизация, осуществляющая полную защиту против вирусемии и инфекционного вируса, не могла быть обнаруженной с использованием TCID₅₀ у животных, получивших внутрибрюшинно кроличью поликлональную антисыворотку Зика и были контрольно заражены 24 часа спустя 10e5 PFU вируса Зика. Инфекционные вирусные частицы не могли быть выявлены с использованием TCID₅₀ в крови, при контроле каждые 24 часа в течение 6 дней, тогда как контрольные животные, получающие одинаковый объем PBS показали устойчивую вирусемию вплоть до 6 дней, когда были контрольно заражены одинаковой дозой вируса.

Фигура 8: Инаktivированные формалином, адсорбированные на алюмокалиевых квасцах антисыворотки вакцины вируса Зика из вакцинированных мышей, нейтрализованных гомологичным штаммом вируса Зика MR766 (фиг. 8В) и перекрестно нейтрализованных гетерологичным штаммом 13025 FSS азиатского генотипа (фиг. 8А) с одинаковой эффективностью с титрами PRNT₅₀ 18105 и 18325, соответственно. Значения для плацебо (только алюмокалиевые квасцы) также изображены на графике рядом.

Фигура 9: Титры антител, выраженные как log₁₀ обратных разбавлений сыворотки от дозы, которая находится в диапазоне исследований (фиг. 9А) с однократной дозой (фиг. 9В), двумя дозами (фиг. 9С), тремя дозами инаktivированной формалином вакцины, которая вводится мышам Balb/c возрастом 4 - 6 недель, как описано в примере 7. Фиг. 9Д представляет собой титры антител с одной, двумя и тремя дозами 10 мкг вакцинного антигена без алюмокалиевых квасцов. Все значения выражаются как геометрические

средние титры с 95% ДИ. На 9A-9D, нанесены отдельные данные животных. Вирусный антиген Зика был иммуногенным даже без адъюванта. Данные из других диапазонов доз оценивались, но не были включены в график.

Фигура 10: Антитела высокой аффинности могут быть обнаружены с использованием однократной дозы инактивированной формалином адсорбированной на алюмокалиевых квасцах вакцины вируса Зика у мышей Balb/c даже при низких дозах вакцинного антигена вплоть до 1 мкг. Авидность антител выражается как индекс авидности и оценивается способами, описанными в примере 12.

Фигура 11: Оценка Th1 цитокинов (фиг. 11A) IFN гамма и (фиг. 11B) IL-2 у мышей, вакцинированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Во всех случаях она составляла 10 мкг вакцинного антигена на дозу. Адъюванты сокращаются следующим образом: rIC (поли-IC); С- холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил); RP (резиквимонид + поли-IC); RM (резиквимонид + OWEM2); I (инулин); OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2); AI (гидроксид алюминия + инулин); MDP (мумарилдипептид); OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1); как описано в примере 5. Адъювант на основе масла и поли-IC индуцировали сильный Th1 ответ по сравнению с другими испытанными адъювантами.

Фигура 12: Оценка Th2 цитокинов (Фиг. 12A) IL-4, и (Фиг. 12B) IL-10, у мышей, вакцинированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Во всех случаях она составляла 10 мкг вакцинного антигена на дозу. Адъюванты сокращаются следующим образом: rIC (поли-IC); С- холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил); RP (резиквимонид + поли-IC); RM (резиквимонид + OWEM2); I (инулин); OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2); AI (алюминия гидроксид + инулин); MDP (мумарилдипептид); OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1), как описано в примере 5. Адъюванты на основе масла и поли-IC индуцировали сильный Th2 ответ в дополнение к Th1 ответу.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное раскрытие касается формулирования иммуногенных композиций. Изобретение раскрывает, в частности, получение и формулирование вакцинных антигенов вируса Зика в моновалентных композициях и в комбинациях с другими арбовирусами, такими как вирусы Чикунгунья и/или японского энцефалита. В частности, изобретение раскрывает композиции для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика.

Один из аспектов изобретения заключается в том, что способы получения, формулирования и применения антигенов Зика, в качестве вакцины для индуцирования иммунного ответа, применяют к любому генотипу, генотипным вариантам или любому штамму вируса Зика причем один генотип вируса Зика эффективно перекрестно нейтрализует гетерологичный штамм. Вирус Зика может быть выбран из азиатского, западноафриканского или восточноафриканского генотипа вируса. Поэтому способы, описанные в представленном изобретении в данном документе применяются к вирусу Зика любого генотипа/штамма, живому ослабленному вирусу Зика, дезактивированному вирусу, вирусоподобным частицам, химерным вирусным частицам, несущим любые антигены вируса Зика, в частности, Е протеин и М протеин в любом гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности любого генома вируса Зика. Химерный вирус имеет нуклеиновую кислоту гетерологичного вируса и нуклеиновую кислоту вируса Зика.

В контексте иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, в частности, основной антиген, используемый для получения иммуногенных композиций, способы получения, формулирования и применения вакцинных антигенов Зика применяются к любому из указанных выше типов вируса Зика, которые имеют по меньшей мере от 50% аминокислотной идентичности и вплоть до 100% аминокислотной идентичности в любом участке генома. В контексте иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, последовательность штамма MR766 вируса Зика африканского генотипа (SEQ ID NO. 5 для геномной нуклеотидной последовательности и SEQ ID NO. 6 для полного ORF) имеет более чем 96,5% аминокислотную идентичность по структурному протеину оболочки со штаммом FSS13025 азиатского генотипа, и чья последовательность раскрыта в SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 8 для нуклеотидных и протеиновых последовательностей соответственно. Вакцина антисыворотки штамма MR766 перекрестно нейтрализовала штамм FSS13025 со 100% эквивалентной эффективностью, как гомотипный штамм MR766. Кроме того, в контексте раскрытия в данном документе, антисыворотка вируса Зика prME (SEQ ID NO. 3) эффективно перекрестно нейтрализовала штамм MR766, что подтверждает, что все вирусы Зика являются серотипно подобными. В контексте раскрытия в данном документе, способы получения вакцины, разработанные с использованием какого-либо одного штамма вируса Зика применимы к гомологичным и любым гетерологичным штаммам вируса Зика для использования в качестве кандидатной вакцины.

Клеточная линия, которая может быть распространена *in vitro* в культуре, может использоваться в качестве хозяина для вирусной культуры Зика. Для распространения штаммов вируса Зика, предпочтительно выбранными могут быть перmissive клетки, позволяющие вирусу хорошо расти. Например, могут использоваться диплоидные клеточные линии, такие как MRC-5 и WI-38, и серийно пассированные клеточные линии, такие как Vero, BHK-21, CHO клетки и т.п. Например клетки Vero (ATCC No. CCL-81), BHK-21 (ATCC No. CCL-10), C6/36 (ATCC No. CRL-1660) и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления, одна такая клеточная линия, используемая в представленном изобретении, представляет собой клетки Vero (ATCC No. CCL-81), которые были валидированы для применения в качестве клетки-хозяина для получения вакцины. Валидированные клеточные линии Vero соответствуют требованиям для биологических веществ No. 50 относительно требований по использованию клеток для производства биологических препаратов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), тем самым подтверждая, что данные клеточные линии являются надлежащего качества для получения вакцины (WHO Technical report Series, No. 878, pp 19-52, 1998).

В одном аспекте изобретения, способ адаптации вируса Зика к клеткам Vero увеличивает титр вируса. Повторно пересеянный вирус Зика в клетках Vero увеличивает титр вируса. В контексте роста вируса в клетках Vero, раскрытых в данном документе, вирус Зика первоначально пассировали в мышинный мозг или клетки *Ae.albopictus* C6/36 (ATCC No. CRL-160) и затем адаптировали к клеткам Vero, что увеличивает титры вируса, приемлемые для получения вакцины.

Для поддержания клеточной культуры указанных выше клеточных линий, адаптированными могут быть клетки Vero, в частности, стационарная культура в монослоях, культура перфузионной системы, колбы для встряхивания, культура роллера для пробирок/флакона, суспензионная культура с и без микроносителей, клеточные фабрики и клеточные стеки, биореакторы и одноразовые биореакторы, волновые биореакторы и подобные. Например, различные типы микроносителей коммерчески

доступны. Коммерчески доступные устройства для животной клеточной культуры могут использоваться для облегчения роста клеток до высокой плотности клеток.

В одном аспекте изобретения и как раскрыто в данном документе, вирус Зика является очищенным для применения в качестве кандидатной вакцины. Очистка достигается комбинацией как физических, так и химических способов или перед или после инактивации вируса. Физические способы включают любую из следующих техник, но не ограничивается этим: ультрацентрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности, ультрафильтрацию, диафильтрацию и концентрацию с использованием полупроницаемых мембран с приемлемыми размерами молекулярного отсека. Очистка химическими средствами использует способы, такие как адсорбция/десорбция за счет химических или физико-химических реакций, таких как ионообменная хроматография, аффинная хроматография, хроматография с гидрофобными взаимодействиями, гель-фильтрационная хроматография, такая как например Capto core 700™, гидроксипатитная матрица, сольватация с неорганическими солями, одним из таких примеров является сульфат аммония.

В предпочтительном варианте осуществления, вирус очищают с использованием колоночной хроматографии на Capto core 700 (GE Healthcare Life Sciences). Инактивация вируса достигается или перед очисткой, или после очистки на колонке Capto core 700. Собранные вирусные клетки перед колонкой Capto core 700 могут быть осветленными с использованием мембранных фильтров с различными размерами пор, преимущественно не менее 0,45 мкм для связывания на мембране низших протеинов. В предпочтительном варианте осуществления, собранные вирусные клетки могут быть осветленными с использованием двойных мембран с двумя различными размерами пор, например 1,2 мкм с последующей 0,45 мкм, или 0,8 мкм с последующей 0,45 мкм. Осветленные собранные вирусные клетки являются приемлемыми для очистки на колонке Capto Core 700. Буферы, используемые для очистки на Capto core 700, имеют оптимальный уровень pH и ионную силу, для максимизации связывания примесей на колонке и элюирования вируса в потоке. Вирусный образец дополнительно концентрируют с использованием диафильтрации перед или после инактивации вируса. Диафильтрационный образец вируса после инактивации удаляет вирус инактивирующего агента из основного антигена, и является приемлемым для формулирования.

В одном варианте осуществления изобретения вирус Зика является инаktivированным (убит) для применения в качестве вакцинного антигена. Инаktivацию могут осуществлять или перед, или после очистки вируса. В предпочтительном варианте осуществления, инаktivацию вируса Зика осуществляют после очистки вируса.

Вирус Зика может быть инаktivирован или с использованием нагревания, гамма-облучения, ультрафиолетового света или химических средств. В предпочтительном варианте осуществления, раскрытый в данном документе, вирус Зика химически инаktivирован. Химические инаktivированные агенты были выбраны из следующего перечня, который включает, но не ограничивается этим: формалин, бета-пропиолактон, глутаральдегид, N-ацетилэтиленмин, бинарный этиленмин, третичный этиленмин, аскорбиновую кислоту, каприловую кислоту, псоларены, детергенты, включающие неионные детергенты, и тому подобное, причем химический инаktivировующий агент добавляется в вирусную суспензию для инаktivации вируса.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, химический инаktivировующий агент выбирают из формалина и/или бета-пропиолактона (BPL). Формалин используют в любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:1000 до 1:4000 об./об. формалин

: вирус. Бета-пропиолактона используют в любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:1000 до 1:4000 об./об. BPL : вирус. Температура и продолжительность инактивации оптимизированы для полной инактивации вируса с минимальным вредным воздействием на иммуногенность. Это может быть достигнуто при более короткой продолжительности экспозиции минимальным количеством инактивирующего агента. В контексте инактивации вируса, раскрытие в данном документе описывает концентрацию, температуру и время экспозиции на вирус Зика формалином и BPL. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, температура инактивации составляет $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, наиболее предпочтительно - 22°C в течение 7 дней. При более низких температурах от 2°C до 8°C , продолжительность экспозиции формалина дольше, чем 7 дней, для достижения полной инактивации вируса при указанных выше диапазонах концентрации. Продолжительность экспозиции на вирус формалином может быть уменьшена до менее 48 часов за счет повышения температуры экспозиции вплоть до 37°C . Следовательно, эффективная инактивация формалином вируса Зика может быть достигнута при любой концентрации, в диапазоне формалина от 1:1000 об./об. формалин : вирус вплоть до 1:4000 об./об. формалин : вирус за счет выбора любой температуры в диапазоне от 2°C до 37°C и варьируя время экспозиции от 24 часов до более, чем 10 дней при любой из указанных выше концентраций, времени и температуры экспозиции.

В одном варианте осуществления раскрытия, BPL используют в качестве вирусного инактивирующего агента для вируса Зика. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, BPL используют в концентрациях, которая находится в диапазоне от 1:1000 об./об. BPL : вирус вплоть до 1: 4000 об./об. BPL: вирус. При более низких температурах от 2 до 8°C , продолжительность экспозиции BPL составляет преимущественно от 3 до 7 дней для достижения полной инактивации вируса при указанных выше диапазонах концентраций. Продолжительность экспозиции вируса BPL может быть уменьшена до 48 часов или менее путем повышения температуры экспозиции вплоть до $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ или даже вплоть до 37°C . Следовательно, эффективная инактивация BPL вируса Зика может достигаться за счет какой-либо концентрации в диапазоне BPL от 1:1000 об./об. BPL : вирус до 1:4000 об./об. BPL : вирус за счет выбора любой температуры в диапазоне от 2 до 37°C и варьируя временем экспозиции от 24 часов до более чем 10 дней при каких-либо указанных выше концентрациях, времени и температуры экспозиции.

Один из вариантов осуществления представленного изобретения, раскрытого в данном документе представляет собой применение комбинации BPL и формалина при каких-либо из указанных выше условий, предпочтительно BPL инактивация при 1:3000 об./об. BPL : вирус в течение 24 часов с последующей инактивацией формалином при 1: 3000 об./об. формалин : вирус в течение от 24 до 48 часов при от 15°C до 30°C , предпочтительно $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Применение комбинации BPL и формалина для инактивации вируса Зика заключается в том, что механизм инактивации разный для формалина и BPL, их комбинированное применение снижает их общую концентрацию и экспозицию как инактивирующими агентами, так и применение низких концентраций формалина, способствует стабильности основного вируса, способствуя перекрестному связыванию вирусных эпитопов. В другом варианте осуществления изобретения, пероксид водорода используют для инактивации вируса Зика в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20°C до 30°C в течение от 5 до 120 минут, если не более.

Вариант осуществления представленного изобретения раскрывает применение антигена rgME вируса Зика в качестве антигена кандидатной вакцины для индуцирования иммунного ответа против вируса Зика. Раскрытие применимо к любому способу разработки вакцины, причем rgME или E протеин экспрессируется таким образом, что

нейтрализующие антитела Зика направлены против указанных антигенов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, rgME протеин экспрессируется как рекомбинантные вирусоподобные частицы (VLP) в экспрессии, опосредованной бакуловирусом в клетках насекомых. Каждый квалифицированный специалист в данной области будет получать дополнительные варианты осуществления с использованием описанного выше раскрытия, для разработки кандидатной вакцины с использованием протеина rgME в качестве мишени антигена Зика, такого как ДНК вакцина, вирусоподобные частицы, содержащие протеины rgME, субединичная вакцина, содержащая антиген оболочки (Е), живые векторные вакцины, химерные вакцины с использованием rgME Зика на гетерологичном скелете нуклеиновой кислоты, причем все указанные выше анти-Зика антитела направлены против Е протеина.

В представленном изобретении, раскрытом в данном документе, представлены иммуногенные композиции, содержащие очищенные рекомбинантные антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (Е), мембранный (М) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика. В предпочтительном варианте осуществления, применение вируса Зика, имеющего ген rgME последовательности SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2, кодирующего структурный протеин SEQ. ID NO. 3 и SEQ. ID NO. 4 соответственно, причем экспрессированный и очищенный протеин rgME может использоваться в качестве вакцинного антигена для профилактики вирусных инфекций Зика.

В предпочтительном варианте осуществления, ген rgME вируса Зика используют для генерирования рекомбинантного генного конструкта, который может использоваться для экспрессирования протеина rgME в прокариотической или эукариотической системах экспрессирования в качестве вирусоподобных частиц (VLPs), предпочтительно экспрессия, опосредованная бакуловирусом в клетках насекомых. Способы, раскрытые в данном документе применимы к любому штамму вируса Зика, имеющему по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность к указанным выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4

Вариант осуществления представленного раскрытия представляет собой выбор фармацевтически приемлемого буфера в течение биопроцесса, причем буферный агент выбирают из перечня, состоящего из какого-либо одного или нескольких из последующих, но не ограничивается этим: фосфатный буфер; цитратный буфер; фосфатно-цитратный буфер; боратный буфер; буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris); сукцинатный буфер; буферы, содержащие глицин или гистидин в качестве одного из буферных агентов. В наиболее предпочтительном варианте осуществления используют фосфатный буфер, причем фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер в концентрации от 5 mM вплоть до 200 mM фосфатных ионов, предпочтительно от 10 mM до 100 mM фосфатный буфер, наиболее предпочтительно от 10 mM до 50 mM фосфатный буфер любого pH выше 6,50 до pH 9, предпочтительно от pH 6,8 до pH 7,8 используют для процессов в обратном направлении и в прямом направлении. В предпочтительном варианте осуществления, 10 mM натрий-фосфатный буфер pH $7,4 \pm 0,2$ используют в получении очищенной инактивированной вакцины основного вирусного антигена Зика, и, необязательно содержащие натрия хлорид в концентрации от 50 до 200 mM. В другом предпочтительном варианте осуществления, сорбит и L-глицин необязательно добавляют до конечной концентрации 1% и 0,5%, соответственно.

Вариант осуществления представленного изобретения также раскрывает выбор адъювантов, совместимых для формулирования с вирусным антигеном Зика.

Антигенные композиции вируса Зика как моновалентная вакцина, и с вирусом Чикунгунья и вирусами японского энцефалита в комбинированной вакцине были сформулированы в фармацевтически приемлемом носителе для иммунизации. Применение адъюванта(ов) может снизить количество антигена, необходимого для формуляции. Кроме того, для адъювантной вакцинной композиции, приемлемый(е) адъювант(ы) были выбраны из следующего перечня, включающего, но не ограничивающегося этим: алюмокалиевые квасцы, такие как гидроксид алюминия, алюминия фосфат, или аморфный алюминия сульфатфосфат; фосфат кальция; инулин какой-либо полиморфной формы, предпочтительно гамма инулин; адъюванты, содержащие инулин в комбинации с другими органическими и неорганическими соединениями, такие как алюминия гидроксид, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат и фосфат кальция; липосомы, хитозан и сложные углеводы, такие как декстран, декстрины, крахмал, маннаны и глюкоманнаны, галактоманнаны, бета-глюканы, гепарин, целлюлоза, гемицеллюлоза, пектины и пектиниты, лектины и какие-либо другие углеводы или синтетические, или полученные из любого источника, какие-либо способные к биологическому разложению и биосовместимые полимеры, такие как полилактид и полилактид согликолиды, (PLG или PLGA); какие-либо эмульсии, включающие, но не ограничиваются этим, эмульсии масло-в-воде, причем одним таким примером является сквален или аналоги сквалена, содержащие масло в воде адъюванты, эмульсии масло-в-воде, содержащие растительные масла; любые эмульсии вода-в-масле; липосомы, полученные из холекальциферола в качестве одного из ингредиентов вместе с другими липидными растворимыми соединениями; липосомы других композиций; RIBI адъювантные системы, сапонины, включающие, но не ограничиваются этим, QS-21, QuilA, томатин, ISCOM, ISCOMATRIX, и тому подобное, липопептиды, гликопептиды и их аналоги, резиквимойды, липополисахариды, липид А, мурамилдипептиды или их аналоги и любые адъюванты на основе пептида, олигонуклеотиды, любые TLR лиганды и их аналоги в качестве адъювантов, любой цитокин, витамины и нетоксичные бактериальные токсины, практически любые аналоги всех указанных выше адъювантов и комбинация из двух или более из указанных выше адъювантов или их аналогов, которые совместимы в вакцинной композиции(ях) и исследованы относительно повышенной иммуногенности. В дополнение к указанному выше, какие-либо другие органические и неорганические вещества, обладающие хорошей иммунопотенциальной активностью являются приемлемыми для применения в качестве адъюванта либо самостоятельно, либо в адъювантных комбинациях для повышения иммуногенности арбовирусных антигенов. Применение адъюванта в вакцинных композициях может уменьшить необходимое количество антигена.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, гидроксид алюминия использовали для исследования диапазона дозирования как формалина, так и BPL, инактивированных антигенов Зика, а также в вакцинных комбинациях вакцин Зика, СНИКV и JEV через их профиль безопасности для применения в целевой популяции. Эмульсии на основе масла и поли-ИС давали хороший иммунопотенциальный эффект относительно антигена Зика, при использовании в качестве адъювантов. В одном варианте осуществления изобретения, поли-ИС и другие адъюванты осуществляющие системный мукозный иммунитет, особенно предпочтительны для защиты против заболевания, вызванного вирусной инфекцией Зика. Поли-ИС и эмульсии на масляной основе и адъювантные комбинации, раскрытые в изобретении индуцировали как Th1, так и Th2 ответы, оцененные путем измерения цитокинов Th1 и Th2 после вакцинации.

В одном варианте осуществления представленного изобретения, вакцинный консервант используют в вакцинных композициях. Предпочтительный вариант осуществления представляет собою 2-феноксиэтанол в концентрации от 2,5 до 5 мг на дозу.

В одном аспекте представленного изобретения, раскрытого в данном документе, применяются стабилизирующие агенты, выбранные из одного или нескольких из следующих, но не ограничивается этим: лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, изо-мальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, альбумина сыворотки человека и их комбинаций, в какой-либо приемлемой концентрации, которая используется для обеспечения стабильности во время инактивации вируса Зика каким-либо из указанных выше способов. В предпочтительном варианте осуществления, стабилизирующие агенты выбраны из любой из следующих комбинаций, но не ограничивается этим: 2% сорбита и 1% L-глицина; 1% сорбита и 0,5 % L-глицина; 1% маннита и 0,5% L-глицина; 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; 1% сорбита, 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека. В предпочтительном варианте осуществления, комбинация из 1% сорбита и 0,5% L-глицина и 1% маннита и 0,5% L-глицина представляют собой предпочтительные комбинации, наиболее предпочтительно, 1% сорбита и 0,5% L-глицина. Квалифицированный специалист в данной области будет принимать во внимание дополнительные варианты осуществления, основанные на указанных выше раскрытиях.

Лиофилизированные композиции являются одним из способов получения вакцинного продукта. Лиофилизированные препараты вакцины против вируса Зика, как правило, содержат очищенный инактивированный вирус Зика, сахарные полиолы, предпочтительно сорбит и маннит, наиболее предпочтительно сорбит в комбинации со стеклообразующим сахаром, который преимущественно представляет собой дисахариды или олигосахариды. Предпочтительные дисахариды выбраны из следующего перечня, но не ограничивается этим: сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, лактозы, рафинозы, изомальтозы, стахиозы, и тому подобное. Предпочтительный вариант осуществления раскрытия представляет собой комбинацию из 1% сорбита с 5% сахарозы, 1% маннита и 5% сахарозы, и 3% сахарозы и 2% трегалозы, 1% маннита с 1% L-глицина и или 2% трегалозы. Любой обычный специалист в данной области разработает дополнительные варианты осуществления, основываясь на раскрытиях, указанных выше.

Лиофилизированные композиции могут быть повторно суспендированы в воде для инъекций или в водном буфере, фармацевтически приемлемом для введения, например, в качестве инъекционной жидкости для субъекта человека. Лиофилизированная композиция также может использоваться в качестве ингаляционного порошка, который будет приемлемым для индуцирования мукозного иммунитета. Кроме того, лиофилизированная композиция вируса Зика может содержать адъювант, обеспечивающий мукозный иммунитет предпочтительно из перечня тех адъювантов, которые были исследованы в представленном изобретении для вируса Зика, такого как, например, поли-IC.

В представленном изобретении, раскрытие, представленное в данном документе, относительно оптимального использования вирусного антигена Зика для индуцирования сильного иммунного ответа, вакцинный антиген может использоваться в количестве от 0,10 мкг вплоть до 100 мкг на дозу, причем предпочтительный вариант осуществления представляет собой любую концентрацию от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу, таким образом, что введенные вакцинные дозы индуцируют титры антител, которые можно измерить с помощью анализов, таких как ELISA и PRNT50. Вакцина может вводиться с и

без адъюванта, поскольку как инактивированная вакцина, так и адъювантные композиции индуцируют хороший иммунный ответ.

В еще одном раскрытии изобретения, инактивированная кандидатная вакцина Зика, инактивирована по какому-либо из раскрытых способов, может вводиться в качестве однократной дозы или двумя или более дозами для индуцирования иммунного ответа. Способы, раскрытые в изобретении обеспечивают кинетику иммунного ответа после каждой дозы вакцины, в дозах в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу, что обеспечивает гибкость в выборе дозы вакцины в диапазоне концентраций и количестве доз для соответствия целевой популяции для вакцинации.

Путь введения вакцины может быть каким-либо путем, выбранным из, но не ограничивается этим, внутримышечного, интрадермального, подкожного, внутривенного, перорального, интраназального и транскутанного способов введения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, предпочтительным путем введения вакцины является внутримышечный (в.м.) путь.

Вакцинные композиции могут быть представлены в стеклянных флаконах и вводиться с помощью иглы и шприцев, представленные в заранее заполненных шприцах в виде готовой к использованию презентации или введенных путем электропорации, микроигольных пластырей безигольного пластыря, в виде ингаляционного или назального спреев.

Представленное изобретение раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из перечня, включающий вирус Зика, вирус Чикунгунья (CHIKV), и вирус японского энцефалита (JEV). При применении в вакцинной комбинации, вакцина может индуцировать иммунный ответ против каждого из вирусов, присутствующего в комбинированной вакцине. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, включающем вакцинную композицию, причем антигены вируса Зика и антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,5 мг на вакцинную дозу являются раскрытыми. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, раскрыта вакцинная композиция, содержащая антигены вируса Чикунгунья и Зика в композиции, содержащей от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,5 мг на вакцинную дозу.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, раскрыта вакцинная композиция, содержащая антигены вируса Чикунгунья, Зика и JEV в композиции, содержащей от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,5 мг на вакцинную дозу. Применение вакцинной комбинации обеспечивает исключительное экономическое преимущество для производства и распределения вакцин, при условии, что иммунный ответ индуцируется против каждого из антигенов в композиции и никакой антигенной

интерференции не наблюдается ни к одному из антигенов при наличии дополнительного антигена. Вакцинные антигены могут вводиться из одной композиции, или вводиться отдельно в одно и то же время или в приемлемые временные интервалы, таким образом, чтобы индуцировать иммунный ответ на общий антиген.

Представленное изобретение также раскрывает применение антител к вирусу Зика для выявления вируса Зика с помощью ELISA или какими-либо иммунодиагностическими способами, где антитела находят применение для выявления или диагностики вирусных инфекций Зика.

Представленное изобретение также раскрывает в данном документе применение антител к вирусу Зика для профилактики и лечения вирусного заболевания Зика.

Сокращения, используемые в изобретении: в.м. - внутримышечный; мкг - микрограмм; TCID₅₀ - 50% инфекционная доза культуры ткани; PFU – Бляшкообразующая единица.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Вирусная культура Зика в клетках Vero

Клеточная линия Vero (ATCC No. CCL-81) использовалась в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика. Широко охарактеризованные клетки Vero, полученные от BioReliance, USA, использовались в полупромышленных масштабах производства. Клетки Vero выращивали в DMEM (Среда Игла модифицированная способом Дульбекко; Sigma-Aldrich Catalog # D5523, и использовали в соответствии с инструкциями производителя) или EMEM (Минимальная питательная среда Игла), содержащие 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) или сыворотки новорожденного теленка (NBCS) и инкубировали при 35⁰C - 37⁰C до достижения 80 – 100 % слияния монослоя. После инфицирования, использовали такую же среду, содержащую 1% сыворотку, или альтернативно вирус культивировали в клетках Vero, адаптированных к свободной от сыворотки среде. Вирус Зика также может быть выращен в монослое клеток MRC-5, который получали в среде для роста, состоящей из EMEM, от буферного до нейтрального pH буфером Hepes с 5% сывороткой и статически инкубировали при от 35⁰C до 37⁰C в течение от 6 до 8 дней. Вирус Зика культивировали обычным образом в клетках Vero. Вирус Зика штамма MR766 (ATCC VR-84) был адаптирован к клеткам Vero с помощью непосредственной инокуляции в клетках Vero. Альтернативно, вирус был адаптирован в клетках C6/36 *Ae. albopictus* дважды за счет серийного пассажирования, и вирус Зика в супернатанте культуры по данным клеток использовался для инфицирования клеток Vero. Серийный пассаж вируса Зика в клетках C6/36 культивировали при от 25⁰C до 28⁰C, что увеличивало титр вируса выше, чем 10e8,0 TCID₅₀/мл или 10e8,0 PFU/мл. Это также исключает необходимость следующих повторных пассажей в клетках Vero для получения высоких титров. Адаптация вируса данным способом полезна для достижения высоких титров и последующего более высокого выхода в производстве. После культивирования в C6/36 клетках, вирус был серийно дважды бляшко очищен от клеток Vero, и вирус из одной лунки, выделенной бляшки амплифицировали и широко характеризовали, в отношении отсутствия занесенного агента (все известные РНК и ДНК вирусы, бактерии, грибы, микоплазмы и тому подобное) с использованием NGS (Next Generation Sequencing) платформы. Вирусная геномная РНК была секвенирована с использованием NGS платформы, и полная нуклеотидная последовательность штамма MR766 представлена в SEQ ID NO. 5 и соответствующая расшифрованная аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 6. Секвенирование показало сайт интактного гликозилирования в протеиновой оболочке, который в

противном случае теряется, если клетки экстенсивно пассированы в клетках млекопитающих. Вирус Зика продуцирует цитопатический эффект (CPE) в клетках Vero, и при оптимальной кратности инфекции (MoI), и условиях сбора клеток, могут быть достигнуты титры вирусов выше $10^8,5$ TCID₅₀/мл или $10^8,5$ PFU/мл.

Пример 2: Очистка вируса Зика

Для вирусной культуры Зика в полупромышленном масштабе, вирусная культура была систематически масштабирована из колб T-175 в CS1 (клеточный стек 1), CS10 (клеточный стек 10) и CS40 (клеточный стек 40). Количество CS40 одновременно инфицированных вирусом в стандартизированном MoI, использовали для масштабирования производства. Использование коэффициентов CS40 позволяет быстро и линейно масштабировать вплоть до желаемых объемов производства. Объем сбора клеток от каждого CS40 составлял приблизительно 8-10 л. Вирус собирали через 4-6 дней или когда было достигнуто более, чем 90% CPE. Альтернативно, одноразовые биореакторы в хорошо стандартизированных условиях температуры от 35 °C до 37 °C, pH не менее, чем 7,0, и оптимально при pH 7,4, при растворенном кислороде в количестве от 45 до 75 м.ч., предпочтительно 60 об./мин. и перемешивании от 240 до 280 об./мин. и оптимально контролируемой скорости входящего потока и исходящего потока, оптимизированной в соответствии со шкалой объема культуры от 1 л до 100 л использовались для увеличения плотности клеток и сбора вируса. Собранные вирусные клетки осветляли или применяя микрофльтрацию или с использованием двойных фильтров с отсечением 1,2 мкм и 0,45 мкм. Осветленные собраны вирусные клетки затем пропускали через колонку Capto Core700 (GE healthcare Life Sciences) в фосфатном буферном солевом растворе, pH 7,4. Фракции, содержащие вирус Зика в потоке необязательно концентрировали, применяя диафльтрацию с использованием или 100 кДа, или 300 кДа отсечения мембран. Концентрированную вирусную фракцию использовали для инактивации вируса. Альтернативным способом, осветленные собранные вирусные клетки были инактивированы или BPL или формалином согласно способам, описанных в следующих разделах, и затем загружали в колонку. Чистоту вируса проверяли на 12,5% SDS-PAGE. Отсутствие существенной разницы в выходе или в чистоте при инактивации вируса до и после очистки. Вирус также может быть очищен с использованием целюфинсульфата, DEAE-Сефадекс CM-сефадекс с градиентом соли и с использованием гель-фльтрации на сефарозе CL-4B, керамической гидроксипатитной колонки с градиентом от 0,2 М до 0,8 М фосфата и во всех случаях с последующей диафльтрацией с использованием мембран с отсечением 100 или 300 кДа. Чистоту препарата вируса проверяли с помощью окрашивания серебром образца вируса в 12,5% SDS-PAGE геле (смотрите фигуру 1). Вирус Зика с использованием указанных выше способов может быть очищен до высокой чистоты, приемлемой для использования в качестве вакцинного основного антигена. Вирус также может быть очищен путем ультрацентрифугирования на 20-60% градиенте сахарозы с использованием ротора P28S Hitachi NIMACultracentrifuge после центрифугирования при 100 000 x g в течение от 6 до 8 часов.

Пример 3: Инактивация вируса Зика

Образец вируса Зика был инактивирован (убит) различными способами для применения в качестве вакцинных антигенов. Инактивацию формалином исследовали при различных концентрациях, находящихся в диапазоне от 1:1000 (формалин : вирус, об./об.) до 1: 4000 (формалин : вирус, об./об.) при температуре 25 ± 5 °C, более конкретно при 22 °C и кинетику инактивации вируса контролировали каждые 24 часа в течение вплоть до 10 дней, и обычным образом инактивацию вируса осуществляли при 25 ± 3 °C, предпочтительно при 22 °C в течение 7 дней. Инактивация вируса была эффективной при всех концентрациях от 1:1000 об./об. формалин : вирус, вплоть до 1:3500 об./об. формалин : вирус, при указанных выше температурах и временных интервалах. Соотношение 1:4000

об./об. формалин : вирус было эффективным при инаktivации вируса при более высоких температурах вплоть до от 30 до 37⁰С в течение от 3 до 7 дней. Инаktivация формалином была эффективной при всех указанных выше соотношениях формалина к вирусу при температурах, находящихся в диапазоне от 2 до 8 ⁰С, при инкубировании в течение временных интервалов длиннее чем 10 дней. Следовательно, инаktivация формалином обеспечивает гибкость инаktivации вируса при любой температуре от 2 ⁰С до 37 ⁰С, в временных интервалах, находящихся в диапазоне от 24 часов до более, чем 10 дней в зависимости от условий, используемых для инаktivации. Инаktivация вируса Зика бета-пропиолактоном (BPL) исследовалась в различных условиях. Вирус Зика был полностью инаktivирован при концентрациях BPL, находящихся в диапазоне от 1:1000 (BPL : вирус, об./об.) вплоть до 1: 3500 (BPL : вирус, об./об.) при температуре 25±5 ⁰С в течение от 24 до 48 часов. При более высокой концентрации BPL или при более высоких температурах вплоть до 37 ⁰С, полная инаktivация достигалась через 24 часа или меньше, и может использоваться в качестве способа для быстрой инаktivации вируса. Вирус Зика мог также быть инаktivирован при указанных выше концентрациях BPL, при инкубировании при от 2 до 8 ⁰С в течение от 3 до 7 дней. Инаktivация комбинацией BPL при 1:3500 (BPL : вирус, об./об.) при 22-25 ⁰С в течение 48 часов, с последующей обработкой с низкими концентрациями формалина от 1:3000 до 1: 4000 об./об. формалин : вирус в течение 24 часов была эффективной как при инаktivации, так и стабилизации вируса. Любая концентрация BPL и формалина могла бы использоваться как для инаktivации, так и стабилизации вируса, при условии, что инаktivация является полной без негативного влияния на иммуногенность. Инаktivацию исследовали от 0,005% вплоть до 3% конечной концентрации пероксида водорода при от 20 ⁰С до 25⁰С в течение периода времени 2 часа. Не существовало никакого негативного влияния на иммуногенность вируса при более низких концентрациях пероксида водорода с очень коротким временем экспозиции в пределах минут, но негативное влияние существовало при длительной концентрации при более высоких дозах исследуемых диапазонов. Инаktivированные вирусные образцы после экспозиции в течение разного времени, и концентрации дозы титровали в отношении инфекционных вирусных частиц, если такие были, по TCID₅₀/мл от 5 минут вплоть до 6 часов с интервалами 5, 10, 20, 30 и 60 минут и при 2, 4 и 6 часов. При более высоких концентрациях, вирус был инаktivирован в пределах секунд. В каждый момент времени реакция была остановлена путем добавления 10 ед./мл каталазы, которая быстро гидролизует пероксид водорода. Оптимальная концентрация для инаktivации составляла 0,01% конечной в течение продолжительности 60 минут или меньше, чем определялось титрованием для инфекционных частиц с использованием TCID₅₀/мл и последующей иммуногенности. Инаktivация вируса Зика пероксидом водорода обеспечивает гибкость продолжительности экспозиции в различных концентрациях в течение разных временных точек в соответствии с концентрацией вирусных частиц в образце.

Образец очищенного вируса Зика был инаktivирован нагреванием при температурах от 50⁰С до 65⁰С в течение вплоть до 60 мин. Инаktivацию вируса УФ осуществляли экспозицией УФ при 254 нм в течение вплоть до 120 минут.

Вирус Зика был инаktivирован гамма-облучением путем экспозиции от 20 кГр (Кило Грей) вплоть до 35 кГр из ⁶⁰Со источника в Gamma Agro Medical Processing Facility в Hyderabad. Все указанные выше способы инаktivации осуществляли в присутствии и при отсутствии стабилизирующих вирус агентов, таких как различные концентрации сахаров, таких как сахароза, лактоза, трегалоза, мальтоза, манноза среди прочего. Сахарные спирты, используемые для обеспечения стабилизирующего эффекта, представляли собой сорбит и маннит. Исследуемые аминокислоты были выбраны из L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-глицина и L-аспарагиновой кислоты и L-глутамина и также

альбумина сыворотки человека и комбинации с одним или несколькими из указанных выше стабилизирующих агентов. Наиболее эффективные стабилизирующие агенты представляли собой сорбит при от 0,5% до 2%, предпочтительно 1,0% в комбинации с L-глицином от 0,5% до 2%, предпочтительно при 0,5%. Маннит и L-глицин в комбинации были эффективными относительно стабилизирующего вирусного образца во время инактивации в отличие от маннита и L-глицина самостоятельно.

Образцы вируса Зика, инаktivированные всеми указанными выше способами для применения вакцинных антигенов, исследовали в отношении завершенности инаktivации путем серийного пассирования инаktivированных образцов три раза серийно в клетках Vero и исследование относительно инфекционного вируса в конце периода инаktivации с помощью TCID₅₀. Кроме того, образец инаktivированного вируса после трех серийных пассажей *in vitro* вводили инъекционно внутривенно мышам в возрасте 2 дня и наблюдали за смертностью или аномалиями роста в течение 21 дня и считались полностью инаktivированными, в случае когда они не показывали никаких неблагоприятных эффектов в исследовании *in vitro* и *in vivo*. Никакая инфекционность не наблюдалась с инаktivированными формалином и бета-пропиолактоном вирионами при указанных выше в диапазоне концентраций и в течение различных исследуемых периодов времени. Кинетика инаktivации вируса Зика формалином и BPL как репрезентативный пример одного из способов, раскрытых выше, представлена на фигуре 2 (Фиг. 2А и Фиг. 2В).

Пример 4: Рекомбинантное клонирование и экспрессия протеина pRME вируса Зика

Синтетический ген нуклеотидной последовательности SEQ ID NO. 1 кодирующей открытую рамку считывания (ORF) pRME протеина SEQ ID NO. 3 вируса Зика, был синтезирован в GenScript, NJ, USA. Ген ПЦР амплифицировали с использованием праймеров, перечисленных ниже для получения ~ 2,1 т.п.н. фрагмента SEQ ID NO. 1 кодирующего протеин pRME SEQ ID NO. 3. Смотрите фигуру 3А.

FVFP: 5'AACTGCTCGAGGAATTCGGATCCAAC 3'

FVRP: 5' AATGGGCATGCCTGCAGGCGGCCGCTC 3'

Амплифицированные ПЦР фрагменты были расщеплены рестрикционными ферментами EcoR1 и Not1 и клонированы в сайтах EcoR1 и Not1 плазмидного вектора pFastBac (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) под контролем полиэдронного промотора способами, описанными в руководстве пользователя Bac-Bac бакуловирусной системы экспрессирования ("An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins, Life Technologies, USA). Коротко говоря, способ использует сайт-специфическую транспозицию экспрессионной кассеты, такой как рекомбинантный вектор pFastBac с клонированными вставками, как описано выше, в бакуловирусный шаттл-вектор (bacmid), который распространяется в *E.coli*. Рекомбинантный вектор pFastBac, содержащий одну из вставок SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, клонированных под контролем полиэдронного промотора, трансформируется в компетентные клетки *E.coli* с максимальной эффективностью DH10BacTM, содержащий бакуловирусный шаттл-вектор (bMON14272) и хелперную плазмиду (pMON7124), облегчающую транспозицию, чтобы разрешить эффективное повторное получение рекомбинантной bacmid. Рекомбинантные bacmid были выбраны относительно ампициллина, гентамицина и канамицина, содержащие планшеты с использованием голубого/белого отбора с использованием bluо-gal или X-gal, и IPTG. Рекомбинантные bacmids после подтверждения с использованием ПЦР относительно присутствия генных вставок были выделены по стандартным протоколам, описанным в указанном выше руководстве пользователя. Приблизительно 1 мкг bacmid ДНК использовали для

трансфекции с липофектаминоном в *Spodoptera frugiperda* Sf9 клетках насекомых (Life Technologies, Carlsbad, USA), выращенных в сыворотке свободной от клеток насекомых среде. Способы, используемые для трансфекции, выделения и титрования P1 вирусных исходных растворов точно описаны в руководстве пользователя относительно Vac-Vac бакуловирусной системы экспрессирования, как указано выше. P1 исходные растворы серийно амплифицировали дважды, для получения P3 исходных растворов с высоким титром для экспрессии рекомбинантных ргМЕ протеинов в Sf9 клетках. Бакуловирусные исходные растворы с высоким титром для экспрессии протеина ргМЕ SEQ ID No. 3 экспрессировали в 25 мл суспензии культуры Sf9 клетки и затем систематически масштабировали вплоть до 125 мл на 500 мл колбу. Бакуловирусные инфицированные клетки из нескольких колб собирали через 72 часа после инфицирования, объединяли, промывали один раз 1 x PBS, pH 7,6 и лизировали буфером для лизиса клеток, содержащий 10 mM фосфата, pH 7,6 с 50 mM NaCl, 1 mM PMSF и 5 mM ЭДТУ. Клеточный лизат центрифугировали при 20 000 об./мин. в течение 30 минут, для удаления клеточного дебриса, и супернатант концентрировали с использованием протеиновых концентраторов с 10 кДа мембранным отсечением. Концентрированный образец наслаивали на предварительно уравновешенном градиенте сахарозы от 20% до 60% и центрифугировали при 100 000 x g в течение 6-8 часов. Фракции, содержащие рекомбинантный мембранный протеин и протеин оболочки выделяли и подтверждали, применяя вестерн-блоттинг (**Фиг. 3В**) с использованием кроличьей MR766 поликлональной антисыворотки. Очищенный рекомбинантный протеин представляет собой последовательность современного азиатского генотипа вируса Зика, экспрессирующего с использованием гена последовательности SEQ ID NO. 1, кодирующего протеин SEQ ID No. 3. Рекомбинантный ME протеин перекрестно взаимодействовал с MR766 антителами в Вестерн-блоттинге и в ELISA и был сформулирован, как вакцинный антиген для исследования на мышах Balb/c как описано в разделах ниже.

Пример 5: Вакцинные композиции

Антиген вакцины против вируса Зика любого из указанных выше способов в предыдущих примерах исследовался относительно иммуногенности на лабораторных животных с и без адъювантов. Наблюдался высокий уровень связывания (> 95%) с гидроксидом алюминия (Alhydrogel® 2%, Brenntag) как адъювантом, используемым в дозе в диапазоне от 0,1 мг до 1,5 мг алюминия (представлен в качестве гидроксида алюминия) на дозу даже в исследовании с высокой дозой антигена 40 мкг. Связывание было полным во всех концентрациях антигенов вируса Зика, а также вакцинных комбинациях с CHIKV и JE антигенами, обсуждаемых в следующих разделах, которые использовались для исследования на мышах. Связывание с гидроксидом алюминия осуществляли в течение трех часов при температуре окружающей среды. Аликвоту композиции центрифугировали при 5000 x g в течение 5 мин., и супернатант исследовали относительно полноты связывания антигеном ELISA. Связывание антигена было полным, поскольку не был обнаружен в супернатанте с использованием ELISA. Буфер для адъювантных композиций представлял собой 10 mM фосфатный буфер, содержащий 154 mM NaCl, pH 7,40 ± 0,2 и необязательно содержащий 1% сорбита и 0,5% L-глицина. Другие буферы, используемые для специфических композиций приведены ниже. Адъюванты, представленные ниже исследовались относительно сравнительной иммуногенности и во всех случаях концентрации предусмотрены на дозу вакцины. Инактивированный вирусный антиген Зика исследовали при 10 мкг на дозу:

- a) Инулин (Orafti-HPX, Beneo) исследовали при 0,5 мг на дозу; гамма инулина получали способами, описанными в (Cooper и Steele, 1988).
- b) Комбинация гидроксида алюминия и инулина. Комбинация инулина и гидроксида алюминия, альгамулина получали в соотношении 10:1 (10мг /мл инулина : 1 мг/мл алюминия в виде гидроксида алюминия) исследовали при 0,5 мг на дозу.

- c) Мумарилдипептид (L18-MDP) (tlrl-Imdp, Invivogen) при 10 мкг на дозу.
- d) MPL (липид А, монофосфорил из *Salmonella enterica*, L-6895-1 МГ, Sigma Aldrich) при 25 мкг на дозу.
- e) Комбинация с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) и 25 мкг MPL на дозу.
- f) Эмульсия масло-в-воде (OWEM1), содержащая 9,75 мг сквалена (S3626-100ML, Sigma Aldrich), 11,86 мг альфа-токоферола (T3251-5G, Sigma Aldrich), 4,58 мг Твин-80 (61771205001730, Merck) в 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,2.
- g) Эмульсия масло-в-воде 3 (OWEM2), содержащая 9,75 мг сквалена, 1,175 мг твин-80, 1,175 мг Span-85 (S7135-250ML, Sigma Aldrich) в 10 мМ цитратном буфере, pH 7,0.
- h) Поли-IC (полиинозиновая полицитидиловая кислота, калиевая соль, Cat. NO. P9582-5МГ, Sigma Aldrich) при 25 мкг на дозу.
- i) Холекальциферол (Arachitol, Abbot) при 0,75 мг на дозу.
- j) Резиквимод (SMJ0196-10МГ, Sigma Aldrich) + Поли IC, 25 мкг каждого.
- k) Резиквимод (25 мкг) + Эмульсия масло-в-воде 2, содержащая 9,75 мг сквалена, 1,175 мг твин-80, 1,175 мг Span-85 (S7135-250ML, Sigma Aldrich) в 10 мМ цитратном буфере, pH 7,0.
- l) Алюминия 0,25 мг и 0,5 мг на дозу, предоставленную в виде гидроксида алюминия.

Все указанные выше композиции индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител, и результаты изображены на **Фигуре 4**. Отдельные компоненты указанных выше адъювантов и любого из их аналогов, производных, замещенных боковых цепей и каких-либо модификаций любого из указанных выше компонентов при варьировании концентраций могут использоваться в качестве нетоксичных вакцинных адъювантных компонентов при условии, что они имеют иммунопотенциальный эффект. Инактивированные формалином и рекомбинантные вакцинные антигены Зика, как описано в указанных выше разделах, каждый в концентрации от 10 мкг на дозу были лиофилизированы в комбинации с одним из следующих эксципиентов: 1% маннит и 0,5% глицин, 5% сахароза и 1% трегалоза, 5% сахароза и 1% мальтоза и 2% маннит и 0,5% глицин. Сухая лиофилизированная композиция может быть легко восстановлена в водном растворе с водой, нормальным солевым раствором и 10 мМ фосфатным буферным солевым раствором, pH 7,4±0,2. Стабильность композиции исследовали при 37 °С в течение двух недель. Никаких изменений в характеристиках коржа не наблюдалось, что свидетельствует о стабильности композиций. Содержание влаги составляло ниже 1%.

Пример 6: Влияние стабилизирующих агентов

Стабильность инактивированной формалином вакцины, основной для применения в качестве неадъювантного вакцинного антигена исследовали относительно стабильности с последующей концентрацией стабилизирующих агентов: а) 2% сорбит и 1% L-глицин; b) 1% сорбит и 0,5 % L-глицин c) 1% маннит и 0,5% L-глицин; d) 1% маннит и 0,5% L-глутаминовая кислота; e) 1% сорбит и 0,5% L-глицин, 1% альбумин сыворотки человека. Исследования стабильности осуществляли при 37°С в течение 2 недель, и концентрацию антигена исследовали с использованием ELISA перед и после экспозиции при 37 °С. 1 мкг и 10 мкг неадъювантной композиции с 1% сорбита и 0,5% L-глицина исследовали относительно иммуногенности на мышах Balb/c, как обговаривалось в следующих разделах.

Пример 7: Исследование эффективности вакцинных композиций в моделях на животных

Вакцинный антиген Зика, инактивированный указанными выше способами, исследовали на мышах Balb/c с дозами в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг антигена на дозу с 0,25 мг алюминия на дозу (в виде гидроксида алюминия) в объеме 100 мкл (инъекции в два места по 50 мкл на место) внутримышечным способом в дни 0, 14, 28. Первоначальное исследование относительно эффекта алюминия (представленного в виде гидроксида алюминия) показало, что адсорбированная на алюмокалиевых квасцах вакцина давала более высокий титр нейтрализующих антител, чем неадьювантная вакцина. Приблизительно 1 и 10 мкг инактивированного вакцинного антигена без алюмокалиевых квасцов содержал 1% сорбита и 0,5% L-глицина в качестве эксципиентов, для обеспечения стабильности вакцинных антигенов. Кровь была взята из ретро-орбитального синуса на 13, 21 и 35-ый день для оценки титров нейтрализующих антител с использованием PRNT₅₀, общий Ab титр с использованием ELISA, Ab авидность и профили цитокинов. Отбор крови и исследование после каждой дозы давало данные относительно эффективности и безопасности однократного введения, двух доз и трех доз вакцинных препаратов. Животные в каждом случае были контрольно заражены на 36-й день 10e5 PFU вирусом Зика внутривенным способом. Образцы крови контролировали в течение вплоть до 7 дней с 24 часовыми интервалами для группы формалина и в двух точках в 48 часов и 96 часов для группы инактивации BPL для защиты от вирусемии TCID₅₀ (50% Доза инфекции культуры ткани) и вирусные титры, если какой-либо присутствует, были выражены как TCID₅₀/мл. Исследование контрольного заражения животных показали полную защиту от вирусемии при от 1 мкг до 40 мкг дозы в исследуемых группах. Следовательно, инактивированные BPL и формалином вакцинные композиции дополнительно исследовали в количестве 0,5 мкг, и 0,25 мкг, 0,125 мкг на дозу в.м. способом мышам Balb/c и, как было обнаружено, является иммуногенным даже при малых разведениях. Для адьювантных алюмокалиевыми квасцами композиций, 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу использовалась в качестве контрольного плацебо и для неадьювантных композиций, 10 mM фосфатный буфер, содержащий 154 mM NaCl, 1% сорбита и 0,5% L-глицина, pH 7,40 использовался в качестве контроля носителем. Все инактивированные формалином и BPL композиций индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител и защищали от вирусемии как показано на **Фиг. 5А, Фиг. 5В и Фигуре 6**. Только антигенные композиции также индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител и защищали при вирусном контрольном заражении. Рекомбинантный протеин rgME, экспрессированный в клетках насекомых, был сформулирован в двух дозах 10 и 20 мкг на дозу с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу у Balb/c (8 мышей) и инъекционно вводили внутримышечно на 0-ой день и 21-ый день индуцировали нейтрализующие антитела и данные представлены в таблице 1. Гамма облученный и инактивированный пероксидом водорода вирусный антиген Зика в дозовой концентрации 10 мкг и сформулированы с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу инъекционно вводили в.м. способом мышам Balb/c на 0-ой день и 21-ый день, и кровь брали на 28-ой день для оценки нейтрализующих антител с помощью PRNT₅₀. Инактивированный формалином вирусный антиген в количестве 10 мкг был сформулирован с каждым из адьювантов, раскрытых в Примере 5 и инъекционно вводили внутримышечно мышам Balb/c в возрасте 4 - 6 недель (5 мышей на группу дозирования), и кровь брали через 21 день после введения вакцины для оценки нейтрализующих антител и цитокинов. Контрольные группы были включены для каждого из адьювантов, и никакие нейтрализующие антитела (≤ 10 по PRNT₅₀) не могли быть детектированы, и данные не отображаются. Нейтрализующие титры антител по PRNT₅₀ различных адьювантных композиций, использованные сгруппированные сыворотки из каждой группы представлены на **Фигуре 4**. Высокий уровень нейтрализующих антител был индуцирован указанными выше адьювантными композициями.

Комбинированные вакцины антигенов арбовируса получали со следующими концентрациями и исследовали на мышах Balb/c: а) 10 мкг инаktivированного формалином вирусного антигена Зика, 20 мкг инаktivированного BPL антигена вируса Чикунгунья и 6 мкг инаktivированного формалином антигена JE в трехвалентной вакцинной комбинации; б) 10 мкг инаktivированного формалином вирусного антигена Зика и 20 мкг инаktivированного BPL антигена вируса CHIKV; с) 10 мкг инаktivированного формалином вирусного антигена Зика и 6 мкг антигена вируса JE. Все перечисленные выше вакцинные комбинации исследовали с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу мышам Balb/c (8 мишей каждая) с соответствующими контролями, в которые включены или указанные выше антигены самостоятельно, и также контрольные животные, получающие эквивалентное количество алюмокалиевых квасцов. Животных повторно иммунизировали на 14-ый и 21-ый день после первой иммунизации. Кровь брали через 7 дней после последней инъекции. Образцы сыворотки использовали для оценки нейтрализующих антител с помощью PRNT₅₀ для Зика, CHIKV и JEV. Буфер, используемый во всех композициях, представлял собой 10 мМ фосфатный буфер, pH от 7,2 до 7,6, содержащий 154 мМ NaCl. Все способы, раскрытые выше, применимы к любому генотипу/генотипных вариантов/серотипов и штаммов вируса Чикунгунья, вируса Зика и вирусов японского энцефалита. Смотрите таблицу 1 относительно результатов.

Таблица 1: Нейтрализующие антитела индуцировали с использованием различных антигенных композиций, как раскрыто в примерах.

Группы исследования	Титры нейтрализующих антител как Log10PRNT ₅₀		
	Зика а	CHIKV	JE
Рекомбинантный rgME Зика – 10 мкг x 2 дозы	2,8	-	-
Рекомбинантный rgME Зика – 20 мкг x 2 дозы	3,22	-	-
Инаktivированный пероксидом водорода антиген Зика – 10 мкг x 2 дозы	2,6	-	-
Гамма облученный антиген Зика 10 мкг x 2 дозы	2,71	-	-
Зика адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 10 мкг x 3 дозы	3,06	-	-
Чикунгунья адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 20 мкг x 3 дозы	-	2,808	-
JE адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 6 мкг x 3 дозы	-	-	3,06
Зика (10 мкг) + CHIKV (20 мкг) x 3 дозы	2,95	2,68	-
Зика (10 мкг) + JE (6 мкг) x 3 дозы	2,80	-	3,28
Зика (10 мкг) + CHIKV(20 мкг) + JE (6 мкг) x 3 дозы	2,79	2,63	3,21

Таблица 1 Легенда: Очищенный рекомбинантный rgME антиген вируса Зика и инаktivированные пероксидом водорода и гамма облученные антигены вируса Зика, сформулированы с 0,25 мг алюминия на дозу, индуцировали нейтрализующие антитела у мышей Balb/c. Титры выражаются в виде значения Log10PRNT₅₀. Вакцинные комбинации индуцировали нейтрализующие антитела, когда два или более антигенов были введены в одну композицию, и никакой значительной антигенной интерференции не наблюдалось между вирусами JE, Зика и CHIKV.

Пример 8: Исследование пассивной иммунизации

Доказательство концепции, что нейтрализующие антитела являются важными иммунными коррелятами защиты против вирусной инфекции Зика, было продемонстрировано одноразовой инъекцией кроличьей поликлональной антисыворотки Зика с известным титром, приблизительно 200 мкл антисыворотки разбавленного 1:1 с PBS инъекционно внутрибрюшинно вводили мышам Balb/c и были контрольно заражены через 8-24 часов после 10^5 PFU вируса Зика внутривенным способом в объеме 100 мкл. Одинаковое количество контрольных животных получало PBS, pH 7,4 и получало инъекцию вируса в качестве исследуемых животных. Кровь брали через 24, 48, 72, 96 и 144 часов после вирусного контрольного заражения для обнаружения вирусемии в обеих группах животных. Пассивная иммунизация осуществляла полную защиту против вирусемии, и инфекционный вирус не мог быть обнаружен с использованием TCID₅₀. Смотрите фигуру 7. Вирусемия была обнаружена у контрольных животных, которые сохранялись в течение вплоть до 6 дней после вирусного контрольного заражения. Антитела Зика могут использоваться в качестве терапевтических средств для смягчения, уничтожения или предотвращения вирусных инфекций Зика.

Пример 9: Анализы титров нейтрализующих антител

Сыворотки животных из всех указанных выше исследований вакцины у мышей, описанных в Примере 7, включающие все моновалентные вакцины Зика, инаktivированные различными инаktivирующими агентами и сформулированные с различными адъювантами, вакцинные антисыворотки из дозы, находящейся в диапазоне от исследований, а также комбинированные вакцины с CHIKV и JEV, описанные в предыдущих разделах, анализировали для нейтрализующих антител относительно 50% реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT₅₀) по стандартизированным процедурам. Коротко говоря, за один день до анализа 6-луночные планшеты высевали с $2,5 \times 10^3$ клетками Vero (ATCC CCL-81) на лунку, и планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. До 4-кратных разбавлений образцов сыворотки в MEM, содержащие одинаковый объем стандартизированного штамма вируса Зика (10^5 pfu/мл) добавляли и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 90 минут. Клетки промывали дважды 1 x PBS pH 7,4 (10 mM фосфата с 150 mM NaCl), и добавляли 0,30 мл каждого разбавления смеси сыворотка-вирус в соответствующие лунки и инкубировали в течение 90 минут при 37 °C в 5% CO₂ инкубаторе. Каждый анализ осуществляли в трех повторах. Клетки были наложенными на 2 мл 0,85% метилцеллюлозы в MEM с 1% пенициллина-стрептомицина и 1% L- глутамина. Планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 4 дней. В конце инкубирования, бляшки фиксировали 10% формалина, промывали 1 x PBS, pH 7,4 и визуализировали с 0,1% кристаллическим фиолетовым. Высшее разбавление сыворотки, что приводило к 50% уменьшению количества бляшек, сформированных контрольным образцом вируса оценивали как титр PRNT₅₀. Анти-CHIKV и анти-JEV антитела из вакцинных комбинаций также оценивали PRNT₅₀. Все указанные выше вакцинные антигены индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител как изображено на **Фигурах 5 и 6**.

Пример 10: Исследование перекрестной нейтрализации вируса Зика

Инаktivированные формалином вакцинные антисыворотки перекрестно нейтрализованы гомологичным штаммом вируса MR766 африканского генотипа и штаммом FSS13025 вируса Зика (GenBank Acc No. JN860885) азиатского генотипа с одинаковой эффективностью титров PRNT₅₀ 18105 и 18325 против штаммов MR766 и FS13025, соответственно. (Исследование BS-3018 были предусмотрены контрактом IBT Bioservices, Gaithersburg, MD, USA). Коротко говоря, как MR766, так и штаммы FS13025 вируса Зика разбавляли до ~ 250 PFU в среде без сыворотки. Как вакцинные антисыворотки, так и

контрольные сыворотки (плацебо) серийно разбавляли в двукратных делениях. Вирусные образцы смешивали 1:1 с серийно разбавленными образцами сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Клетки Vero, высеянные в 24-луночные планшеты, инфицировали разбавлениями в течение 1 часа, и 0,85% метилцеллюлозы добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 3 дней. Клетки фиксировали и анализировали с использованием анализа бляшек. Планшеты сканировали, и количество бляшек использовали для расчета титров PRNT₅₀ с использованием кривой 4PL. Следовательно, способ получения вакцинного антигена, формуляции и исследования вполне перекрестно применимы к любому генотипу вируса Зика, как вакцины с одним генотипом 100% перекрестно нейтрализуют гетерологичный штамм, и это также доказывает, что никаких серотипов вируса Зика не существует и что инактивированная вакцина Зика с использованием любого штамма будет одинаково защитной и эффективной как вакцина, полученная с использованием любого генотипа, и генотипического варианта или, более того, любого штамма вируса Зика. Данный факт был дополнительно подтвержден, когда антитела, индуцированные против рекомбинантного протеина, экспрессированного как ргМЕ (протеин SEQ ID No. 3) в клетках насекомых перекрестно нейтрализованных вирусом MR766 с высокой эффективностью. Протеин SEQ ID No. 3 получен из ргМЕ африканского генотипа штамма вируса Зика H/PF/013, который является более современным штаммом азиатского генотипа. Перекрестная нейтрализация вакцинной антисыворотки гомологического штамма MR766 нуклеотидной SEQ ID NO. 5, кодирующая полный ORF с SEQ ID NO. 6 и гетерологичный FSS13025 с SEQ ID No. 7, кодирующая полный ORF с SEQ ID NO. 8 изображены на **Фигуре 8А и Фиг. 8В**.

Пример 11: ELISA для антител

Коротко говоря, вирусный антиген Зика был нанесен со стандартизированной концентрацией в буфере для покрытия в 96-луночных планшетах в течение ночи при от 2 до 8°C. Содержание планшета отбрасывали, и лунки блокировали блокирующим буфером и интенсивно промывали перед добавлением вакцинных антисывороток при серийных разбавлениях. Каждую вакцинную антисыворотку анализировали в трех повторях. Планшеты инкубировали в течение 90 мин. при 37°C, перед добавлением вторичного антитела (анти мышиный-IgG HRPO конъюгат) разбавленного 1: 2500 в буфере для разбавления антитела. Каждую из лунок промывали пять раз промывочным буфером (PBST, pH 7,4) и три раза PBS (pH 7,4), каждые 30 секунд. Добавляли приблизительно 100 мкл/лунку свежо полученного субстратного раствора и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 10 минут для развития цвета. Развитие цвета останавливали добавлением 50 мкл/лунку раствора для остановки. Поглощение считывали на 492 нм, и результаты были записаны. Для каждого анализа были включены антигенный контроль, контроли первичного и вторичного антитела, в качестве контролей. Значение отсечения сероконверсии = средний титр перед экспозицией + (3 x стандартное отклонение). Идентифицированными были разбавления конечной точки положительно сероконвертированного образца, который показывает титр эквивалентный уровню перед экспозицией. Обратная зависимость предпоследнего разбавления конечной точки положительно сероконвертированного образца интерпретировали как титр конечной точки антитела. Титры антител как инактивированных BPL, так и инактивированных формалином вакцинных композиций Зика были более высокими с гидроксидом алюминия, чем с антигенами самостоятельно. Вакцинные композиции, инактивированная формалином вакцина во всех дозах (**Фиг. 9А-9С**) и все дозы инактивированной BPL вакцины (данные не показаны), индуцировали высокий уровень антитела, после введения каждой дозы вакцины, что подтверждает то, что вакцина может вводиться в качестве однократной дозы или двумя или более дозами для индуцирования надежного иммунного ответа против вируса Зика.

Пример 12: Авидности антител

Качество антительных ответов на вакцину оценивали с использованием анализов авидности антител. Авидности связывания антиген-антитело представляют собой степень созревания аффинности в В-клетках. Более высокие авидности антитела коррелируют с нейтрализующими антителами в нескольких вакцинных исследованиях. Перед определением индекса авидности, проводили титрование изотиоцианатом натрия (NaSCN) с концентрацией от 0 М до 6 М в 0,25 М ступени от 0 до 2,0 М. После добавления и инкубирования первичной антисыворотки в планшеты, покрытые антигеном, планшеты инкубировали с калиброванными концентрациями NaSCN в течение 15 мин. с периодическим перемешиванием, промывали и развивали как в обычном ELISA. Полученные оптические плотности для каждой из концентраций наносили на график. Самый высокий показатель OD (A) был нанесен на график и поделен пополам (A/2), и расстояние между кривыми OD при A/2 измерялось как значение смещения NaSCN. Смещение NaSCN было более высоким после первой бустерной дозы по сравнению с основной дозой и оставалось статичным или немного увеличивалось после введения второй бустерной дозы, что свидетельствует о том, что антитела с высокой аффинностью развиваются со временем и с инъекциями бустеров. Референтной точкой в титровании ELISA была взята для вычисления индекса авидности, (AIJ), которая представляет собой соотношение концентрации антитела (измеряемого поглощением) в ELISA, детектировали образцы сыворотки, обрабатывали с и без агента, который вызывает диссоциацию комплексов NaSCN. Даже при низкой концентрации однократной дозы 1 мкг инактивированной формалином вакцины Зика, детектировали антитела с высокой аффинностью связывания с антигеном, что свидетельствует о том, что вакцина является сильной даже при низких концентрациях вакцинного антигена (Смотрите **Фигуру 10**).

Пример 13: Профилирование цитокинов

Как Th1, так и Th2 цитокины оценивали в мышинных сыворотках после введения двух доз инактивированного формалином антигена Зика, сформулированного с различными адъювантами, включающими гидроксид алюминия и только в антигенных контролях для сравнения. Мышинный набор ELISA - Th1 / Th2 (Catalog No. 88-7711-44, eBioscience) использовали для оценки IL-2, IFN гамма, IL-4 и IL-10 способами точно такими же, как в протоколах к набору с использованием стандартов, предоставляемых в наборе. Концентрация цитокинов выражается в пг/мл. Результаты относительно уровней цитокина Th1 изображены на **Фигуре 11А и Фиг. 11В** и цитокинов Th2 на **Фиг. 12А и Фиг. 12В**.

Пример 14: Оценка титров вирусов

Количество инфекционных вирусных частиц в образцах биопроцесса в обратном направлении и в прямом направлении, титры вируса Зика для исследований контрольного заражения животных измеряли, применяя анализ TCID₅₀ (50% доза инфекции культуры ткани). Данный анализ измеряет разбавление образца вируса, который генерирует цитопатический эффект (CPE) у 50% клеток. Клетки Vero высевали в 96-луночные микропланшеты и инкубировали в 5% CO₂ при 37°C в течение ночи. Клетки инфицировали 10-кратными серийными разбавлениями образца вируса, с последующим инкубированием в течение 5 дней в 5% CO₂ при 33°C. Клетки визуально обследовали по CPE, и титр TCID₅₀ рассчитывался согласно способу Рида и Мюнча (ссылка). Результаты представлены как log₁₀ титра (10xTCID₅₀ единицы/мл). Альтернативно использовали анализы бляшек, и титры выражали в качестве бляшкообразующих единиц, PFU/мл.

ССЫЛКИ

1. Cooper PD, Steele EJ. The adjuvanticity of gamma inulin. Immunol Cell Biol. 1988,

66:345-52.

2. Reed LJ. Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Epidemiol. (1938) 27 (3): 493-497

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED

<120> ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АБРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

<130> P 15-309-IN

<140> 3652/CHE/2015

<141> 2015-07-16

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2121

<212> ДНК

<213> prME, Зика Азиатский генотип

<400> 1

ctcgaggaat tcggatccaa ctccataaaaa accgccacca tggcagatac cagcgtcggc	60
atcgtcggac tcttggtgat taccacggca atggcagcag aagtgacccg caggggcagc	120
gcctactaca tgtacctga caggaacgat gcgggagagg ctatcagctt ccctaccact	180
ttgggcatga acaagtgtta catccagatt atggacctgg gtcacatgtg cgatgctacc	240
atgtcttacg aatgtcctat gctggacgag ggcgtggaac ccgacgatgt cgattgctgg	300
tgtaacacaa cgagtacttg ggtggtgtac ggtacatgtc accataagaa aggtgaagct	360
aggcgttcga ggagagctgt gacgctcccc agtcactcga ccaggaagtt gcagactaga	420
agtcaaacat ggctggagtc gcgcgaatac aaaaaacatc tgatcagggg cgaaaactgg	480
attttcagaa accctggatt cgctctcgct gccgcagcga tcgcttggct gctcggttcc	540
agcacctccc aaaagggttat ttacctggtc atgatcttgc tgattgctcc cgcctactcc	600
atccgctgca ttggcgtag caaccgtgac ttcgtggagg gaatgagcgg tggcacttgg	660
gtggatgttg tgttggaaca cggagggtgt gtcacggtta tggctcagga caagccaacc	720
gttgatatcg agctgggtcac cactacagtt tctaacatgg ctgagggtcag gtcatactgc	780
tacgaagcct ccatcagcga catggcatct gattcaagat gtccgaccca aggtgaagct	840
tacctcgaca agcagtcaga tactcaatac gtctgcaaac gcacattggt tgaccgtggc	900
tggggaaacg gttgtggcct cttcggaag ggtagtttgg tcacgtgcgc caaattcgca	960
tgtagtaaga aaatgaccgg caagtcgatc cagccagaga acctggaata ccgcattatg	1020
ctctctgtgc acggaagtca acattcgggt atgatcgtca acgacacggg ccacgagacc	1080
gatgaaaacc gcgccaaggt ggagatcacg cctaactctc cccgtgcaga agctaccctc	1140
ggcggattcg gatcactggg tctcgactgc gagccccgta ctggcttgga cttctcagat	1200
ttgtactacc tgacaatgaa caacaagcac tggctcgtcc ataaagaatg gttccacgac	1260
atcccaactgc cttggcacgc tggagctgat actggcacc ctcactggaa caacaaggag	1320

gccctggtgg agttcaagga cgcacatgcg aaacgccaga cagtcggtgt gctcggtcc	1380
caagaaggag ctgtgcacac tgctctggcc ggtgctctgg aggccgaaat ggacggcgca	1440
aagggacgtc tgtcttcagg ccatttgaaa tgcaggctga agatggacaa attgagactg	1500
aagggagtga gttactcgtt gtgtacggct gccttcactt tcacaaaaat ccctgctgag	1560
actctgcacg gcacgggtgac cgtcgaagtt cagtacgccg gtactgacgg accatgcaag	1620
gtgccggctc agatggctgt cgatatgcaa actttgacac cagtcggcag gctgatcaca	1680
gctaaccggg ttattacgga gtctaccgaa aactcaaaga tgatgctgga gctggaccct	1740
cctttcggag attcctacat cgtgattggc gtcggagaaa agaaaatcac ccaccattgg	1800
cacagatccg gtagcactat tggcaaggcc ttcgaggcaa cagttcgcgg tgcgaaacgt	1860
atggctgtgc tgggagacac tgcttgggat ttcggttcgg tgggtggtgc tctgaactcc	1920
ctgggcaagg gcatccacca gattttcgga gcagcgttca aaagcctgtt cggaggtatg	1980
tcctgggttca gccaaatcct catttggact ctcttgatgt ggctgggcct caacacaaag	2040
aacggatcta tctcactgat gtgcttggct ttgggaggtg ttttgatctt cttgtctact	2100
gctgtgagcg ccgatgtggg a	2121

<210> 2
 <211> 2079
 <212> ДНК
 <213> pME, Зика MR766

<400> 2	
atggcagaca ccagcatcgg aatcattggc ctcttctgta ctacagccat ggcagcagag	60
atcactagac gcgggagtgc atactacatg tacttggata ggagcgtgc cgggaaggcc	120
atttcgtttg ctaccacatt gggagtgaac aagtgccacg tacagatcat ggacctcggg	180
cacatgtgtg acgccaccat gagttatgag tgccctatgc tggatgaggg agtggaaacca	240
gatgatgtcg attgctggtg caacacgaca tcaacttggg ttgtgtacgg aacctgtcat	300
cacaaaaaag gtgaggcacg gcgatctaga agagccgtga cgctcccttc tcaacttaca	360
aggaagttgc aaacgcggtc gcagacctgg ttagaatcaa gagaatacac gaagcacttg	420
atcaaggttg aaaactggat attcaggaac cccgggtttg cgctagtggc cgttgccatt	480
gcctggcttt tgggaagctc gacgagccaa aaagtcatat acttgggtcat gatactgctg	540
attgccccgg catacagtat caggtgcatt ggagtcagca atagagactt cgtggagggc	600
atgtcaggtg ggacctgggt tgatgttgtc ttggaacatg gaggtgcgt taccgtgatg	660
gcacaggaca agccaacagt tgacatagag ttggtcacga cgacggttag taacatggcc	720
gaggtaagat cctattgcta cgaggcatcg atatcggaca tggcttcgga cagtcgttgc	780
ccaacacaag gtgaagccta ccttgacaag caatcagaca ctcaatatgt ctgcaaaaga	840

acattagtgg acagaggttg gggaaacggt tgtggacttt ttggcaaagg gagcttggtg 900
 acatgtgcca agtttacgtg ttctaagaag atgaccggga agagcattca accggaaaat 960
 ctggagtatc ggataatgct atcagtgcac ggctcccagc atagcgggat gattgtcaat 1020
 gatacaggat atgaaactga cgaaaataga gcgaaagtcg aggttacgcc taattcacca 1080
 agagcggaag caaccttggg aggctttgga agcttaggac ttgactgtga accaaggaca 1140
 ggccttgact ttccagatct gtattacctg accatgaaca ataagcattg gttggtgcac 1200
 aaagagtggg ttcattgacat cccattgcct tggcatgctg gggcagacac cggaaactca 1260
 cactggaaca acaaagaggc attggtagaa ttcaaggatg cccacgcca gagggcaaacc 1320
 gtcgtcgttc tggggagcca ggaaggagcc gttcacacgg ctctcgctgg agctctagag 1380
 gctgagatgg atggtgcaaa gggaaagctg ttctctggcc atttgaaatg ccgcctaaaa 1440
 atggacaagc ttagattgaa gggcgtgtca tattccttgt gcactgcggc attcacattc 1500
 accaaggtcc cagctgaaac actgcatgga acagtcacag tggaggtgca gtatgcaggg 1560
 acagatggac cctgcaagat cccagtccag atggcgggtg acatgcagac cctgacccca 1620
 gttggaaggc tgataaccgc caaccccgctg attactgaaa gcactgagaa ctcaaagatg 1680
 atgttgagac ttgaccacc atttggggat tcttacattg tcataggagt tggggacaag 1740
 aaaatcacc accactggca taggagtggg agcaccatcg gaaaggcatt tgaggccact 1800
 gtgagaggcg ccaagagaat ggcagtcctg ggggatacag cctgggactt cggatcagtc 1860
 gggggtgtgt tcaactcact gggtaagggc attcaccaga tttttggagc agccttcaaa 1920
 tcactgtttg gaggaatgtc ctggttctca cagatcctca taggcacgct gctagtgtgg 1980
 ttaggtttga acacaaagaa tggatctatc tccctcacat gcttggccct ggggggagtg 2040
 atgatcttcc tctccacggc tgtttctgct gacgtgggg 2079

<210> 3
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> prME, Зика Азиатский генотип

<400> 3

Met Ala Asp Thr Ser Val Gly Ile Val Gly Leu Leu Leu Ile Thr Thr
 1 5 10 15

Ala Met Ala Ala Glu Val Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr
 20 25 30

Leu Asp Arg Asn Asp Ala Gly Glu Ala Ile Ser Phe Pro Thr Thr Leu
 35 40 45

Gly Met Asn Lys Cys Tyr Ile Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys
 50 55 60

Asp	Ala	Thr	Met	Ser	Tyr	Glu	Cys	Pro	Met	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Glu	
65					70					75					80	
Pro	Asp	Asp	Val	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Val	
				85					90					95		
Tyr	Gly	Thr	Cys	His	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	
			100					105					110			
Ala	Val	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ser	Thr	Arg	Lys	Leu	Gln	Thr	Arg	Ser	
		115					120					125				
Gln	Thr	Trp	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Tyr	Thr	Lys	His	Leu	Ile	Arg	Val	
	130					135					140					
Glu	Asn	Trp	Ile	Phe	Arg	Asn	Pro	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	
145					150					155					160	
Ile	Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Tyr	Leu	
			165						170					175		
Val	Met	Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Ile	Arg	Cys	Ile	Gly	
			180					185					190			
Val	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly	Met	Ser	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	
		195					200					205				
Asp	Val	Val	Leu	Glu	His	Gly	Gly	Cys	Val	Thr	Val	Met	Ala	Gln	Asp	
	210					215					220					
Lys	Pro	Thr	Val	Asp	Ile	Glu	Leu	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Asn	Met	
225				230						235					240	
Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Asp	Met	Ala	
				245					250					255		
Ser	Asp	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu	Ala	Tyr	Leu	Asp	Lys	Gln	
			260					265					270			
Ser	Asp	Thr	Gln	Tyr	Val	Cys	Lys	Arg	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	
		275					280					285				
Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Cys	Ala	
	290					295					300					
Lys	Phe	Ala	Cys	Ser	Lys	Lys	Met	Thr	Gly	Lys	Ser	Ile	Gln	Pro	Glu	
305					310					315					320	

Asn	Leu	Glu	Tyr	Arg	Ile	Met	Leu	Ser	Val	His	Gly	Ser	Gln	His	Ser		
				325					330					335			
Gly	Met	Ile	Val	Asn	Asp	Thr	Gly	His	Glu	Thr	Asp	Glu	Asn	Arg	Ala		
			340					345					350				
Lys	Val	Glu	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Glu	Ala	Thr	Leu	Gly		
		355					360					365					
Gly	Phe	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp		
	370					375					380						
Phe	Ser	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Met	Asn	Asn	Lys	His	Trp	Leu	Val		
385					390					395					400		
His	Lys	Glu	Trp	Phe	His	Asp	Ile	Pro	Leu	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Ala		
				405					410					415			
Asp	Thr	Gly	Thr	Pro	His	Trp	Asn	Asn	Lys	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Phe		
			420					425					430				
Lys	Asp	Ala	His	Ala	Lys	Arg	Gln	Thr	Val	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gln		
		435					440					445					
Glu	Gly	Ala	Val	His	Thr	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Met		
	450					455					460						
Asp	Gly	Ala	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Leu		
465					470					475					480		
Lys	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr		
				485					490					495			
Ala	Ala	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	Glu	Thr	Leu	His	Gly	Thr		
			500					505					510				
Val	Thr	Val	Glu	Val	Gln	Tyr	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val		
		515					520					525					
Pro	Ala	Gln	Met	Ala	Val	Asp	Met	Gln	Thr	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg		
	530					535					540						
Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ser	Lys		
545					550					555					560		
Met	Met	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Ile		
				565					570					575			

Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly Ser
580 585 590

Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg Met
595 600 605

Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Ala
610 615 620

Leu Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe
625 630 635 640

Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly
645 650 655

Thr Leu Leu Met Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile Ser
660 665 670

Leu Met Cys Leu Ala Leu Gly Gly Val Leu Ile Phe Leu Ser Thr Ala
675 680 685

Val Ser Ala Asp Val Gly
690

<210> 4
<211> 693
<212> PRT
<213> prME, Зика штамм MR766

<400> 4

Met Ala Asp Thr Ser Ile Gly Ile Ile Gly Leu Leu Leu Thr Thr Ala
1 5 10 15

Met Ala Ala Glu Ile Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu
20 25 30

Asp Arg Ser Asp Ala Gly Lys Ala Ile Ser Phe Ala Thr Thr Leu Gly
35 40 45

Val Asn Lys Cys His Val Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp
50 55 60

Ala Thr Met Ser Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro
65 70 75 80

Asp Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr
85 90 95

Gly	Thr	Cys	His	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala
			100					105					110		
Val	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ser	Thr	Arg	Lys	Leu	Gln	Thr	Arg	Ser	Gln
		115					120					125			
Thr	Trp	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Tyr	Thr	Lys	His	Leu	Ile	Lys	Val	Glu
	130					135					140				
Asn	Trp	Ile	Phe	Arg	Asn	Pro	Gly	Phe	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Ile
145					150					155					160
Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Tyr	Leu	Val
				165					170					175	
Met	Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Ile	Arg	Cys	Ile	Gly	Val
		180						185					190		
Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly	Met	Ser	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	Asp
		195					200					205			
Val	Val	Leu	Glu	His	Gly	Gly	Cys	Val	Thr	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Lys
	210					215					220				
Pro	Thr	Val	Asp	Ile	Glu	Leu	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Asn	Met	Ala
225					230					235					240
Glu	Val	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Asp	Met	Ala	Ser
				245					250					255	
Asp	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu	Ala	Tyr	Leu	Asp	Lys	Gln	Ser
		260						265					270		
Asp	Thr	Gln	Tyr	Val	Cys	Lys	Arg	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly
		275					280					285			
Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Cys	Ala	Lys
	290					295					300				
Phe	Thr	Cys	Ser	Lys	Lys	Met	Thr	Gly	Lys	Ser	Ile	Gln	Pro	Glu	Asn
305					310					315					320
Leu	Glu	Tyr	Arg	Ile	Met	Leu	Ser	Val	His	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Gly
				325					330					335	
Met	Ile	Val	Asn	Asp	Thr	Gly	Tyr	Glu	Thr	Asp	Glu	Asn	Arg	Ala	Lys
			340					345					350		

Val	Glu	Val	Thr	Pro	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Glu	Ala	Thr	Leu	Gly	Gly	355	360	365	
Phe	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	370	375	380	
Ser	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Met	Asn	Asn	Lys	His	Trp	Leu	Val	His	385	390	395	400
Lys	Glu	Trp	Phe	His	Asp	Ile	Pro	Leu	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Ala	Asp	405	410	415	
Thr	Gly	Thr	Pro	His	Trp	Asn	Asn	Lys	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Phe	Lys	420	425	430	
Asp	Ala	His	Ala	Lys	Arg	Gln	Thr	Val	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	435	440	445	
Gly	Ala	Val	His	Thr	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Met	Asp	450	455	460	
Gly	Ala	Lys	Gly	Lys	Leu	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Leu	Lys	465	470	475	480
Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr	Ala	485	490	495	
Ala	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Glu	Thr	Leu	His	Gly	Thr	Val	500	505	510	
Thr	Val	Glu	Val	Gln	Tyr	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Ile	Pro	515	520	525	
Val	Gln	Met	Ala	Val	Asp	Met	Gln	Thr	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	530	535	540	
Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ser	Lys	Met	545	550	555	560
Met	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Ile	Gly	565	570	575	
Val	Gly	Asp	Lys	Lys	Ile	Thr	His	His	Trp	His	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	580	585	590	
Ile	Gly	Lys	Ala	Phe	Glu	Ala	Thr	Val	Arg	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Ala	595	600	605	

Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe
610 615 620

Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe Lys
625 630 635 640

Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly Thr
645 650 655

Leu Leu Val Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu
660 665 670

Thr Cys Leu Ala Leu Gly Gly Val Met Ile Phe Leu Ser Thr Ala Val
675 680 685

Ser Ala Asp Val Gly
690

<210> 5
<211> 10269
<212> ДНК
<213> Зика штамм MR766

<400> 5
atgaaaaacc caaagaagaa atccggagga ttccggattg tcaatatgct aaaacgcgga 60
gtagcccggtg taaaccacctt gggagggtttg aagagggtgc cagccggact tctgctgggt 120
catggacca tcagaatggt tttggcgata ctagcctttt tgagatttac agcaatcaag 180
ccatcactgg gccttatcaa cagatgggggt tccgtgggga aaaaagaggc tatggaaata 240
ataaagaagt tcaagaaaga tcttgctgcc atgttgagaa taatcaatgc taggaaagag 300
aggaagagac gtggcgcaga caccagcatc ggaatcattg gcctcctgct gactacagcc 360
atggcagcag agatcactag acgcgggagt gcatactaca tgtacttgga taggagcgat 420
gccgggaagg ccatttcgtt tgctaccaca ttgggagtga acaagtgcc cgtacagatc 480
atggacctcg ggcacatgtg tgacgccacc atgagttatg agtgccttat gctggatgag 540
ggagtggaac cagatgatgt cgattgctgg tgcaacacga catcaacttg ggttgtgtac 600
ggaacctgtc atcacaaaaa aggtgaggca cggcgatcta gaagagccgt gacgctccct 660
tctcactcta caaggaagtt gcaaacgcgg tcgcagacct ggtagaatc aagagaatac 720
acgaagcact tgatcaaggt tgaaaactgg atattcagga accccgggtt tgcgctagtg 780
gccgttgcca ttgcctggct tttgggaagc tcgacgagcc aaaaagtcac atacttggtc 840
atgatactgc tgattgcccc ggcatacagt atcagggtgca ttggagtcag caatagagac 900
ttcgtggagg gcatgtcagg tgggacctgg gttgatgttg tcttgaaca tggaggctgc 960
gttaccgtga tggcacagga caagccaaca gttgacatag agttgggtcac gacgacgggtt 1020

agtaacatgg	ccgaggttaag	atcctattgc	tacgaggcat	cgatatcgga	catggcttcg	1080
gacagtcgtt	gccaacaca	aggtgaagcc	taccttgaca	agcaatcaga	caactcaatat	1140
gtctgcaaaa	gaacattagt	ggacagaggt	tggggaaacg	gttgtggact	ttttggcaaa	1200
gggagcttgg	tgacatgtgc	caagtttacg	tgttctaaga	agatgaccgg	gaagagcatt	1260
caaccggaaa	atctggagta	tgggataatg	ctatcagtgc	atggctccca	gcatagcggg	1320
atgattgtca	atgatacagg	atatgaaact	gacgaaaata	gagcgaaagt	cgagggttacg	1380
cctaattcac	caagagcggg	agcaaccttg	ggaggctttg	gaagcttagg	acttgactgt	1440
gaaccaagga	caggccttga	cttttcagat	ctgtattacc	tgaccatgaa	caataagcat	1500
tggttggtgc	acaaagagtg	gtttcatgac	atcccattgc	cttggcatgc	tggggcagac	1560
accggaactc	cacactggaa	caacaaagag	gcattggtag	aattcaagga	tgcccacgcc	1620
aagaggcaaa	ccgtcgtcgt	tctggggagc	caggaaggag	ccgttcacac	ggctctcgtc	1680
ggagctctag	aggctgagat	ggatggtgca	aagggaaagc	tgttctcttg	ccatttgaaa	1740
tgccgcctaa	aaatggacaa	gcttagattg	aagggcgtgt	catattcctt	gtgcaactgcg	1800
gcattcacat	tcaccaaggt	cccagctgaa	acactgcatg	gaacagtcac	agtggagggtg	1860
cagtatgcag	ggacagatgg	accctgcaag	atcccagtc	agatggcggt	ggacatgcag	1920
accctgaccc	cagttggaag	gctgataacc	gccaaacccg	tgattactga	aagcactgag	1980
aactcaaaga	tgatgttggg	gcttgacca	ccatttgggg	attcttacat	tgtcatagga	2040
gttggggaca	agaaaatcac	ccaccactgg	cataggagtg	gtagcaccat	cggaaaggca	2100
tttgaggcca	ctgtgagagg	cgccaagaga	atggcagtc	tgggggatac	agcctgggac	2160
ttcggatcag	tcgggggtgt	gttcaactca	ctgggtaagg	gcattcacca	gatttttggg	2220
gcagccttca	aatcactgtt	tggaggaatg	tcttggttct	cacagatcct	cataggcacg	2280
ctgctagtgt	ggttaggttt	gaacacaaag	aatggatcta	tctccctcac	atgcttggcc	2340
ctgggggggag	tgatgatctt	cctctccacg	gctgtttctg	ctgacgtggg	gtgctcagtg	2400
gacttctcaa	aaaaggaaac	gagatgtggc	acgggggtat	tcattctataa	tgatgttgaa	2460
gcctggaggg	accggtacaa	gtaccatcct	gactcccccc	gcagattggc	agcagcagtc	2520
aagcaggcct	gggaagaggg	gatctgtggg	atctcatccg	tttcaagaat	ggaaaacatc	2580
atgtggaaat	cagtagaagg	ggagctcaat	gctatcctag	aggagaatgg	agttcaactg	2640
acagttgttg	tgggatctgt	aaaaaacccc	atgtggagag	gtccacaaag	attgccagtg	2700
cctgtgaatg	agctgcccc	tggctggaaa	gcctggggga	aatcgtattt	tgttagggcg	2760
gcaaagacca	acaacagttt	tgttgctgac	ggtgacacac	tgaaggaatg	tccgcttgag	2820
cacagagcat	ggaatagttt	tcttggtggg	gatcacgggt	ttggagtctt	ccacaccagt	2880
gtctggctta	aggtcagaga	agattactca	ttagaatgtg	accagccgt	cataggaaca	2940

gctgttaagg	gaagggaggc	cgcgcacagt	gatctgggct	attggattga	aagtgaaaag	3000
aatgacacat	ggaggctgaa	gagggcccac	ctgattgaga	tgaaaacatg	tgaatggcca	3060
aagtctcaca	cattgtggac	agatggagta	gaagaaagtg	atcttatcat	acccaagtct	3120
ttagctggtc	cactcagcca	ccacaacacc	agagaggggt	acagaaccca	agtgaaaggg	3180
ccatggcaca	gtgaagagct	tgaaatccgg	tttgaggaat	gtccaggcac	caaggtttac	3240
gtggaggaga	catgcggaac	tagaggacca	tctctgagat	caactactgc	aagtggaagg	3300
gtcattgagg	aatggtgctg	tagggaatgc	acaatgcccc	cactatcggt	tcgagcaaaa	3360
gacggctgct	ggtatggaat	ggagataagg	cccaggaaag	aaccagagag	caacttagtg	3420
aggtcaatgg	tgacagcggg	gtcaaccgat	catatggacc	acttctctct	tggagtgcct	3480
gtgattctac	tcatggtgca	ggagggggtg	aagaagagaa	tgaccacaaa	gatcatcatg	3540
agcacatcaa	tggcagtgct	ggtagtcatg	atcttggggag	gattttcaat	gagtgcctg	3600
gccaagcttg	tgatcctgat	gggtgctact	ttcgcagaaa	tgaacactgg	aggagatgta	3660
gctcacttgg	cattggtagc	ggcatttaaa	gtcagaccag	ccttgctggg	ctccttcatt	3720
ttcagagcca	attggacacc	ccgtgagagc	atgctgctag	ccctggcttc	gtgtcttctg	3780
caaactgcga	tctctgctct	tgaaggtgac	ttgatgggtc	tcattaatgg	atttgctttg	3840
gcctggttgg	caattcgagc	aatggccgtg	ccacgcactg	acaacatcgc	tctaccaatc	3900
ttggctgctc	taacaccact	agctcgaggc	acactgctcg	tggcatggag	agcgggcctg	3960
gctacttgtg	gagggatcat	gctcctctcc	ctgaaagggg	aaggtagtgt	gaagaagaac	4020
ctgccatttg	tcatggccct	gggattgaca	gctgtgaggg	tagtagacct	tattaatgtg	4080
gtaggactac	tgttactcac	aaggagtggg	aagcggagct	ggccccctag	tgaagttctc	4140
acagccgttg	gcctgatatg	tgcactggcc	ggagggtttg	ccaaggcaga	cattgagatg	4200
gctggacca	tggtgcagt	aggcttgcta	attgtcagct	atgtggtctc	gggaaagagt	4260
gtggacatgt	acattgaaag	agcaggtgac	atcacatggg	aaaaggacgc	ggaagtcact	4320
ggaaacagtc	ctcggcttga	cgtggcactg	gatgagagtg	gtgatttctc	cttggtagag	4380
gaagatggtc	cacccatgag	agagatcata	ctcaagggtg	tcctgatggc	catctgtggc	4440
atgaacccaa	tagctatacc	ttttgctgca	ggagcgtggg	atgtgtatgt	gaagactggg	4500
aaaaggagtg	gcgccctctg	ggacgtgcct	gtcccaaag	aagtgaagaa	aggagagacc	4560
acagatggag	tgtacagagt	gatgactcgc	agactgctag	gttcaacaca	ggttggagtg	4620
ggagtcatgc	aagagggagt	cttccacacc	atgtggcacg	ttacaaaagg	agccgcactg	4680
aggagcggtg	agggaagact	tgatccatac	tggggggatg	tcaagcagga	cttggtgtca	4740
tactgtgggc	cttggaagtt	ggatgcagct	tgggatggac	tcagcgaggt	acagcttttg	4800
gccgtacctc	ccggagagag	ggccagaaac	attcagaccc	tgcttgggaat	attcaagaca	4860

aaggacgggg	acatcggagc	agttgctctg	gactaccctg	cagggacctc	aggatctccg	4920
atcctagaca	aatgtggaag	agtgatagga	ctctatggca	atggggttgt	gatcaagaat	4980
ggaagctatg	ttagtgctat	aaccagggga	aagagggagg	aggagactcc	ggttgaatgt	5040
ttcgaaccct	cgatgctgaa	gaagaagcag	ctaactgtct	tggatctgca	tccaggagcc	5100
ggaaaaacca	ggagagttct	tcctgaaata	gtccgtgaag	ccataaaaaa	gagactccgg	5160
acagtgatct	tggcaccaac	tagggttgtc	gctgctgaga	tggaggaggc	cttgagagga	5220
cttccggtgc	gttacatgac	aacagcagtc	aacgtcacc	attctggggac	agaaatcggt	5280
gatttgatgt	gccatgccac	tttcaacttca	cgcttactac	aacccatcag	agtcacctaat	5340
tacaatctct	acatcatgga	tgaagcccac	ttcacagacc	cctcaagtat	agctgcaaga	5400
ggatacatat	caacaagggg	tgaaatgggc	gaggcggctg	ccatTTTTat	gactgccaca	5460
ccaccaggaa	cccgtgatgc	gtttcctgac	tctaactcac	caatcatgga	cacagaagtg	5520
gaagtcccag	agagagcctg	gagctcaggc	tttgattggg	tgacagacca	ttctgggaaa	5580
acagtttggg	tcgttccaag	cgtgagaaac	ggaaatgaaa	tcgcagcctg	tctgacaaag	5640
gctggaaagc	gggtcataca	gctcagcagg	aagacttttg	agacagaatt	tcagaaaaca	5700
aaaaatcaag	agtgggactt	tgtcataaca	actgacatct	cagagatggg	cgccaacttc	5760
aaggctgacc	gggtcataga	ctctaggaga	tgccataaac	cagtcatact	tgatgggtgag	5820
agagtcatct	tggctggggc	catgcctgtc	acgcatgcta	gtgctgctca	gaggagagga	5880
cgtataggca	ggaaccctaa	caaacctgga	gatgagtaca	tgtatggagg	tgggtgtgca	5940
gagactgatg	aaggccatgc	acactggctt	gaagcaagaa	tgcttcttga	caacatctac	6000
ctccaggatg	gcctcatagc	ctcgctctat	cggcctgagg	ccgataaggt	agccgccatt	6060
gaggagagat	ttaagctgag	gacagagcaa	aggaagacct	tcgtggaact	catgaagaga	6120
ggagaccttc	ccgtctggct	agcctatcag	gttgcatctg	ccggaataac	ttacacagac	6180
agaagatggg	gctttgatgg	cacaaccaac	aacaccataa	tggaagacag	cgtaccagca	6240
gaggtgtgga	caaagtatgg	agagaagaga	gtgctcaaac	cgagatggat	ggatgctagg	6300
gtctgttcag	accatgcggc	cctgaagtcg	ttcaaagaat	tcgccgctgg	aaaaagagga	6360
gcggttttgg	gagtaatgga	ggccctggga	acactgccag	gacacatgac	agagaggttt	6420
caggaagcca	ttgacaacct	cgccgtgctc	atgcgagcag	agactggaag	caggccttat	6480
aaggcagcgg	cagcccaact	gccggagacc	ctagagacca	ttatgctctt	aggtttgctg	6540
ggaacagttt	cactggggat	cttcttcgtc	ttgatgcgga	ataagggcat	cgggaagatg	6600
ggctttggaa	tggttaaccct	tggggccagt	gcatggctca	tgtggctttc	ggaaattgaa	6660
ccagccagaa	ttgcatgtgt	cctcattgtt	gtgtttttat	tactggtggg	gctcataccc	6720
gagccagaga	agcaaagatc	tccccaagat	aaccagatgg	caattatcat	catggtggca	6780

gtgggccttc	taggtttgat	aactgcaaac	gaacttggat	ggctggaaag	aacaaaaaat	6840
gacatagctc	atctaattggg	aaggagagaa	gaaggagcaa	ccatgggatt	ctcaatggac	6900
attgatctgc	ggccagcctc	cgcttgggct	atctatgccg	cattgacaac	tctcatcacc	6960
ccagctgtcc	aacatgcggt	aaccacttca	tacaacaact	actccttaat	ggcgatggcc	7020
acacaagctg	gagtgtctgtt	tggcatgggc	aaagggatgc	catttttatgc	atgggacctt	7080
ggagtcccg	tgctaattgat	gggttgctat	tcacaattaa	cacccttgac	tctgatagta	7140
gctatcattc	tgcttgtggc	gcactacatg	tacttgatcc	caggcctaca	agcggcagca	7200
gcgcgtgctg	cccagaaaag	gacagcagct	ggcatcatga	agaatcccgt	tgtggatgga	7260
atagtggtaa	ctgacattga	cacaatgaca	atagaccccc	aggtggagaa	gaagatggga	7320
caagtgttac	tcatagcagt	agccatctcc	agtgtgtg	tgctgaggac	cgcttgggga	7380
tggggggagg	ctggagctct	gatcacagca	gcgacctcca	ccttgtggga	aggctctcca	7440
aacaaatact	ggaactcctc	tacagccacc	tactgtgca	acatcttcag	aggaagctat	7500
ctggcaggag	cttcccttat	ctatacagt	acgagaaacg	ctggcctggt	taagagacgt	7560
ggaggtggga	cgggagagac	tctgggagag	aagtggaaag	ctcgtctgaa	tcagatgtcg	7620
gccctggagt	tctactctta	taaaaagtca	ggtatcactg	aagtgtgtag	agaggaggct	7680
cgccgtgccc	tcaaggatgg	agtggccaca	ggaggacatg	ccgtatccc	gggaagtgca	7740
aagctcagat	ggttgggtga	gagaggatat	ctgcagccct	atgggaagg	tgttgacctc	7800
ggatgtggca	gagggggctg	gagctattat	gccgccacca	tccgcaaagt	gcaggagggtg	7860
agaggataca	caaaggagg	tcccggtc	gaagaacca	tgctggtgca	aagctatggg	7920
tggaacatag	ttcgtctcaa	gagtggagt	gacgtcttcc	acatggcggc	tgagccgtgt	7980
gacactctgc	tgtgtgacat	aggtgagtca	tcatctagtc	ctgaagtgga	agagacacga	8040
acactcagag	tgctctctat	ggtgggggac	tggcttgaaa	aaagaccagg	ggccttctgt	8100
ataaagggtg	tgtgcccata	caccagcact	atgatggaaa	ccatggagcg	actgcaacgt	8160
aggcatgggg	gaggattagt	cagagtgcc	ttgtctcgca	actccacaca	tgagatgtac	8220
tgggtctctg	gggcaaagag	caacatcata	aaaagtgtgt	ccaccacaag	tcagctcctc	8280
ctgggacgca	tggatggccc	caggaggcca	gtgaaatatg	aggaggatgt	gaacctcggc	8340
tcgggtacac	gagctgtggc	aagctgtgct	gaggctccta	acatgaaaat	catcggcagg	8400
cgcattgaga	gaatccgcaa	tgaacatgca	gaaacatggt	ttcttgatga	aaaccacca	8460
tacaggacat	gggcctacca	tgggagctac	gaagccccca	cgcaaggatc	agcgtcttcc	8520
ctcgtgaacg	gggttggttag	actcctgtca	aagccttggg	acgtggtgac	tggagttaca	8580
ggaatagcca	tgactgacac	cacaccatac	ggccaacaaa	gagtcttcaa	agaaaaagtg	8640
gacaccaggg	tgccagatcc	ccaagaaggc	actcgccagg	taatgaacat	agtctcttcc	8700

tggctgtgga aggagctggg gaaacgcaag cggccacgcg tctgcaccaa agaagagttt	8760
atcaacaagg tgcgcagcaa tgcagcactg ggagcaatat ttgaagagga aaaagaatgg	8820
aagacggctg tggaagctgt gaatgatcca aggttttggg ccctagtgga tagggagaga	8880
gaacaccacc tgagaggaga gtgtcacagc tgttgtgtaca acatgatggg aaaaagagaa	8940
aagaagcaag gagagttcgg gaaagcaaaa ggtagccgcg ccatctggta catgtggttg	9000
ggagccagat tcttggagtt tgaagccctt ggattcttga acgaggacca ttggatggga	9060
agagaaaact caggaggtgg agtcgaaggg ttaggattgc aaagacttgg atacattcta	9120
gaagaaatga atcgggcacc aggaggaaaag atgtacgcag atgacactgc tggctgggac	9180
acccgcatta gtaagtttga tctggagaat gaagctctga ttaccaacca aatggaggaa	9240
gggcacagaa ctctggcggt ggccgtgatt aaatacacat accaaaacaa agtggatgaag	9300
gttctcagac cagctgaagg aggaaaaaca gttatggaca tcatttcaag acaagaccag	9360
agagggagtg gacaagttgt cacttatgct ctcaacacat tcaccaactt ggtggtgcag	9420
cttatccgga acatggaagc tgaggaagtg ttagagatgc aagacttatg gttgttgagg	9480
aagccagaga aagtgaccag atggttgagc agcaatggat gggatagact caaacgaatg	9540
gcggtcagtg gagatgactg cgttgtgaag ccaatcgatg ataggtttgc acatgccctc	9600
aggttcttga atgacatggg aaaagttagg aaagacacac aggagtggaa accctcgact	9660
ggatggagca attgggaaga agtcccgttc tgctcccacc acttcaacaa gctgtacctc	9720
aaggatggga gatccattgt ggtcccttgc cgccaccaag atgaactgat tggccgagct	9780
cgcgtctcac caggggcagg atggagcatc cgggagactg cctgtcttgc aaaatcatat	9840
gcgcagatgt ggcagctcct ttatttccac agaagagacc ttcgactgat ggctaatgcc	9900
atttgctcgg ctgtgccagt tgactgggta ccaactggga gaaccacctg gtcaatccat	9960
ggaaagggag aatggatgac cactgaggac atgctcatgg tgtggaatag agtgtggatt	10020
gaggagaacg accatatgga ggacaagact cctgtaacaa aatggacaga cattccctat	10080
ctaggaaaaa gggaggactt atggtgtgga tcccttatag ggcacagacc ccgcaccact	10140
tgggctgaaa acatcaaaga cacagtcaac atggtgcgca ggatcatagg tgatgaagaa	10200
aagtacatgg actatctatc cacccaagtc cgctacttgg gtgaggaagg gtccacaccc	10260
ggagtgttg	10269

<210> 6

<211> 3423

<212> PRT

<213> ПОЛНЫЙ ORF, Зика штамм MR766

<400> 6

Met Lys Asn Pro Lys Lys Lys Ser Gly Gly Phe Arg Ile Val Asn Met

1		5		10		15													
Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Ala	Arg	Val	Asn	Pro	Leu	Gly	Gly	Leu	Lys	Arg				
			20					25					30						
Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	His	Gly	Pro	Ile	Arg	Met	Val	Leu				
		35					40					45							
Ala	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Phe	Thr	Ala	Ile	Lys	Pro	Ser	Leu	Gly				
	50					55					60								
Leu	Ile	Asn	Arg	Trp	Gly	Ser	Val	Gly	Lys	Lys	Glu	Ala	Met	Glu	Ile				
65					70					75					80				
Ile	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn				
				85					90					95					
Ala	Arg	Lys	Glu	Arg	Lys	Arg	Arg	Gly	Ala	Asp	Thr	Ser	Ile	Gly	Ile				
			100					105						110					
Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Ala	Met	Ala	Ala	Glu	Ile	Thr	Arg	Arg				
		115					120						125						
Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Leu	Asp	Arg	Ser	Asp	Ala	Gly	Lys	Ala				
	130					135					140								
Ile	Ser	Phe	Ala	Thr	Thr	Leu	Gly	Val	Asn	Lys	Cys	His	Val	Gln	Ile				
145					150					155					160				
Met	Asp	Leu	Gly	His	Met	Cys	Asp	Ala	Thr	Met	Ser	Tyr	Glu	Cys	Pro				
				165					170					175					
Met	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Glu	Pro	Asp	Asp	Val	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn				
			180					185					190						
Thr	Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Val	Tyr	Gly	Thr	Cys	His	His	Lys	Lys	Gly				
		195					200						205						
Glu	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala	Val	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ser	Thr				
	210					215					220								
Arg	Lys	Leu	Gln	Thr	Arg	Ser	Gln	Thr	Trp	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Tyr				
225					230					235					240				
Thr	Lys	His	Leu	Ile	Lys	Val	Glu	Asn	Trp	Ile	Phe	Arg	Asn	Pro	Gly				
				245					250					255					
Phe	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Ile	Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Thr				

260

265

270

Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu Val Met Ile Leu Leu Ile Ala Pro Ala
 275 280 285

Tyr Ser Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly
 290 295 300

Met Ser Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys
 305 310 315 320

Val Thr Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr Val Asp Ile Glu Leu Val
 325 330 335

Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu
 340 345 350

Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly
 355 360 365

Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg
 370 375 380

Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Ser Lys Lys Met Thr
 405 410 415

Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser
 420 425 430

Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr Gly Tyr
 435 440 445

Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Val Thr Pro Asn Ser Pro
 450 455 460

Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys
 465 470 475 480

Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met
 485 490 495

Asn Asn Lys His Trp Leu Val His Lys Glu Trp Phe His Asp Ile Pro
 500 505 510

Leu Pro Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly Thr Pro His Trp Asn Asn

515

520

525

Lys Glu Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala His Ala Lys Arg Gln Thr
 530 535 540

Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Val His Thr Ala Leu Ala
 545 550 555 560

Gly Ala Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala Lys Gly Lys Leu Phe Ser
 565 570 575

Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly
 580 585 590

Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Val Pro
 595 600 605

Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly
 610 615 620

Thr Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Val Gln Met Ala Val Asp Met Gln
 625 630 635 640

Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr
 645 650 655

Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe
 660 665 670

Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Lys Lys Ile Thr His
 675 680 685

His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr
 690 695 700

Val Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp
 705 710 715 720

Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His
 725 730 735

Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp
 740 745 750

Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly Thr Leu Leu Val Trp Leu Gly Leu Asn
 755 760 765

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

770

775

780

Met Ile Phe Leu Ser Thr Ala Val Ser Ala Asp Val Gly Cys Ser Val
 785 790 795 800

Asp Phe Ser Lys Lys Glu Thr Arg Cys Gly Thr Gly Val Phe Ile Tyr
 805 810 815

Asn Asp Val Glu Ala Trp Arg Asp Arg Tyr Lys Tyr His Pro Asp Ser
 820 825 830

Pro Arg Arg Leu Ala Ala Ala Val Lys Gln Ala Trp Glu Glu Gly Ile
 835 840 845

Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met Glu Asn Ile Met Trp Lys Ser
 850 855 860

Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu Glu Asn Gly Val Gln Leu
 865 870 875 880

Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro Met Trp Arg Gly Pro Gln
 885 890 895

Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro His Gly Trp Lys Ala Trp
 900 905 910

Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys Thr Asn Asn Ser Phe Val
 915 920 925

Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro Leu Glu His Arg Ala Trp
 930 935 940

Asn Ser Phe Leu Val Glu Asp His Gly Phe Gly Val Phe His Thr Ser
 945 950 955 960

Val Trp Leu Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser Leu Glu Cys Asp Pro Ala
 965 970 975

Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Arg Glu Ala Ala His Ser Asp Leu
 980 985 990

Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp Arg Leu Lys Arg
 995 1000 1005

Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu Trp Pro Lys Ser His
 1010 1015 1020

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

1025						1030						1035			
Lys	Ser	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	Ser	His	His	Asn	Thr	Arg	Glu	Gly	
1040						1045					1050				
Tyr	Arg	Thr	Gln	Val	Lys	Gly	Pro	Trp	His	Ser	Glu	Glu	Leu	Glu	
1055						1060					1065				
Ile	Arg	Phe	Glu	Glu	Cys	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	
1070						1075					1080				
Thr	Cys	Gly	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser	
1085						1090					1095				
Gly	Arg	Val	Ile	Glu	Glu	Trp	Cys	Cys	Arg	Glu	Cys	Thr	Met	Pro	
1100						1105					1110				
Pro	Leu	Ser	Phe	Arg	Ala	Lys	Asp	Gly	Cys	Trp	Tyr	Gly	Met	Glu	
1115						1120					1125				
Ile	Arg	Pro	Arg	Lys	Glu	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Met	
1130						1135					1140				
Val	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	His	Met	Asp	His	Phe	Ser	Leu	Gly	
1145						1150					1155				
Val	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Met	Val	Gln	Glu	Gly	Leu	Lys	Lys	Arg	
1160						1165					1170				
Met	Thr	Thr	Lys	Ile	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val	
1175						1180					1185				
Val	Met	Ile	Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Met	Ser	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	
1190						1195					1200				
Val	Ile	Leu	Met	Gly	Ala	Thr	Phe	Ala	Glu	Met	Asn	Thr	Gly	Gly	
1205						1210					1215				
Asp	Val	Ala	His	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Pro	
1220						1225					1230				
Ala	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	Ile	Phe	Arg	Ala	Asn	Trp	Thr	Pro	Arg	
1235						1240					1245				
Glu	Ser	Met	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	
1250						1255					1260				
Ile	Ser	Ala	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Met	Val	Leu	Ile	Asn	Gly	Phe	

1265						1270						1275			
Ala	Leu	Ala	Trp	Leu	Ala	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Pro	Arg	Thr	
1280						1285					1290				
Asp	Asn	Ile	Ala	Leu	Pro	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ala	
1295						1300					1305				
Arg	Gly	Thr	Leu	Leu	Val	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Cys	
1310						1315					1320				
Gly	Gly	Ile	Met	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Lys	
1325						1330					1335				
Lys	Asn	Leu	Pro	Phe	Val	Met	Ala	Leu	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Arg	
1340						1345					1350				
Val	Val	Asp	Pro	Ile	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	
1355						1360					1365				
Ser	Gly	Lys	Arg	Ser	Trp	Pro	Pro	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Ala	Val	
1370						1375					1380				
Gly	Leu	Ile	Cys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Lys	Ala	Asp	Ile	
1385						1390					1395				
Glu	Met	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Val	Ser	
1400						1405					1410				
Tyr	Val	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Asp	Met	Tyr	Ile	Glu	Arg	Ala	
1415						1420					1425				
Gly	Asp	Ile	Thr	Trp	Glu	Lys	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	
1430						1435					1440				
Pro	Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	
1445						1450					1455				
Val	Glu	Glu	Asp	Gly	Pro	Pro	Met	Arg	Glu	Ile	Ile	Leu	Lys	Val	
1460						1465					1470				
Val	Leu	Met	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Asn	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Phe	
1475						1480					1485				
Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Tyr	Val	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser	
1490						1495					1500				
Gly	Ala	Leu	Trp	Asp	Val	Pro	Ala	Pro	Lys	Glu	Val	Lys	Lys	Gly	

	1505					1510					1515				
Glu	Thr	Thr	Asp	Gly	Val	Tyr	Arg	Val	Met	Thr	Arg	Arg	Leu	Leu	
	1520					1525					1530				
Gly	Ser	Thr	Gln	Val	Gly	Val	Gly	Val	Met	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	
	1535					1540					1545				
His	Thr	Met	Trp	His	Val	Thr	Lys	Gly	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Gly	
	1550					1555					1560				
Glu	Gly	Arg	Leu	Asp	Pro	Tyr	Trp	Gly	Asp	Val	Lys	Gln	Asp	Leu	
	1565					1570					1575				
Val	Ser	Tyr	Cys	Gly	Pro	Trp	Lys	Leu	Asp	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	
	1580					1585					1590				
Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	
	1595					1600					1605				
Arg	Asn	Ile	Gln	Thr	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Lys	Thr	Lys	Asp	Gly	
	1610					1615					1620				
Asp	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Asp	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Gly	
	1625					1630					1635				
Ser	Pro	Ile	Leu	Asp	Lys	Cys	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Leu	Tyr	Gly	
	1640					1645					1650				
Asn	Gly	Val	Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Ser	Tyr	Val	Ser	Ala	Ile	Thr	
	1655					1660					1665				
Gln	Gly	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Thr	Pro	Val	Glu	Cys	Phe	Glu	Pro	
	1670					1675					1680				
Ser	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	His	Pro	
	1685					1690					1695				
Gly	Ala	Gly	Lys	Thr	Arg	Arg	Val	Leu	Pro	Glu	Ile	Val	Arg	Glu	
	1700					1705					1710				
Ala	Ile	Lys	Lys	Arg	Leu	Arg	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	Pro	Thr	Arg	
	1715					1720					1725				
Val	Val	Ala	Ala	Glu	Met	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Pro	Val	
	1730					1735					1740				
Arg	Tyr	Met	Thr	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Thr	His	Ser	Gly	Thr	Glu	

1745														
Ile Val	Asp Leu	Met Cys	His	Ala Thr	Phe Thr	Ser	Arg Leu	Leu						
1760			1765			1770								
Gln Pro	Ile Arg	Val Pro	Asn	Tyr Asn	Leu Tyr	Ile	Met Asp	Glu						
1775			1780			1785								
Ala His	Phe Thr	Asp Pro	Ser	Ser Ile	Ala Ala	Arg	Gly Tyr	Ile						
1790			1795			1800								
Ser Thr	Arg Val	Glu Met	Gly	Glu Ala	Ala Ala	Ile	Phe Met	Thr						
1805			1810			1815								
Ala Thr	Pro Pro	Gly Thr	Arg	Asp Ala	Phe Pro	Asp	Ser Asn	Ser						
1820			1825			1830								
Pro Ile	Met Asp	Thr Glu	Val	Glu Val	Pro Glu	Arg	Ala Trp	Ser						
1835			1840			1845								
Ser Gly	Phe Asp	Trp Val	Thr	Asp His	Ser Gly	Lys	Thr Val	Trp						
1850			1855			1860								
Phe Val	Pro Ser	Val Arg	Asn	Gly Asn	Glu Ile	Ala	Ala Cys	Leu						
1865			1870			1875								
Thr Lys	Ala Gly	Lys Arg	Val	Ile Gln	Leu Ser	Arg	Lys Thr	Phe						
1880			1885			1890								
Glu Thr	Glu Phe	Gln Lys	Thr	Lys Asn	Gln Glu	Trp	Asp Phe	Val						
1895			1900			1905								
Ile Thr	Thr Asp	Ile Ser	Glu	Met Gly	Ala Asn	Phe	Lys Ala	Asp						
1910			1915			1920								
Arg Val	Ile Asp	Ser Arg	Arg	Cys Leu	Lys Pro	Val	Ile Leu	Asp						
1925			1930			1935								
Gly Glu	Arg Val	Ile Leu	Ala	Gly Pro	Met Pro	Val	Thr His	Ala						
1940			1945			1950								
Ser Ala	Ala Gln	Arg Arg	Gly	Arg Ile	Gly Arg	Asn	Pro Asn	Lys						
1955			1960			1965								
Pro Gly	Asp Glu	Tyr Met	Tyr	Gly Gly	Gly Cys	Ala	Glu Thr	Asp						
1970			1975			1980								
Glu Gly	His Ala	His Trp	Leu	Glu Ala	Arg Met	Leu	Leu Asp	Asn						

1985						1990						1995					
Ile	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Tyr	Arg	Pro	Glu			
2000						2005						2010					
Ala	Asp	Lys	Val	Ala	Ala	Ile	Glu	Gly	Glu	Phe	Lys	Leu	Arg	Thr			
2015						2020						2025					
Glu	Gln	Arg	Lys	Thr	Phe	Val	Glu	Leu	Met	Lys	Arg	Gly	Asp	Leu			
2030						2035						2040					
Pro	Val	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr	Tyr			
2045						2050						2055					
Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Cys	Phe	Asp	Gly	Thr	Thr	Asn	Asn	Thr	Ile			
2060						2065						2070					
Met	Glu	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Glu	Val	Trp	Thr	Lys	Tyr	Gly	Glu			
2075						2080						2085					
Lys	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Arg	Trp	Met	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser			
2090						2095						2100					
Asp	His	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Phe	Lys	Glu	Phe	Ala	Ala	Gly	Lys			
2105						2110						2115					
Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Met	Glu	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro			
2120						2125						2130					
Gly	His	Met	Thr	Glu	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Ala			
2135						2140						2145					
Val	Leu	Met	Arg	Ala	Glu	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Tyr	Lys	Ala	Ala			
2150						2155						2160					
Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Leu	Gly			
2165						2170						2175					
Leu	Leu	Gly	Thr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Val	Leu	Met	Arg			
2180						2185						2190					
Asn	Lys	Gly	Ile	Gly	Lys	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Val	Thr	Leu	Gly			
2195						2200						2205					
Ala	Ser	Ala	Trp	Leu	Met	Trp	Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Pro	Ala	Arg			
2210						2215						2220					
Ile	Ala	Cys	Val	Leu	Ile	Val	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Leu			

2225							2230									2235
Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Ser	Pro	Gln	Asp	Asn	Gln	Met		
	2240						2245					2250				
Ala	Ile	Ile	Ile	Met	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr		
	2255						2260					2265				
Ala	Asn	Glu	Leu	Gly	Trp	Leu	Glu	Arg	Thr	Lys	Asn	Asp	Ile	Ala		
	2270						2275					2280				
His	Leu	Met	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Met	Gly	Phe	Ser		
	2285						2290					2295				
Met	Asp	Ile	Asp	Leu	Arg	Pro	Ala	Ser	Ala	Trp	Ala	Ile	Tyr	Ala		
	2300						2305					2310				
Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Val	Gln	His	Ala	Val	Thr		
	2315						2320					2325				
Thr	Ser	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ser	Leu	Met	Ala	Met	Ala	Thr	Gln	Ala		
	2330						2335					2340				
Gly	Val	Leu	Phe	Gly	Met	Gly	Lys	Gly	Met	Pro	Phe	Tyr	Ala	Trp		
	2345						2350					2355				
Asp	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Met	Met	Gly	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu		
	2360						2365					2370				
Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	His		
	2375						2380					2385				
Tyr	Met	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala		
	2390						2395					2400				
Ala	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Met	Lys	Asn	Pro	Val	Val		
	2405						2410					2415				
Asp	Gly	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Ile	Asp	Thr	Met	Thr	Ile	Asp	Pro		
	2420						2425					2430				
Gln	Val	Glu	Lys	Lys	Met	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Ile	Ala	Val	Ala		
	2435						2440					2445				
Ile	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Ala	Trp	Gly	Trp	Gly	Glu		
	2450						2455					2460				
Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	Trp	Glu	Gly		

2465							2470								2475
Ser	Pro	Asn	Lys	Tyr	Trp	Asn	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Cys	
	2480					2485					2490				
Asn	Ile	Phe	Arg	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr	
	2495					2500					2505				
Thr	Val	Thr	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly	
	2510					2515					2520				
Thr	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Lys	Trp	Lys	Ala	Arg	Leu	Asn	Gln	
	2525					2530					2535				
Met	Ser	Ala	Leu	Glu	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Lys	Lys	Ser	Gly	Ile	Thr	
	2540					2545					2550				
Glu	Val	Cys	Arg	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	
	2555					2560					2565				
Ala	Thr	Gly	Gly	His	Ala	Val	Ser	Arg	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg	
	2570					2575					2580				
Trp	Leu	Val	Glu	Arg	Gly	Tyr	Leu	Gln	Pro	Tyr	Gly	Lys	Val	Val	
	2585					2590					2595				
Asp	Leu	Gly	Cys	Gly	Arg	Gly	Gly	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Thr	
	2600					2605					2610				
Ile	Arg	Lys	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Gly	Tyr	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	
	2615					2620					2625				
Gly	His	Glu	Glu	Pro	Met	Leu	Val	Gln	Ser	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ile	
	2630					2635					2640				
Val	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Val	Asp	Val	Phe	His	Met	Ala	Ala	Glu	
	2645					2650					2655				
Pro	Cys	Asp	Thr	Leu	Leu	Cys	Asp	Ile	Gly	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	
	2660					2665					2670				
Pro	Glu	Val	Glu	Glu	Thr	Arg	Thr	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Met	Val	
	2675					2680					2685				
Gly	Asp	Trp	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Phe	Cys	Ile	Lys	Val	
	2690					2695					2700				
Leu	Cys	Pro	Tyr	Thr	Ser	Thr	Met	Met	Glu	Thr	Met	Glu	Arg	Leu	

2705							2710					2715			
Gln	Arg	Arg	His	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Arg	Val	Pro	Leu	Ser	Arg	
2720						2725					2730				
Asn	Ser	Thr	His	Glu	Met	Tyr	Trp	Val	Ser	Gly	Ala	Lys	Ser	Asn	
2735						2740					2745				
Ile	Ile	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg	
2750						2755					2760				
Met	Asp	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asp	Val	Asn	
2765						2770					2775				
Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Ser	Cys	Ala	Glu	Ala	Pro	
2780						2785					2790				
Asn	Met	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Arg	Ile	Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Glu	
2795						2800					2805				
His	Ala	Glu	Thr	Trp	Phe	Leu	Asp	Glu	Asn	His	Pro	Tyr	Arg	Thr	
2810						2815					2820				
Trp	Ala	Tyr	His	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ala	Pro	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala	
2825						2830					2835				
Ser	Ser	Leu	Val	Asn	Gly	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Ser	Lys	Pro	Trp	
2840						2845					2850				
Asp	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Thr	Asp	Thr	Thr	
2855						2860					2865				
Pro	Tyr	Gly	Gln	Gln	Arg	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg	
2870						2875					2880				
Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Glu	Gly	Thr	Arg	Gln	Val	Met	Asn	Ile	Val	
2885						2890					2895				
Ser	Ser	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Pro	Arg	
2900						2905					2910				
Val	Cys	Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Ile	Asn	Lys	Val	Arg	Ser	Asn	Ala	
2915						2920					2925				
Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu	Glu	Lys	Glu	Trp	Lys	Thr	Ala	
2930						2935					2940				
Val	Glu	Ala	Val	Asn	Asp	Pro	Arg	Phe	Trp	Ala	Leu	Val	Asp	Arg	

	2945					2950					2955				
Glu	Arg	Glu	His	His	Leu	Arg	Gly	Glu	Cys	His	Ser	Cys	Val	Tyr	
	2960					2965					2970				
Asn	Met	Met	Gly	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Gln	Gly	Glu	Phe	Gly	Lys	
	2975					2980					2985				
Ala	Lys	Gly	Ser	Arg	Ala	Ile	Trp	Tyr	Met	Trp	Leu	Gly	Ala	Arg	
	2990					2995					3000				
Phe	Leu	Glu	Phe	Glu	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Asn	Glu	Asp	His	Trp	
	3005					3010					3015				
Met	Gly	Arg	Glu	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Gly	Leu	
	3020					3025					3030				
Gln	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ile	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Arg	Ala	Pro	Gly	
	3035					3040					3045				
Gly	Lys	Met	Tyr	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Gly	Trp	Asp	Thr	Arg	Ile	
	3050					3055					3060				
Ser	Lys	Phe	Asp	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Thr	Asn	Gln	Met	
	3065					3070					3075				
Glu	Glu	Gly	His	Arg	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Lys	Tyr	Thr	
	3080					3085					3090				
Tyr	Gln	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Val	Leu	Arg	Pro	Ala	Glu	Gly	Gly	
	3095					3100					3105				
Lys	Thr	Val	Met	Asp	Ile	Ile	Ser	Arg	Gln	Asp	Gln	Arg	Gly	Ser	
	3110					3115					3120				
Gly	Gln	Val	Val	Thr	Tyr	Ala	Leu	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Val	
	3125					3130					3135				
Val	Gln	Leu	Ile	Arg	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Glu	Met	
	3140					3145					3150				
Gln	Asp	Leu	Trp	Leu	Leu	Arg	Lys	Pro	Glu	Lys	Val	Thr	Arg	Trp	
	3155					3160					3165				
Leu	Gln	Ser	Asn	Gly	Trp	Asp	Arg	Leu	Lys	Arg	Met	Ala	Val	Ser	
	3170					3175					3180				
Gly	Asp	Asp	Cys	Val	Val	Lys	Pro	Ile	Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	His	

3185		3190		3195
Ala Leu Arg Phe Leu Asn Asp Met Gly Lys Val Arg Lys Asp Thr				
3200		3205		3210
Gln Glu Trp Lys Pro Ser Thr Gly Trp Ser Asn Trp Glu Glu Val				
3215		3220		3225
Pro Phe Cys Ser His His Phe Asn Lys Leu Tyr Leu Lys Asp Gly				
3230		3235		3240
Arg Ser Ile Val Val Pro Cys Arg His Gln Asp Glu Leu Ile Gly				
3245		3250		3255
Arg Ala Arg Val Ser Pro Gly Ala Gly Trp Ser Ile Arg Glu Thr				
3260		3265		3270
Ala Cys Leu Ala Lys Ser Tyr Ala Gln Met Trp Gln Leu Leu Tyr				
3275		3280		3285
Phe His Arg Arg Asp Leu Arg Leu Met Ala Asn Ala Ile Cys Ser				
3290		3295		3300
Ala Val Pro Val Asp Trp Val Pro Thr Gly Arg Thr Thr Trp Ser				
3305		3310		3315
Ile His Gly Lys Gly Glu Trp Met Thr Thr Glu Asp Met Leu Met				
3320		3325		3330
Val Trp Asn Arg Val Trp Ile Glu Glu Asn Asp His Met Glu Asp				
3335		3340		3345
Lys Thr Pro Val Thr Lys Trp Thr Asp Ile Pro Tyr Leu Gly Lys				
3350		3355		3360
Arg Glu Asp Leu Trp Cys Gly Ser Leu Ile Gly His Arg Pro Arg				
3365		3370		3375
Thr Thr Trp Ala Glu Asn Ile Lys Asp Thr Val Asn Met Val Arg				
3380		3385		3390
Arg Ile Ile Gly Asp Glu Glu Lys Tyr Met Asp Tyr Leu Ser Thr				
3395		3400		3405
Gln Val Arg Tyr Leu Gly Glu Glu Gly Ser Thr Pro Gly Val Leu				
3410		3415		3420

<211> 10269
<212> ДНК
<213> Зика штамм FSS13025

<220>
<221> иной признак
<222> (4429)..(4429)
<223> n is a, c, g, t or u

<220>
<221> иной признак
<222> (6882)..(6882)
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 7
atgaaaaacc caaagaagaa atccggagga ttccggattg tcaatatgct aaaacgcgga 60
gtagcccgtag tgagcccctt tgggggcttg aagaggctgc cagccggact tctgctgggt 120
catgggcca tcaggatggg cttggcgatt ctgacctttt tgagattcac ggcaatcaag 180
ccatcactgg gtctcatcaa tagatggggg tcaagtggga aaaaagaggc tatggaaata 240
ataaagaagt ttaagaaaga tctggctgcc atgctgagaa taatcaatgc taggaaggag 300
aagaagagac gaggcacaga tactagtgtc ggaattgttg gcctcctgct gaccacagcc 360
atggcagtag aggtcactag acgtgggaat gcatactata tgtacttgga cagaagcgat 420
gctggggagg ccatactttt tccaaccaca atggggatga ataagtgtta tatacagatc 480
atggatcttg gacacatgtg tgatgccacc atgagctatg aatgccctat gctggatgag 540
ggggtagaac cagatgacgt cgattgttgg tgcaacacga cgtcaacttg ggttgtgtac 600
ggaacctgcc accacaaaaa aggtgaagca cggagatcta gaagagctgt gacgctcccc 660
tcccattcca ctaggaagct gcaaacgcgg tcgcagacct ggttggaaac aagagaatac 720
acaaagcacc tgattagagt cgaaaattgg atattcagga accctggctt cgcgttagca 780
gcagctgcca tcgcttggtt tttgggaagc tcaacgagcc aaaaagtcac atacttggtc 840
atgatactgc tgattgcccc ggcatcacgc atcaggtgca taggagtcag caatagggac 900
tttgtggaag gtatgtcagg tgggacttgg gttgatgttg tcttggaaca tggaggttgt 960
gttacgtaa tggcacagga caaacgcact gtcgacatag agctgggttac aacaacagtc 1020
agcaacatgg cggaggtaag atcctactgc tatgaggcat caatatcgga catggcttcg 1080
gacagccgct gcccaacaca aggtgaagcc taccttgaca agcaatcaga cactcaatat 1140
gtctgcaaaa gaacgttagt ggacagaggc tggggaaatg gatgtggact ttttgcaaaa 1200
gggagcctgg tgacatgcgc taagtttgct tgctctaaga aaatgaccgg gaagagcatc 1260
cagccagaga atctggagta ccggataatg ctgtcagttc atggctccca gcacagtggg 1320
atgatcgtaa atgatacagg acatgaaact gatgagaata gagcgaaggc tgagataacg 1380
cccaattcac caagagccga agccaccctg gggggttttg gaagcctagg acttgattgt 1440

gaaccgagga	caggccttga	cttttcagat	ttgtattact	tgactatgaa	taacaagcac	1500
tggttggttc	acaaggagtg	gttccacgac	attccattac	cttggcatgc	tggggcagac	1560
accggaactc	cacactggaa	caacaaagaa	gcactggtag	agttcaagga	cgcacatgcc	1620
aaaaggcaga	ctgtcgtggt	tctagggagt	caagaaggag	cagttcacac	ggcccttgct	1680
ggagctctgg	aggctgagat	ggatggtgca	aagggaaggc	tgtcctctgg	ccacttgaaa	1740
tgtcgcctga	aaatggataa	acttagattg	aagggcgtgt	catactcctt	gtgtaccgca	1800
gcgttcacat	tcactaagat	cccggctgaa	acactgcacg	ggacagtcac	agtggaggta	1860
cagtacgcag	ggacagatgg	accttgcaag	gttccagctc	agatggcggt	ggacatgcaa	1920
actctgaccc	cagttgggag	gttgataacc	gctaaccctg	taatcactga	aagcactgag	1980
aactccaaga	tgatgctgga	actggatcca	ccatttgggg	actcttacat	tgtcatagga	2040
gtcggggaaa	agaagatcac	ccaccactgg	cacaggagtg	gcagcaccat	tggaaaagca	2100
tttgaagcca	ctgtgagagg	tgccaagaga	atggcagtct	tgggagacac	agcctgggac	2160
tttggatcag	ttgggggtgc	tctcaactca	ctgggcaagg	gcatccatca	aatttttgga	2220
gcagctttca	aatcattggt	tggaggaatg	tcctggttct	cacaaattct	cattggaacg	2280
ttgctggtgt	ggttgggtct	gaatacaaag	aatggatcta	tttcccttat	gtgcttggcc	2340
ttagggggag	tgttgatctt	cttatccaca	gccgtctctg	ctgatgtggg	gtgctcgggtg	2400
gacttctcaa	agaaggaaac	gagatgcggt	acaggggtgt	tcgtctataa	cgacgttgaa	2460
gcttggaggg	acaggtacaa	gtaccatcct	gactcccctc	gtagattggc	agcagcagtc	2520
aagcaagcct	gggaagatgg	gatctgtggg	atctcctctg	tttcaagaat	ggaaaacatc	2580
atgtggagat	cagtagaagg	ggagctcaac	gcaatcctgg	aagagaatgg	agttcaactg	2640
acggtcgttg	tgggatctgt	aaaaaacccc	atgtggagag	gtccacagag	attgcccgtg	2700
cctgtgaacg	agctgcccc	tggctggaag	gcttggggga	aatcgtactt	cgtcagggca	2760
gcaaagacaa	ataacagctt	tgtcgtggat	ggtgacacac	tgaaggaatg	cccactcaaa	2820
catagagcat	ggaacagctt	tcttgtggag	gatcatgggt	tcgggggtatt	tcacactagt	2880
gtctggctca	aggtagaga	agattattca	ttagagtgtg	atccagccgt	cattggaaca	2940
gccgctaagg	gaaaggaggc	tgtgcacagt	gatctaggct	actggattga	gagtgagaag	3000
aacgacacat	ggaggctgaa	gagggcccac	ctgatcgaga	tgaaaacatg	tgaatggcca	3060
aagtcccaca	cattgtggac	agatggaata	gaagaaagtg	atctgatcat	acccaagtct	3120
ttagctgggc	cactcagcca	tcacaacacc	agagagggtc	acaggaccca	aatgaaaggg	3180
ccatggcata	gtgaagagct	tgaaattcgg	tttgaggaat	gcccaggcac	taaggccac	3240
gtggaggaaa	catgtggaac	aagaggacca	tctctgagat	caaccactgc	aagcggaagg	3300
gtgatcgagg	aatggtgctg	cagggagtgc	acaatgcccc	cactgtcggt	ccgggctaaa	3360

gatggttggtt ggtatggaat ggagataagg cccaggaaag aaccagaaag taacttagta	3420
aggtcaatgg tgactgcagg atcaactgat cacatggatc acttctccct tggagtgcctt	3480
gtgattctgc tcatggtaca ggaagggcta aagaagagaa tgaccacaaa gatcatcata	3540
agcacatcaa tggcagtgct ggtagctatg atcctgggag gatcttcaat gaggacctg	3600
gctaagcttg caattttgat gggtgccacc ttcgcggaaa tgaacactgg aggagatggt	3660
gctcatctgg cgctgatagc ggcatcctaaa gtcagacctg cgttgctgggt atctttcatt	3720
ttcagagcta attggacacc ccgtgagagc atgctgctgg ccttggcctc gtgtcttctg	3780
caaaactgca tctccgcctt ggaaggcgac ctgatgggtc ccatcaatgg ttttgctttg	3840
gcctgggttg caatacgagc gatggttggt ccacgcactg acaacatcac cttggcaatc	3900
ctggctgctc tgacaccact ggcccggggc aactgcttg tggcgtggag agcaggcctt	3960
gctacttgcg gggggttcat gctcctttct ctgaagggga aaggcagtgt gaagaagaac	4020
ttaccatttg tcatggccct gggactaacc gctgtgaggc tggtcgacct catcaacgtg	4080
gtgggactgc tgttgctcac aaggagtggg aagcggagct ggccccctag tgaagtactc	4140
acagctgttg gcctgatatg cgcattggct ggaggggtcg ccaaggcgga tatagagatg	4200
gctgggcccc tggccgcgggt cggctctgcta attgtcagtt acgtggtctc aggaaagagt	4260
gtggacatgt acattgaaag agcaggtgac atcacatggg aaaaagatgc ggaagtcact	4320
ggaaacagtc cccggctcga tgtggcacta gatgagagtg gtgatttctc cctagtggag	4380
gatgatggtc ccccatgag agagatcata ctcaaagtgg tcctgatgnc catctgtggc	4440
atgaacccaa tagccatacc ctttgcagct ggagcgtgggt acgtgtatgt gaagactgga	4500
aaaaggagtg gtgctctatg ggatgtgcct gctccaagg aagtaaaaaa gggggagacc	4560
acagatggag tgtacagagt aatgactcgt agactgctag gttcaacaca agttggagtg	4620
ggagtcatgc aagaggggggt cttccacact atgtggcacg tcacaaaagg atccgcgctg	4680
agaagcggtg aaggagact tgatccatac tggggagatg tcaagcagga tctggtgtca	4740
tactgtggtc catggaagct agatgccgcc tgggacgggc acagcgaggt gcagctcttg	4800
gccgtgcccc ccggagagag agcgaggaaac atccagactc tgcccggaat atttaagaca	4860
aaggatgggg acattggagc agttgcgctg gactaccag caggaaactc aggatctcca	4920
atcctagata agtgtgggag agtgatagga ctctatggta atggggctcg gatcaaaaat	4980
gggagttacg ttagtgccat caccaaggg aggagggagg aagagactcc tgttgagtgc	5040
ttcgagcctt cgatgctgaa gaagaagcag ctaactgtct tagacttgca tcctggagct	5100
gggaaaacca ggagagttct tcctgaaata gtccgtgaag ccataaaaac aagactccgc	5160
actgtgatct tagctccaac cagggttgct gctgctgaaa tggaggaagc ccttagaggg	5220
cttcagtgct gttatatgac aacagcagtc aatgtcacc attctgggac agaaatcggt	5280

gacttaatgt gccatgccac cttcacttca cgtctactac agccaatcag agtccccaac	5340
tataatctgt atattatgga tgaggcccac ttcacagatc cctcaagtat agcagcaaga	5400
ggatacattt caacaagggg tgagatgggc gagggcggctg ccatcttcat gactgccacg	5460
ccaccaggaa cccgtgacgc attcccggac tccaactcac caattatgga caccgaagtg	5520
gaagtcccag agagagcctg gagctcaggc tttgattggg tgacggatca ttctggaaaa	5580
acagtttggg ttgttccaag cgtgaggaat ggcaatgaga tcgcagcttg tctgacaaag	5640
gctggaaaac gggtcataca gctcagcaga aagacttttg agacagagtt ccagaaaaca	5700
aaacatcaag agtgggactt cgtcgtgaca actgacattt cagagatggg cgccaacttt	5760
aaagctgacc gtgtcataga ttccaggaga tgcctaaagc cggtcatact tgatggcgag	5820
agagtcattc tggctggacc catgcctgtc acacatgcca gcgctgcca gaggaggggg	5880
cgcataggca ggaaccccaa caaacctgga gatgagtatc tgtatggagg tgggtgcgca	5940
gagactgatg aagaccatgc aactggctt gaagcaagaa tgcttcttga caacatttac	6000
ctccaagatg gcctcatagc ctcgctctat cgacctgagg cgcacaaagt agcagctatt	6060
gagggagagt tcaagcttag gacggagcaa aggaagacct ttgtggaact catgaaaaga	6120
ggagatcttc ctgtttggct ggcctatcag gttgcatctg ccggaataac ctacacagat	6180
agaagatggg gctttgatgg cacgaccaac aacaccataa tggaagacag tgtgccggca	6240
gaggtgtgga ccagatacgg agagaaaaga gtgctcaaac cgaggtggat ggacgccaga	6300
gtttgttcag atcatgcggc cctgaagtca ttcaaagagt ttgccgctgg gaaaagagga	6360
gcggcctttg gagtgatgga agccctggga aactgccag gacatatgac agagagattc	6420
caggaggcca ttgacaacct cgctgtgctc atgcgggcag agactggaag caggccctac	6480
aaagccgcgg cggcccaatt accggagacc ctagagacta tcatgctttt ggggttgctg	6540
ggaacagtct cgctgggaat ctttttcgtc ttgatgcgga acaagggcat agggaagatg	6600
ggctttggaa tggtgactct tggggccagc gcatggctta tgtggctctc ggaaattgag	6660
ccagccagaa ttgcatgtgt cctcattgtt gtgttcctat tgctgggtgg gctcatacct	6720
gagccagaaa agcaaagatc tcccaggac aaccaaattg caatcatcat catggttagca	6780
gtgggtcttc tgggcttgat taccgccaat gaactcggat ggttggagag aacaaagagt	6840
gacctaagcc atctaattgg aaggagagag gagggggcaa cnataggatt ctcaatggac	6900
attgacctgc ggccagcctc agcttgggct atctatgctg ctctgacaac tttcattacc	6960
ccagccgtcc aacatgcagt gaccacttca tacaacaact actccttaat ggcgatggcc	7020
acgcaagctg gagtgttggt cggtatgggt aaagggatgc cattctatgc atgggacttt	7080
ggagtccgc tgctaattgat aggttgctac tcacaattaa caccctgac cctaatagtg	7140
gccatcattt tgctcgtggc gcactacatg tacttgatcc cagggtgca ggcagcagct	7200

gcgcgtgctg	cccagaagag	aacggcagct	ggcatcatga	agaaccctgt	tgtggatgga	7260
atagtgggtga	ctgacattga	cacaatgaca	attgaccccc	aagtggagaa	aaagatggga	7320
caggtgctac	tcatagcagt	agctgtctcc	agcgccatac	tgtcgcggac	cgcctggggg	7380
tggggtgagg	ctggggccct	gatcacagct	gcaacttcca	ctttgtggga	gggctctccg	7440
aacaagtact	ggaactcctc	cacagccacc	tcactgtgta	acatttttag	gggaagctac	7500
ttggctggag	cttctctaata	ctacacagta	acaagaaacg	ctggcttggg	caagagacgt	7560
gggggtggaa	cgggagagac	cctgggagag	aaatggaagg	cccgcctgaa	ccagatgtcg	7620
gccctggagt	tctactccta	caaaaagtca	ggcatcaccg	aggtgtgcag	agaagaggcc	7680
cgccgcgccc	tcaaggacgg	tgtggcaacg	ggaggccacg	ctgtgtcccg	aggaagtgca	7740
aagctgagat	ggttgggtga	gaggggatac	ctgcagccct	atggaaagg	cattgatctt	7800
ggatgtggca	gagggggctg	gagttactat	gccgccacca	tccgcaaagt	tcaagaagtg	7860
aaaggataca	caaaaggagg	ccttgggtcat	gaagaaccca	tgttgggtgca	aagctatggg	7920
tggaacatag	tccgtcttaa	gagtgggggtg	gacgtctttc	atatggcggc	tgagccgtgt	7980
gacacgttgc	tgtgtgatat	aggtgagtca	tcacttagtc	ctgaagtgga	agaagcacgg	8040
acgctcagag	tcctctccat	ggtgggggat	tggcttgaaa	aaagaccagg	agccttttgt	8100
ataaaagtgt	tgtgcccata	caccagcact	atgatggaaa	ccctggagcg	actgcagcgt	8160
aggtatgggg	gaggactggg	cagagtgccca	ctctcccgca	actctacaca	tgagatgtac	8220
tgggtctctg	gagcgaaaag	caacaccata	aaaagtgtgt	ccaccacgag	ccagctcctt	8280
ttggggcgca	tggacggggc	caggaggcca	gtgaaatatg	aagaggatgt	gaatctcggc	8340
tctggcacgc	gggctgtggg	aagctgcgct	gaagctccca	acatgaagat	cattggtaac	8400
cgcattgaga	ggatccgcag	tgagcacgcg	gaaacgtggg	tctttgacga	gaaccaccca	8460
tataggacat	gggcttacca	tggaagctac	gaggcccca	cacaagggtc	agcgtcctct	8520
ctaataaacg	gggttgtcag	gctcctgtca	aaaccctggg	atgtggtgac	tggagtcaca	8580
ggaatagcca	tgaccgacac	cacaccgtat	ggtcagcaaa	gagttttcaa	ggaaaaagtg	8640
gacactaggg	tgccagaccc	ccaagaaggc	actcgtcagg	ttatgagcat	ggtctcttcc	8700
tggttgtgga	aagagttagg	caaacacaaa	cggccacgag	tctgtacca	agaagagttc	8760
atcaacaagg	ttcgtagcaa	cgcagcatta	ggggcaatat	ttgaagagga	aaaagagtgg	8820
aagactgcag	tggaagctgt	gaacgatcca	aggttctggg	ctctagtgga	caaggaaaga	8880
gagcaccacc	tgagaggaga	gtgccagagc	tgtgtgtaca	acatgatggg	aaaaagagaa	8940
aagaaacaag	gggaatttgg	aaaggccaag	ggcagccgcg	ccatctggta	catgtggcta	9000
ggggctagat	ttctagagtt	cgaagccctt	ggattcttga	acgaggatca	ctggatgggg	9060
agagagaatt	caggaggtgg	tgttgaaggg	ctaggattac	aaagactcgg	atatgtctta	9120

gaagagatga gtcgcatacc aggaggaagg atgtatgcag atgatactgc tggctggggac	9180
acccgcatca gcaggtttga tctggagaat gaagctctaa tcaccaacca aatggagaaa	9240
gggcacaggg ccttggcatt ggccataatc aagtacacat accaaaacaa agtggtaaag	9300
gtccttagac cagctgaaaa agggaagaca gttatggaca ttatttcaag acaagaccaa	9360
agggggagcg gacaagttgt cacttacgct cttaatacat ttaccaacct agtgggtgcag	9420
ctcattcggga atatggaggc tgaggaagtt ctagagatgc aagacttgtg gctgctgcgg	9480
aggtcagaga aagtgaccaa ctggttgcag agcaatggat gggataggct caaacgaatg	9540
gcagtcagtg gagatgattg cgttgtgaaa ccaattgatg ataggtttgc acatgctctc	9600
aggttcttga atgatatggg aaaagttagg aaggacacac aagagtggaa gccctcaact	9660
ggatgggaca actgggaaga agttccgttt tgctcccacc acttcaacaa gctccatctc	9720
aaggacggga ggtccattgt ggttccctgc cgccaccaag atgaactgat tggccgagct	9780
cgcgtctcac cgggggcggg atggagcatc cgggagactg cttgcctagc aaaatcatat	9840
gcgcaaattgt ggcagctcct ttatttccac agaagggacc tccgactgat ggccaatgcc	9900
atttgttcat ctgtgccagt tgactggggt ccaactggga gaactacctg gtcaatccat	9960
ggaaagggag aatggatgac cactgaagac atgcttgtgg tgtggaacag agtgtggatt	10020
gaggagaacg accacatgga agacaagacc ccagttacga aatggacaga cattccctat	10080
ttgggaaaaa gggaagactt gtggtgtggg tctctcatag ggcacagacc gcgcaccacc	10140
tgggctgaga acattaaaaa cacagtcaac atgatgcgta ggatcatagg tgatgaagaa	10200
aagtacgtgg actacctatc cacccaagtt cgctacttgg gcgaagaagg gtccacacct	10260
ggagtgcta	10269

<210> 8
 <211> 3423
 <212> PRT
 <213> Полный ORF, Зика штамм FSS13025

<400> 8

Met	Lys	Asn	Pro	Lys	Lys	Lys	Ser	Gly	Gly	Phe	Arg	Ile	Val	Asn	Met
1				5					10					15	

Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Ala	Arg	Val	Ser	Pro	Phe	Gly	Gly	Leu	Lys	Arg
			20					25					30		

Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	His	Gly	Pro	Ile	Arg	Met	Val	Leu
		35					40					45			

Ala	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Phe	Thr	Ala	Ile	Lys	Pro	Ser	Leu	Gly
	50					55					60				

Leu	Ile	Asn	Arg	Trp	Gly	Ser	Val	Gly	Lys	Lys	Glu	Ala	Met	Glu	Ile	65	70	75	80
Ile	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	85	90	95	
Ala	Arg	Lys	Glu	Lys	Lys	Arg	Arg	Gly	Thr	Asp	Thr	Ser	Val	Gly	Ile	100	105	110	
Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Arg	115	120	125	
Gly	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Leu	Asp	Arg	Ser	Asp	Ala	Gly	Glu	Ala	130	135	140	
Ile	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Met	Gly	Met	Asn	Lys	Cys	Tyr	Ile	Gln	Ile	145	150	155	160
Met	Asp	Leu	Gly	His	Met	Cys	Asp	Ala	Thr	Met	Ser	Tyr	Glu	Cys	Pro	165	170	175	
Met	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Glu	Pro	Asp	Asp	Val	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn	180	185	190	
Thr	Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Val	Tyr	Gly	Thr	Cys	His	His	Lys	Lys	Gly	195	200	205	
Glu	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala	Val	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ser	Thr	210	215	220	
Arg	Lys	Leu	Gln	Thr	Arg	Ser	Gln	Thr	Trp	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Tyr	225	230	235	240
Thr	Lys	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Trp	Ile	Phe	Arg	Asn	Pro	Gly	245	250	255	
Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Thr	260	265	270	
Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Tyr	Leu	Val	Met	Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Pro	Ala	275	280	285	
Tyr	Ser	Ile	Arg	Cys	Ile	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly	290	295	300	
Met	Ser	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	Asp	Val	Val	Leu	Glu	His	Gly	Gly	Cys	305	310	315	320

Val	Thr	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Lys	Pro	Thr	Val	Asp	Ile	Glu	Leu	Val	
				325					330					335		
Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Asn	Met	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	Glu	
			340					345					350			
Ala	Ser	Ile	Ser	Asp	Met	Ala	Ser	Asp	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	
		355					360					365				
Glu	Ala	Tyr	Leu	Asp	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	Gln	Tyr	Val	Cys	Lys	Arg	
	370					375					380					
Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	
385					390					395					400	
Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Ala	Cys	Ser	Lys	Lys	Met	Thr	
				405					410					415		
Gly	Lys	Ser	Ile	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Glu	Tyr	Arg	Ile	Met	Leu	Ser	
			420					425					430			
Val	His	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Gly	Met	Ile	Val	Asn	Asp	Thr	Gly	His	
		435					440					445				
Glu	Thr	Asp	Glu	Asn	Arg	Ala	Lys	Val	Glu	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Pro	
	450					455					460					
Arg	Ala	Glu	Ala	Thr	Leu	Gly	Gly	Phe	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	
465					470					475					480	
Glu	Pro	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ser	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Met	
				485					490					495		
Asn	Asn	Lys	His	Trp	Leu	Val	His	Lys	Glu	Trp	Phe	His	Asp	Ile	Pro	
			500					505					510			
Leu	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Ala	Asp	Thr	Gly	Thr	Pro	His	Trp	Asn	Asn	
		515					520					525				
Lys	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Phe	Lys	Asp	Ala	His	Ala	Lys	Arg	Gln	Thr	
	530					535					540					
Val	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Val	His	Thr	Ala	Leu	Ala	
545					550					555					560	
Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Met	Asp	Gly	Ala	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	
				565					570					575		

Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Leu	Lys	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Gly	580	585	590	
Val	Ser	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Ile	Pro	595	600	605	
Ala	Glu	Thr	Leu	His	Gly	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Val	Gln	Tyr	Ala	Gly	610	615	620	
Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ala	Gln	Met	Ala	Val	Asp	Met	Gln	625	630	635	640
Thr	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Val	Ile	Thr	645	650	655	
Glu	Ser	Thr	Glu	Asn	Ser	Lys	Met	Met	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro	Pro	Phe	660	665	670	
Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	His	675	680	685	
His	Trp	His	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Lys	Ala	Phe	Glu	Ala	Thr	690	695	700	
Val	Arg	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Trp	Asp	705	710	715	720
Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Ile	His	725	730	735	
Gln	Ile	Phe	Gly	Ala	Ala	Phe	Lys	Ser	Leu	Phe	Gly	Gly	Met	Ser	Trp	740	745	750	
Phe	Ser	Gln	Ile	Leu	Ile	Gly	Thr	Leu	Leu	Val	Trp	Leu	Gly	Leu	Asn	755	760	765	
Thr	Lys	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	Leu	Met	Cys	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	770	775	780	
Leu	Ile	Phe	Leu	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Asp	Val	Gly	Cys	Ser	Val	785	790	795	800
Asp	Phe	Ser	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg	Cys	Gly	Thr	Gly	Val	Phe	Val	Tyr	805	810	815	
Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Trp	Arg	Asp	Arg	Tyr	Lys	Tyr	His	Pro	Asp	Ser	820	825	830	

Pro	Arg	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ala	Trp	Glu	Asp	Gly	Ile	835	840	845
Cys	Gly	Ile	Ser	Ser	Val	Ser	Arg	Met	Glu	Asn	Ile	Met	Trp	Arg	Ser	850	855	860
Val	Glu	Gly	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Gly	Val	Gln	Leu	865	870	875
Thr	Val	Val	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Asn	Pro	Met	Trp	Arg	Gly	Pro	Gln	885	890	895
Arg	Leu	Pro	Val	Pro	Val	Asn	Glu	Leu	Pro	His	Gly	Trp	Lys	Ala	Trp	900	905	910
Gly	Lys	Ser	Tyr	Phe	Val	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Asn	Asn	Ser	Phe	Val	915	920	925
Val	Asp	Gly	Asp	Thr	Leu	Lys	Glu	Cys	Pro	Leu	Lys	His	Arg	Ala	Trp	930	935	940
Asn	Ser	Phe	Leu	Val	Glu	Asp	His	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	His	Thr	Ser	945	950	955
Val	Trp	Leu	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Glu	Cys	Asp	Pro	Ala	965	970	975
Val	Ile	Gly	Thr	Ala	Ala	Lys	Gly	Lys	Glu	Ala	Val	His	Ser	Asp	Leu	980	985	990
Gly	Tyr	Trp	Ile	Glu	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Thr	Trp	Arg	Leu	Lys	Arg	995	1000	1005
Ala	His	Leu	Ile	Glu	Met	Lys	Thr	Cys	Glu	Trp	Pro	Lys	Ser	His		1010	1015	1020
Thr	Leu	Trp	Thr	Asp	Gly	Ile	Glu	Glu	Ser	Asp	Leu	Ile	Ile	Pro		1025	1030	1035
Lys	Ser	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	Ser	His	His	Asn	Thr	Arg	Glu	Gly		1040	1045	1050
Tyr	Arg	Thr	Gln	Met	Lys	Gly	Pro	Trp	His	Ser	Glu	Glu	Leu	Glu		1055	1060	1065
Ile	Arg	Phe	Glu	Glu	Cys	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	His	Val	Glu	Glu		1070	1075	1080

Thr	Cys	Gly	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser
1085						1090					1095			
Gly	Arg	Val	Ile	Glu	Glu	Trp	Cys	Cys	Arg	Glu	Cys	Thr	Met	Pro
1100						1105					1110			
Pro	Leu	Ser	Phe	Arg	Ala	Lys	Asp	Gly	Cys	Trp	Tyr	Gly	Met	Glu
1115						1120					1125			
Ile	Arg	Pro	Arg	Lys	Glu	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Met
1130						1135					1140			
Val	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	His	Met	Asp	His	Phe	Ser	Leu	Gly
1145						1150					1155			
Val	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Met	Val	Gln	Glu	Gly	Leu	Lys	Lys	Arg
1160						1165					1170			
Met	Thr	Thr	Lys	Ile	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val
1175						1180					1185			
Ala	Met	Ile	Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Met	Ser	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu
1190						1195					1200			
Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Ala	Thr	Phe	Ala	Glu	Met	Asn	Thr	Gly	Gly
1205						1210					1215			
Asp	Val	Ala	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Pro
1220						1225					1230			
Ala	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	Ile	Phe	Arg	Ala	Asn	Trp	Thr	Pro	Arg
1235						1240					1245			
Glu	Ser	Met	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala
1250						1255					1260			
Ile	Ser	Ala	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Met	Val	Pro	Ile	Asn	Gly	Phe
1265						1270					1275			
Ala	Leu	Ala	Trp	Leu	Ala	Ile	Arg	Ala	Met	Val	Val	Pro	Arg	Thr
1280						1285					1290			
Asp	Asn	Ile	Thr	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ala
1295						1300					1305			
Arg	Gly	Thr	Leu	Leu	Val	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Cys
1310						1315					1320			

Gly	Gly	Phe	Met	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Lys
1325						1330					1335			
Lys	Asn	Leu	Pro	Phe	Val	Met	Ala	Leu	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Arg
1340						1345					1350			
Leu	Val	Asp	Pro	Ile	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg
1355						1360					1365			
Ser	Gly	Lys	Arg	Ser	Trp	Pro	Pro	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Ala	Val
1370						1375					1380			
Gly	Leu	Ile	Cys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Lys	Ala	Asp	Ile
1385						1390					1395			
Glu	Met	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Val	Ser
1400						1405					1410			
Tyr	Val	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Asp	Met	Tyr	Ile	Glu	Arg	Ala
1415						1420					1425			
Gly	Asp	Ile	Thr	Trp	Glu	Lys	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Gly	Asn	Ser
1430						1435					1440			
Pro	Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu
1445						1450					1455			
Val	Glu	Asp	Asp	Gly	Pro	Pro	Met	Arg	Glu	Ile	Ile	Leu	Lys	Val
1460						1465					1470			
Val	Leu	Met	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Asn	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Phe
1475						1480					1485			
Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Tyr	Val	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser
1490						1495					1500			
Gly	Ala	Leu	Trp	Asp	Val	Pro	Ala	Pro	Lys	Glu	Val	Lys	Lys	Gly
1505						1510					1515			
Glu	Thr	Thr	Asp	Gly	Val	Tyr	Arg	Val	Met	Thr	Arg	Arg	Leu	Leu
1520						1525					1530			
Gly	Ser	Thr	Gln	Val	Gly	Val	Gly	Val	Met	Gln	Glu	Gly	Val	Phe
1535						1540					1545			
His	Thr	Met	Trp	His	Val	Thr	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Gly
1550						1555					1560			

Glu	Gly	Arg	Leu	Asp	Pro	Tyr	Trp	Gly	Asp	Val	Lys	Gln	Asp	Leu
1565						1570					1575			
Val	Ser	Tyr	Cys	Gly	Pro	Trp	Lys	Leu	Asp	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly
1580						1585					1590			
His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala
1595						1600					1605			
Arg	Asn	Ile	Gln	Thr	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Lys	Thr	Lys	Asp	Gly
1610						1615					1620			
Asp	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Asp	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Gly
1625						1630					1635			
Ser	Pro	Ile	Leu	Asp	Lys	Cys	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Leu	Tyr	Gly
1640						1645					1650			
Asn	Gly	Val	Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Ser	Tyr	Val	Ser	Ala	Ile	Thr
1655						1660					1665			
Gln	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Glu	Thr	Pro	Val	Glu	Cys	Phe	Glu	Pro
1670						1675					1680			
Ser	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	His	Pro
1685						1690					1695			
Gly	Ala	Gly	Lys	Thr	Arg	Arg	Val	Leu	Pro	Glu	Ile	Val	Arg	Glu
1700						1705					1710			
Ala	Ile	Lys	Thr	Arg	Leu	Arg	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	Pro	Thr	Arg
1715						1720					1725			
Val	Val	Ala	Ala	Glu	Met	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Pro	Val
1730						1735					1740			
Arg	Tyr	Met	Thr	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Thr	His	Ser	Gly	Thr	Glu
1745						1750					1755			
Ile	Val	Asp	Leu	Met	Cys	His	Ala	Thr	Phe	Thr	Ser	Arg	Leu	Leu
1760						1765					1770			
Gln	Pro	Ile	Arg	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Ile	Met	Asp	Glu
1775						1780					1785			
Ala	His	Phe	Thr	Asp	Pro	Ser	Ser	Ile	Ala	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ile
1790						1795					1800			

Ser	Thr	Arg	Val	Glu	Met	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala	Ile	Phe	Met	Thr
1805						1810					1815			
Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Asp	Ala	Phe	Pro	Asp	Ser	Asn	Ser
1820						1825					1830			
Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Glu	Val	Glu	Val	Pro	Glu	Arg	Ala	Trp	Ser
1835						1840					1845			
Ser	Gly	Phe	Asp	Trp	Val	Thr	Asp	His	Ser	Gly	Lys	Thr	Val	Trp
1850						1855					1860			
Phe	Val	Pro	Ser	Val	Arg	Asn	Gly	Asn	Glu	Ile	Ala	Ala	Cys	Leu
1865						1870					1875			
Thr	Lys	Ala	Gly	Lys	Arg	Val	Ile	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Thr	Phe
1880						1885					1890			
Glu	Thr	Glu	Phe	Gln	Lys	Thr	Lys	His	Gln	Glu	Trp	Asp	Phe	Val
1895						1900					1905			
Val	Thr	Thr	Asp	Ile	Ser	Glu	Met	Gly	Ala	Asn	Phe	Lys	Ala	Asp
1910						1915					1920			
Arg	Val	Ile	Asp	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	Lys	Pro	Val	Ile	Leu	Asp
1925						1930					1935			
Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Met	Pro	Val	Thr	His	Ala
1940						1945					1950			
Ser	Ala	Ala	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Gly	Arg	Asn	Pro	Asn	Lys
1955						1960					1965			
Pro	Gly	Asp	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Glu	Thr	Asp
1970						1975					1980			
Glu	Asp	His	Ala	His	Trp	Leu	Glu	Ala	Arg	Met	Leu	Leu	Asp	Asn
1985						1990					1995			
Ile	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Tyr	Arg	Pro	Glu
2000						2005					2010			
Ala	Asp	Lys	Val	Ala	Ala	Ile	Glu	Gly	Glu	Phe	Lys	Leu	Arg	Thr
2015						2020					2025			
Glu	Gln	Arg	Lys	Thr	Phe	Val	Glu	Leu	Met	Lys	Arg	Gly	Asp	Leu
2030						2035					2040			

Pro	Val	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr	Tyr
2045						2050					2055			
Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Cys	Phe	Asp	Gly	Thr	Thr	Asn	Asn	Thr	Ile
2060						2065					2070			
Met	Glu	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Glu	Val	Trp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Glu
2075						2080					2085			
Lys	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Arg	Trp	Met	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser
2090						2095					2100			
Asp	His	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Phe	Lys	Glu	Phe	Ala	Ala	Gly	Lys
2105						2110					2115			
Arg	Gly	Ala	Ala	Phe	Gly	Val	Met	Glu	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro
2120						2125					2130			
Gly	His	Met	Thr	Glu	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Ala
2135						2140					2145			
Val	Leu	Met	Arg	Ala	Glu	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Tyr	Lys	Ala	Ala
2150						2155					2160			
Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Leu	Gly
2165						2170					2175			
Leu	Leu	Gly	Thr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Val	Leu	Met	Arg
2180						2185					2190			
Asn	Lys	Gly	Ile	Gly	Lys	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Val	Thr	Leu	Gly
2195						2200					2205			
Ala	Ser	Ala	Trp	Leu	Met	Trp	Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Pro	Ala	Arg
2210						2215					2220			
Ile	Ala	Cys	Val	Leu	Ile	Val	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Leu
2225						2230					2235			
Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Ser	Pro	Gln	Asp	Asn	Gln	Met
2240						2245					2250			
Ala	Ile	Ile	Ile	Met	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr
2255						2260					2265			
Ala	Asn	Glu	Leu	Gly	Trp	Leu	Glu	Arg	Thr	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser
2270						2275					2280			

His	Leu	Met	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Gly	Phe	Ser
2285						2290					2295			
Met	Asp	Ile	Asp	Leu	Arg	Pro	Ala	Ser	Ala	Trp	Ala	Ile	Tyr	Ala
2300						2305					2310			
Ala	Leu	Thr	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Ala	Val	Gln	His	Ala	Val	Thr
2315						2320					2325			
Thr	Ser	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ser	Leu	Met	Ala	Met	Ala	Thr	Gln	Ala
2330						2335					2340			
Gly	Val	Leu	Phe	Gly	Met	Gly	Lys	Gly	Met	Pro	Phe	Tyr	Ala	Trp
2345						2350					2355			
Asp	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Met	Ile	Gly	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu
2360						2365					2370			
Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	His
2375						2380					2385			
Tyr	Met	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala
2390						2395					2400			
Ala	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Met	Lys	Asn	Pro	Val	Val
2405						2410					2415			
Asp	Gly	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Ile	Asp	Thr	Met	Thr	Ile	Asp	Pro
2420						2425					2430			
Gln	Val	Glu	Lys	Lys	Met	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Ile	Ala	Val	Ala
2435						2440					2445			
Val	Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Thr	Ala	Trp	Gly	Trp	Gly	Glu
2450						2455					2460			
Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	Trp	Glu	Gly
2465						2470					2475			
Ser	Pro	Asn	Lys	Tyr	Trp	Asn	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Cys
2480						2485					2490			
Asn	Ile	Phe	Arg	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr
2495						2500					2505			
Thr	Val	Thr	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly
2510						2515					2520			

Thr	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Lys	Trp	Lys	Ala	Arg	Leu	Asn	Gln
2525						2530					2535			
Met	Ser	Ala	Leu	Glu	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Lys	Lys	Ser	Gly	Ile	Thr
2540						2545					2550			
Glu	Val	Cys	Arg	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Leu	Lys	Asp	Gly	Val
2555						2560					2565			
Ala	Thr	Gly	Gly	His	Ala	Val	Ser	Arg	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg
2570						2575					2580			
Trp	Leu	Val	Glu	Arg	Gly	Tyr	Leu	Gln	Pro	Tyr	Gly	Lys	Val	Ile
2585						2590					2595			
Asp	Leu	Gly	Cys	Gly	Arg	Gly	Gly	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Thr
2600						2605					2610			
Ile	Arg	Lys	Val	Gln	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro
2615						2620					2625			
Gly	His	Glu	Glu	Pro	Met	Leu	Val	Gln	Ser	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ile
2630						2635					2640			
Val	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Val	Asp	Val	Phe	His	Met	Ala	Ala	Glu
2645						2650					2655			
Pro	Cys	Asp	Thr	Leu	Leu	Cys	Asp	Ile	Gly	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser
2660						2665					2670			
Pro	Glu	Val	Glu	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Met	Val
2675						2680					2685			
Gly	Asp	Trp	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Phe	Cys	Ile	Lys	Val
2690						2695					2700			
Leu	Cys	Pro	Tyr	Thr	Ser	Thr	Met	Met	Glu	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu
2705						2710					2715			
Gln	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Arg	Val	Pro	Leu	Ser	Arg
2720						2725					2730			
Asn	Ser	Thr	His	Glu	Met	Tyr	Trp	Val	Ser	Gly	Ala	Lys	Ser	Asn
2735						2740					2745			
Thr	Ile	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg
2750						2755					2760			

Met	Asp	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asp	Val	Asn
2765						2770					2775			
Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Cys	Ala	Glu	Ala	Pro
2780						2785					2790			
Asn	Met	Lys	Ile	Ile	Gly	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ile	Arg	Ser	Glu
2795						2800					2805			
His	Ala	Glu	Thr	Trp	Phe	Phe	Asp	Glu	Asn	His	Pro	Tyr	Arg	Thr
2810						2815					2820			
Trp	Ala	Tyr	His	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ala	Pro	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala
2825						2830					2835			
Ser	Ser	Leu	Ile	Asn	Gly	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Ser	Lys	Pro	Trp
2840						2845					2850			
Asp	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Thr	Asp	Thr	Thr
2855						2860					2865			
Pro	Tyr	Gly	Gln	Gln	Arg	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg
2870						2875					2880			
Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Glu	Gly	Thr	Arg	Gln	Val	Met	Ser	Met	Val
2885						2890					2895			
Ser	Ser	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu	Leu	Gly	Lys	His	Lys	Arg	Pro	Arg
2900						2905					2910			
Val	Cys	Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Ile	Asn	Lys	Val	Arg	Ser	Asn	Ala
2915						2920					2925			
Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu	Glu	Lys	Glu	Trp	Lys	Thr	Ala
2930						2935					2940			
Val	Glu	Ala	Val	Asn	Asp	Pro	Arg	Phe	Trp	Ala	Leu	Val	Asp	Lys
2945						2950					2955			
Glu	Arg	Glu	His	His	Leu	Arg	Gly	Glu	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Tyr
2960						2965					2970			
Asn	Met	Met	Gly	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Gln	Gly	Glu	Phe	Gly	Lys
2975						2980					2985			
Ala	Lys	Gly	Ser	Arg	Ala	Ile	Trp	Tyr	Met	Trp	Leu	Gly	Ala	Arg
2990						2995					3000			

Phe	Leu	Glu	Phe	Glu	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Asn	Glu	Asp	His	Trp
3005						3010					3015			
Met	Gly	Arg	Glu	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Gly	Leu
3020						3025					3030			
Gln	Arg	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Glu	Glu	Met	Ser	Arg	Ile	Pro	Gly
3035						3040					3045			
Gly	Arg	Met	Tyr	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Gly	Trp	Asp	Thr	Arg	Ile
3050						3055					3060			
Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Thr	Asn	Gln	Met
3065						3070					3075			
Glu	Lys	Gly	His	Arg	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ile	Lys	Tyr	Thr
3080						3085					3090			
Tyr	Gln	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Val	Leu	Arg	Pro	Ala	Glu	Lys	Gly
3095						3100					3105			
Lys	Thr	Val	Met	Asp	Ile	Ile	Ser	Arg	Gln	Asp	Gln	Arg	Gly	Ser
3110						3115					3120			
Gly	Gln	Val	Val	Thr	Tyr	Ala	Leu	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Val
3125						3130					3135			
Val	Gln	Leu	Ile	Arg	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Glu	Met
3140						3145					3150			
Gln	Asp	Leu	Trp	Leu	Leu	Arg	Arg	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Asn	Trp
3155						3160					3165			
Leu	Gln	Ser	Asn	Gly	Trp	Asp	Arg	Leu	Lys	Arg	Met	Ala	Val	Ser
3170						3175					3180			
Gly	Asp	Asp	Cys	Val	Val	Lys	Pro	Ile	Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	His
3185						3190					3195			
Ala	Leu	Arg	Phe	Leu	Asn	Asp	Met	Gly	Lys	Val	Arg	Lys	Asp	Thr
3200						3205					3210			
Gln	Glu	Trp	Lys	Pro	Ser	Thr	Gly	Trp	Asp	Asn	Trp	Glu	Glu	Val
3215						3220					3225			
Pro	Phe	Cys	Ser	His	His	Phe	Asn	Lys	Leu	His	Leu	Lys	Asp	Gly
3230						3235					3240			

Arg	Ser	Ile	Val	Val	Pro	Cys	Arg	His	Gln	Asp	Glu	Leu	Ile	Gly
3245						3250					3255			
Arg	Ala	Arg	Val	Ser	Pro	Gly	Ala	Gly	Trp	Ser	Ile	Arg	Glu	Thr
3260						3265					3270			
Ala	Cys	Leu	Ala	Lys	Ser	Tyr	Ala	Gln	Met	Trp	Gln	Leu	Leu	Tyr
3275						3280					3285			
Phe	His	Arg	Arg	Asp	Leu	Arg	Leu	Met	Ala	Asn	Ala	Ile	Cys	Ser
3290						3295					3300			
Ser	Val	Pro	Val	Asp	Trp	Val	Pro	Thr	Gly	Arg	Thr	Thr	Trp	Ser
3305						3310					3315			
Ile	His	Gly	Lys	Gly	Glu	Trp	Met	Thr	Thr	Glu	Asp	Met	Leu	Val
3320						3325					3330			
Val	Trp	Asn	Arg	Val	Trp	Ile	Glu	Glu	Asn	Asp	His	Met	Glu	Asp
3335						3340					3345			
Lys	Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Trp	Thr	Asp	Ile	Pro	Tyr	Leu	Gly	Lys
3350						3355					3360			
Arg	Glu	Asp	Leu	Trp	Cys	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	His	Arg	Pro	Arg
3365						3370					3375			
Thr	Thr	Trp	Ala	Glu	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Val	Asn	Met	Met	Arg
3380						3385					3390			
Arg	Ile	Ile	Gly	Asp	Glu	Glu	Lys	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Ser	Thr
3395						3400					3405			
Gln	Val	Arg	Tyr	Leu	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Gly	Val	Leu
3410						3415					3420			

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильная вакцинная композиция, содержащая один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, где указанные антигены формулируются с или без адъюванта в фармацевтически приемлемом буфере, причем вакцинная композиция вызывает защитный иммунный ответ к каждому из вирусов у млекопитающих.
2. Вакцинная композиция по пункту 1, причем указанный вирусный антиген Зика является эффективным для лечения, диагностики и профилактики против любого генотипа/генотипных вариантов/штаммов вируса Зика.
3. Вакцинная композиция по пункту 2, причем композиция является эффективной против любого генотипа/генотипных вариантов/штаммов/синтетических вирусов Зика, имеющих в любом случае от 50% до 100% идентичности на аминокислотном уровне в любом участке генома.
4. Вакцинная композиция по пункту 3, содержащая антигены вируса Зика любого генотипа/генотипного варианта/штаммов/синтетического вируса Зика, причем антитела против какого-либо из указанных выше типов вируса Зика перекрестно нейтрализуют гомологический вирус или любой гетерологичный штамм вируса Зика, который имеет по меньшей мере 50% -100% аминокислотную идентичность в любом участке всего своего генома, в частности протеина оболочки Е.
5. Вакцинная композиция по пункту 1, причем антигены вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита представляют собой инаktivированные целые антигены вирионов (вирусы).
6. Вакцинная композиция по пункту 1, причем антигены вируса Зика и Чикунгунья представляют собой очищенные рекомбинантные антигены.
7. Вакцинная композиция по пункту 1, причем вирусный антиген Зика получают с использованием клеток Vero в качестве клеточного субстрата путем адаптации вируса к клеткам Vero.
8. Вакцинная композиция по пункту 1, причем указанный вирусный антиген Зика представляет собой очищенный и концентрированный антиген, полученный одним или несколькими способами, выбранными из:
 - a. ультрацентрифугирования;
 - b. центрифугирования по градиенту плотности;
 - c. осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации, с последующей очисткой с использованием колоночной хроматографии; и
 - d. тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 кДа до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инаktivации вируса.
9. Вакцинная композиция по пункту 8, причем указанная очистка с использованием колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, ионообменную колоночную хроматографию, афинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями.

10. Вакцинная композиция по пункту 9, причем колоночная хроматография элюирует большинство антигена вируса в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, причем вирусный образец очищен на колонке Capto Core 700 и элюирован в потоке.
11. Вакцинная композиция по пункту 5, причем вирус Зика инактивирован по меньшей мере одним или несколькими из химических инактивирующих агентов, физическими инактивирующими агентами и облучающими агентами.
12. Вакцинная композиция по пункту 11, причем инактивацию вируса Зика осуществляют перед или после очистки вируса.
13. Вакцинная композиция по пункту 12, причем вирус Зика инактивирован химическим инактивирующим агентом, выбранным из формалина (формальдегида), бета-пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.
14. Вакцинная композиция по пункту 13, причем вирус Зика инактивирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из:
 - e. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. формалин : вирус, при от 8⁰С до 37⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;
 - f. Обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. формалин : вирус, при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;
 - g. Бета-пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. BPL : вирус, в течение по меньшей мере 24 до 48 часов при температурах, которая находится в диапазоне от 8⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение 48 часов;
 - h. Бета-пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 (BPL : вирус, об./об.), при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере 3 - 7 дней;
 - i. Комбинации с BPL и формалином при любой из указанных выше условий, предпочтительно BPL инактивация при 1 : 3000 (BPL : вирус, об./об.) в течение 24 часов с последующей инактивацией формалином при 1 : 3000 (формалин : вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 часов при от 15⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С;
 - j. Пероксида водорода при любой концентрации, от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30⁰С в течение от 5 минут до 120 минут.
15. Вакцинная композиция по пункту 11, причем инактивация вируса Зика облучающим агентом включает инактивацию гамма-облучением путем экспозиции от 20 кГр (Кило Грей) вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 кГр до 30 кГр из ⁶⁰Со источника.
16. Вакцинная композиция по пункту 11, причем инактивация вируса Зика облучающим агентом включает инактивацию облучением УФ за счет экспозиции на 254 нм в течение 30 – 60 минут.

17. Вакцинная композиция по пункту 11, причем вирус инактивирован путем термической обработки при температуре от 50°C до 65°C в течение от 30 мин. вплоть до 2 часов.
18. Вакцинная композиция по пункту 1, причем буфер выбран из перечня, включающего фосфатный буфер, цитратный буфер, фосфатно-цитратный буфер, боратный буфер, буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris), сукцинатный буфер, буферы, содержащие глицин или гистидин, в качестве одного из буферных агентов.
19. Вакцинная композиция по пункту 18, причем фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер в концентрации от 5 мМ вплоть до 200 мМ фосфатных ионов при любом pH от 6,50 до pH 9, и необязательно, содержащий натрия хлорид в концентрации от 50 до 200 мМ.
20. Вакцинная композиция по пункту 1, причем буфер поддерживает pH в жидкой композиции выше pH 6,5, предпочтительно выше pH 7,0 по всему биопроцессу от вирусной культуры вплоть до получения очищенного инактивированного основного вируса.
21. Вакцинная композиция по пункту 11, причем инактивацию вируса Зика осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, изо-мальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций.
22. Вакцинная композиция по пункту 21, причем стабилизирующий агент выбран из:
 - a. 2% сорбита и 1% L-глицина;
 - b. 1% сорбита и 0,5 % L-глицина;
 - c. 1% маннита и 0,5% L-глицина;
 - d. 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; и
 - e. 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.
23. Вакцинная композиция по пункту 11, причем инактивация вируса Зика включает инактивацию любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц несущих любые антигены вируса Зика, в частности, E протеин в каком-либо гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частиц, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности генома любого вируса Зика.
24. Вакцинная композиция по пункту 6, причем очищенный рекомбинантный вирус Зика содержит антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (E), мембранный (M) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика.
25. Вакцинная композиция по пункту 24, причем вирус Зика имеет структурные протеиновые последовательности, как раскрыто в SEQ. ID No. 3 и SEQ. ID NO. 4, что соответствует нуклеотидным последовательностям SEQ ID. No. 1 и SEQ ID No.

- 2, соответственно, для применения в качестве вакцинных антигенов против вирусных инфекций Зика, вызванных генотипами или их вариантами.
26. Вакцинная композиция по пункту 6, причем рекомбинантные ДНК конструкции содержат (i) вектор, (ii) по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, который соответствует SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, кодирующей аминокислотную последовательность протеинов SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, соответственно, который применим к какой-либо протеиновой последовательности вируса Зика, имеющий по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность к указанным выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4.
27. Вакцинная композиция по пункту 26, содержащая рекомбинантный ДНК конструкт, причем вектор представляет собой эукариотический плазмидный вектор, клонированный в эукариотическом хозяине, таком как бакуловирус для экспрессии в клетках насекомых, как вирусоподобных частицах (VLP).
28. Вакцинная композиция по пункту 24, причем рекомбинантный протеин вируса Зика получен способом включающем стадии:
- а. трансфекции рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
 - б. сбора клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;
 - в. очистки протеина способом, выбранным из ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, афинной хроматографии, гидрофобной колоночной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом смол, диафильтрации, ультрацентрифугирования, центрифугирования по градиенту плотности и фракционирования с солью.
29. Вакцинная композиция по пункту 1, причем структурные антигены вируса Зика экспрессируются в каком-либо прокариотической или эукариотической системе экспрессирования, включающей экспрессию, опосредованную бакуловирусом в клетках насекомых.
30. Вакцинная композиция по пункту 1, причем композиция получена способом, причем нейтрализующие антитела в значительной степени индуцируются против протеина оболочки, например, в оптимально инактивированном вирусе, живом ослабленном вирусе, дезактивированном вирусе, ДНК вакцине, вирусоподобных частицах, химерных вирусных частицах, демонстрирующих протеин Е вируса Зика в любом гетерологичном вирусном скелете, такой как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.
31. Вакцинная композиция по пункту 1, дополнительно содержащая адъювант.
32. Вакцинная композиция по пункту 31, причем адъювант выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающие гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; б) инулина; в) альгамулина, представляющего собой комбинацию инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); е) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащая один или несколько из следующих компонентов: сквалена или его аналогов или любого фармацевтически приемлемого масла, твина-80, сорбиантриолеата, альфа-токоферола, холекальциферола и водного буфера, или любого из аналогов и

производных их молекул i) двух или более комбинаций из любого из указанных выше адъювантов, когда формулируется с антигенами вируса Зика вызывает иммунный ответ против вируса.

33. Вакцинная композиция по пункту 32, причем композиция содержит гидроксид алюминия в концентрации, находящейся в диапазоне от 0,1 мг до 1,5 мг алюминия на вакцинную дозу, предпочтительно от 0,25 мг до 0,5 мг алюминия на вакцинную дозу.
34. Вакцинная композиция по пункту 32, причем адъювант обеспечивает мукозный иммунитет и системный иммунитет при введении млекопитающим.
35. Вакцинная композиция по пункту 1, причем композиция с антигеном вируса Зика вводится у какой-либо дозе, находящейся в диапазоне от 0,125 мкг до 100 мкг на дозу с или без адъюванта, или как однократная доза или двумя или более дозами для индуцирования иммунного ответа у млекопитающего.
36. Способ индуцирования защитного иммунного ответа у млекопитающих, в том числе людей, включающий введение вакцинной композиции по пункту 1 каким-либо путем, включающим внутримышечный, интрадермальный, подкожный, внутривенный, пероральный, интраназальный или транскутанный способы введения.
37. Способ введения вакцинной композиции по пункту 1, где какой-либо способ включает иголки и шприцы, включающий предварительно заполненные шприцы, микроигольный пластырь, безигольный пластырь, ингаляционные и назальные спреи.
38. Способ применения *in vitro* или *in vivo* антител к вирусу Зика композиции по пункту 1 для получения иммунодиагностических и иммунотерапевтических агентов для вирусных инфекций Зика.
39. Вакцинная композиция по пункту 1, содержащая антигены вируса Зика и вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов.
40. Вакцинная композиция по пункту 39, причем антиген вируса Зика и инаktivированные антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, находящихся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта или с адъювантом.
41. Вакцинная композиция по пункту 40, причем адъювант выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающие гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, который представляет собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида A (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащая один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или какой-либо из аналогов и

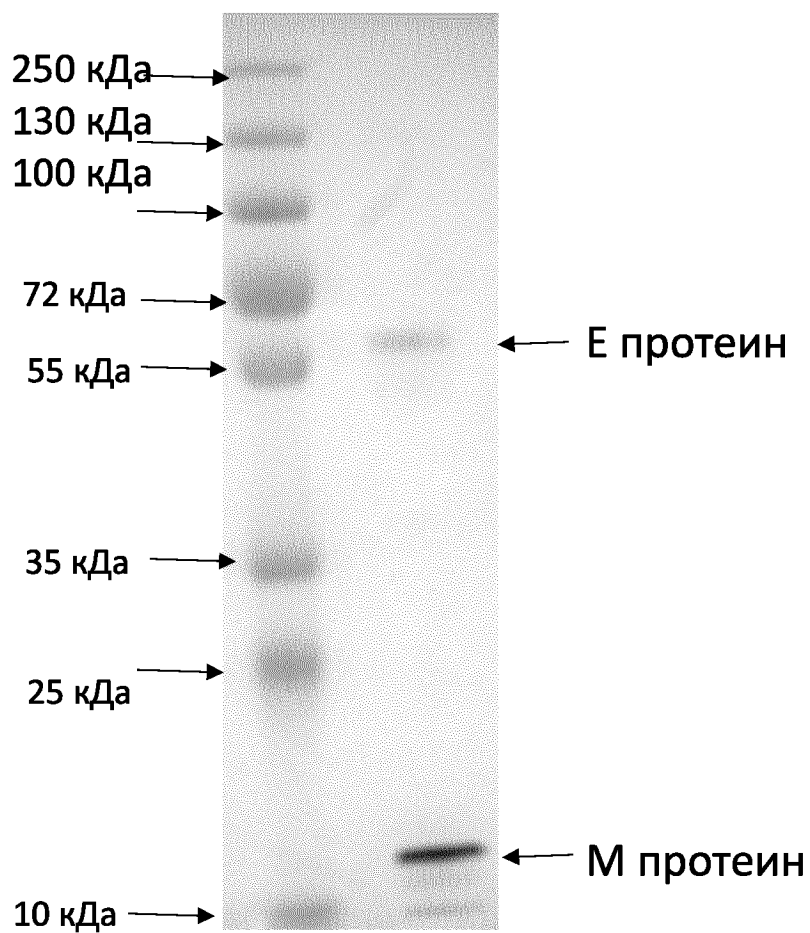
- производных их молекул i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, что вызывает иммунный ответ против вируса.
42. Вакцинная композиция по пункту 41, причем адъювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,0 мг на вакцинную дозу.
43. Вакцинная композиция по пункту 1, содержащая антигены вируса Зика и вируса Чикунгунья в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов.
44. Вакцинная композиция по пункту 43, причем антигены вируса Зика и Чикунгунья присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, находящихся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или с адъювантом.
45. Вакцинная композиция по пункту 44, причем адъювант выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; б) инулина; в) альгамулина, который представляет собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащая один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или какой-либо из аналогов и производных их молекул, i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, что вызывает иммунный ответ против вируса.
46. Вакцинная композиция по пункту 45, причем адъювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,5 мг на вакцинную дозу.
47. Вакцинная композиция по пункту 1, содержащая антигены вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов.
48. Вакцинная композиция по пункту 47, причем антигены вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, находящихся в диапазоне от 5 мкг до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или с адъювантом.
49. Вакцинная композиция по пункту 48, причем адъювант выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; б) инулина; в) альгамулина, который представляет собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида

алюминия с MPL; к) любой эмульсии вода-в-масле; л) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, альфа-токоферол, холекальциферол и водный буфер, или какой-либо из аналогов и производных их молекул и) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, что вызывает иммунный ответ против вируса.

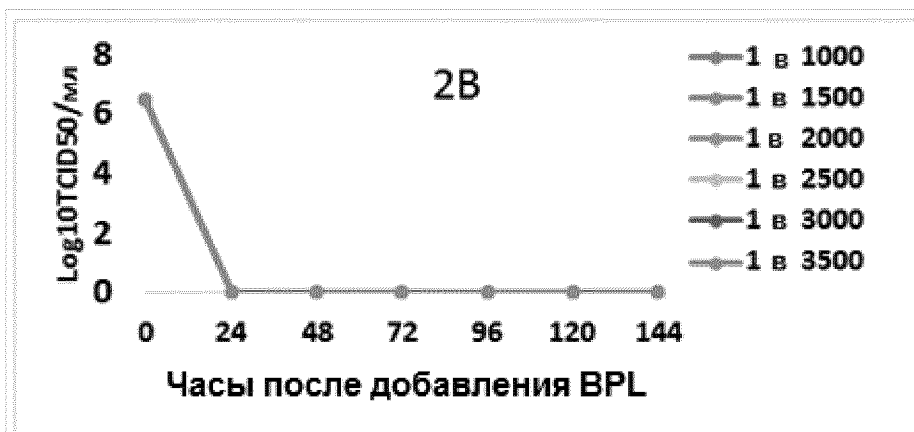
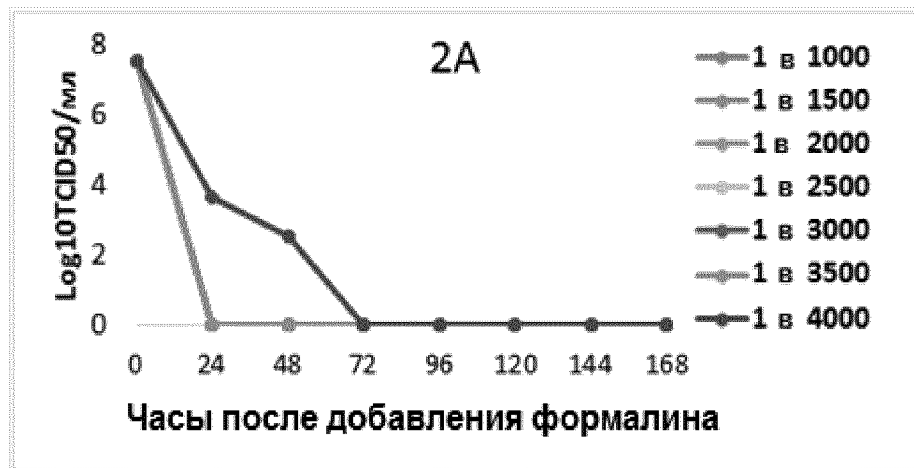
50. Вакцинная композиция по пункту 49, причем адъювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 мг до 1,0 мг на вакцинную дозу.
51. Вакцинная композиция по пункту 1, причем композиция необязательно содержит 2-феноксизтанольный консервант в концентрации от 2,5 до 5 мг/мл.
52. Вакцинная композиция по пункту 1, при введении в однократной дозе или двумя или более дозами у млекопитающих вызывает как Th1, так и Th2 иммунный ответ против какого-либо из антигенов арбовируса, включающий вирус Зика, вирус Чикунгунья и вирус японского энцефалита и является приемлемым для введения людям.
53. Способ получения вакцинной композиции, содержащей один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, где способ включает одну или несколько стадий из инактивации, продуцирования рекомбинантного протеина, экспрессирования структурных антигенов, очистки и концентрации вирусного антигена, причем указанные очистка и концентрация вируса Зика включает одну или несколько стадий, выбранных из:
 - a. ультрацентрифугирования;
 - b. центрифугирования по градиенту плотности;
 - c. осветление собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации;
 - d. очистки с использованием колоночной хроматографии;
 - e. тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 кДа до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед или после инактивации вируса.
54. Способ по пункту 53, причем способ колоночной хроматографии включает гелевую фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, какую-либо ионообменную колоночную хроматографию, афинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями.
55. Способ по пункту 53, причем очистка включает очистку способом колоночной хроматографии, которая элюирует большинство вирусного антигена в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, причем вирусный образец очищен на колонке Capto Core 700 и элюирован в потоке.
56. Способ по пункту 53, причем вирус Зика инактивирован с использованием одного или нескольких инактивирующих агентов, выбранных из химического инактивирующего агента, физического инактивирующего агента и облучающего агента.

57. Способ по пункту 53, причем инактивацию вируса Зика осуществляют перед или после очистки вируса.
58. Способ по пункту 57, причем вирус Зика инаktivирован с помощью химического инаktivирующего агента, выбранного из формалина (формальдегида), бета-пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.
59. Способ по пункту 56, причем основной вирус Зика инаktivирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из:
- a. Обработки формалином при любой концентрации, находящейся в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. формалин : вирус, при от 8⁰С до 37⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;
 - b. Обработки формалином при любой концентрации, находящейся в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. формалин : вирус, при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;
 - c. Бета-пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, находящейся в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 об./об. BPL : вирус, в течение по меньшей мере от 24 до 48 часов, если не более, при температурах, которые находятся в диапазоне от 8⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С, в течение 48 часов;
 - d. Бета-пропиолактона при любой концентрации, находящейся в диапазоне от 1 : 500 вплоть до 1 : 4000 (BPL : вирус, об./об.), при от 2⁰С до 8⁰С в течение по меньшей мере от 3 до 7 дней;
 - e. Комбинации BPL и формалина по любым из указанных выше условий, предпочтительно BPL инаktivация при 1:3000 (BPL : вирус, об./об.) в течение 24 часов с последующей инаktivацией формалином при 1 : 3000 (формалин : вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 часов при от 15⁰С до 30⁰С, предпочтительно 25±3⁰С;
 - f. Пероксида водорода при любой концентрации, от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30⁰С в течение от 5 минут до 120 минут.
60. Способ по пункту 56, причем вирус инаktivирован гамма-облучением за счет экспозиции от 20 кГр (Кило Грей) вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 кГр до 30 кГр из ⁶⁰Со источника.
61. Способ по пункту 56, причем вирус Зика инаktivирован облучением УФ за счет экспозиции при 254 нм в течение 30 – 60 минут.
62. Способ по пункту 56, причем вирус Зика инаktivирован за счет термической обработки от 50⁰С до 65⁰С в течение от 30 мин. Вплоть до 2 часов, предпочтительно, 65⁰С в течение 1 часа.
63. Способ по пункту 56, причем инаktivацию осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, изо-мальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций.
64. Способ по пункту 63, причем стабилизирующий агент выбран из:
- a. 2% сорбита и 1% L-глицина;

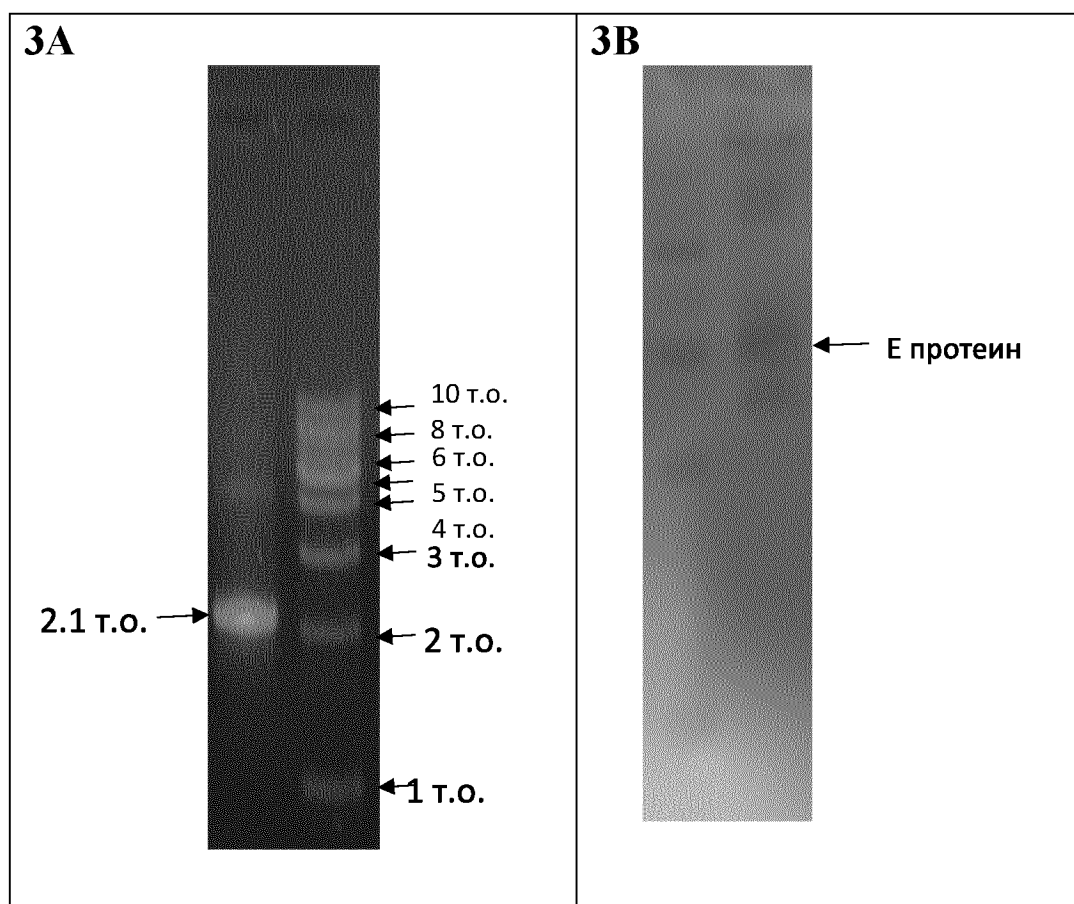
- b. 1% сорбита и 0,5 % L-глицина;
 - c. 1% маннита и 0,5% L-глицина;
 - d. 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; и
 - e. 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.
65. Способ по пункту 56, причем способы инактивации применимы к вирусу Зика любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности, протеин Е в любом гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности генома любого вируса Зика.
66. Способ по пункту 53, причем способ продуцирования рекомбинантного протеина включает стадии:
- a. трансфекции рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
 - b. сбора клеток и выделения рекомбинантного протеина из них;
 - c. очистки протеина по меньшей мере одним из способов, включающих ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, афинную хроматографию, гидрофобную колоночную хроматографию, хроматографию со смешанным режимом смол, диафильтрацию, ультрацентрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности, фракционирование с солью.
67. Способ по пункту 53, причем способ экспрессирования структурных антигенов вируса Зика включает системы экспрессирования, которые являются какими-либо прокариотическими или эукариотическими системами экспрессирования, включающей экспрессию, опосредованную бакуловирусом в клетках насекомых.
68. Способ по пункту 53, причем способ включает нейтрализующие антитела, которые предпочтительно индуцируются против протеина оболочки, такого как в оптимально инактивированном вирусе, живом ослабленном вирусе, дезактивированном вирусе, ДНК вакцине, вирусоподобных частицах, химерных вирусных частицах, демонстрирующих протеин Е вируса Зика в каком-либо гетерологичном вирусном скелете, например, в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.
69. Вакцинная композиция по пункту 1, причем композиция вводится прайм-буст стратегией, причем первичной является кандидатная инактивированная вакцина, и буст является или той же вакциной или какой-либо иной вакциной, такой как ДНК вакцина, вакцина химерного вируса Зика, вирусоподобная частица, дезактивированная вакцина Зика, живая ослабленная вирусная вакцина, рекомбинантная субединичная вакцина, векторная вакцина или какая-либо вакцина, полученная из синтетического вируса Зика, причем нейтрализующие антитела в каждом из них индуцируются против протеина оболочки вируса Зика.



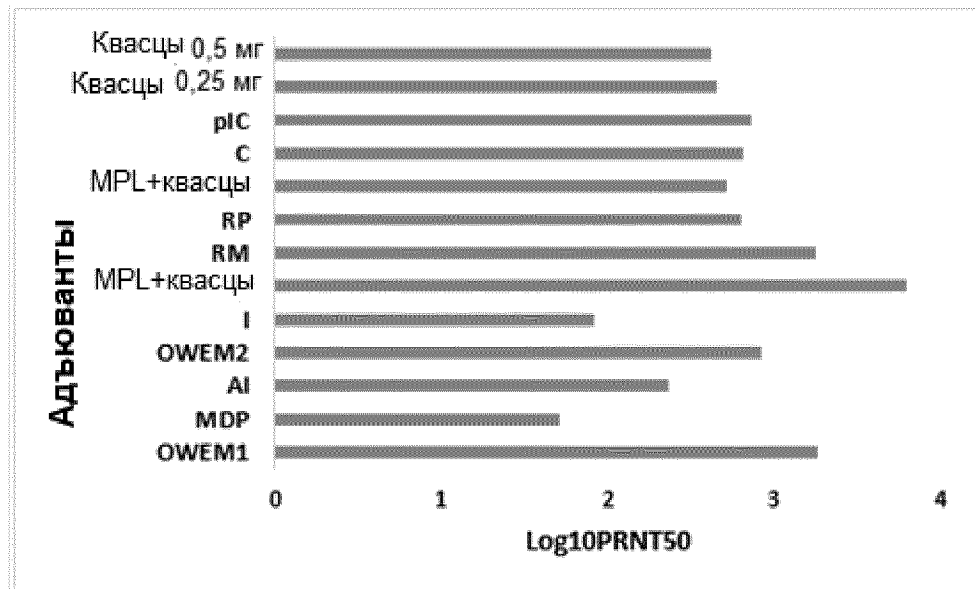
Фигура 1



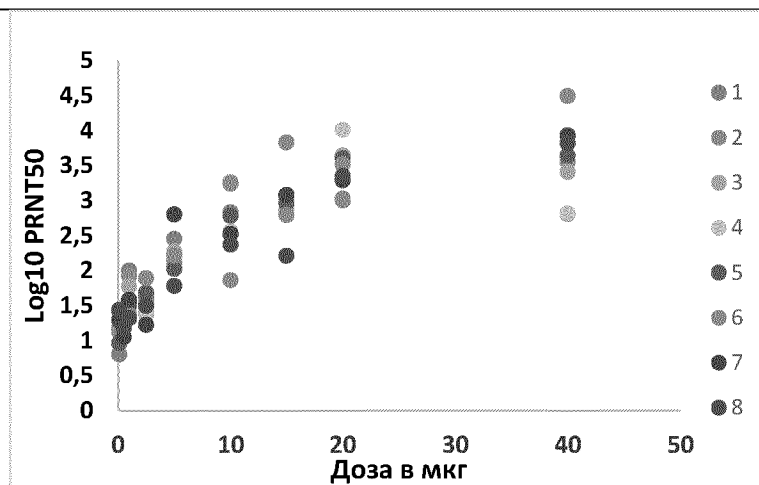
Фигура 2



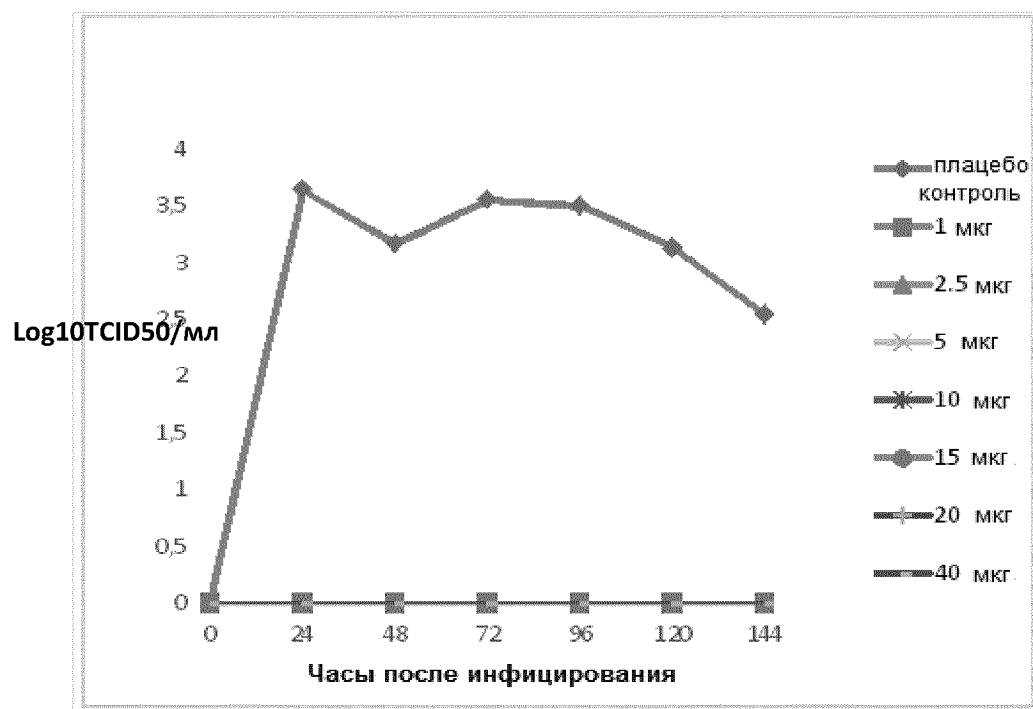
Фигура 3



Фигура 4

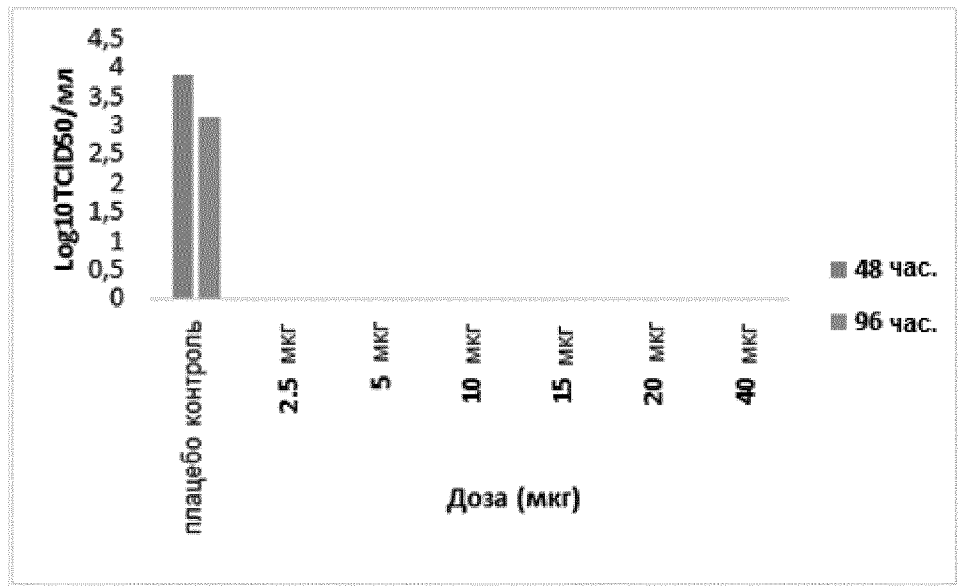


5A

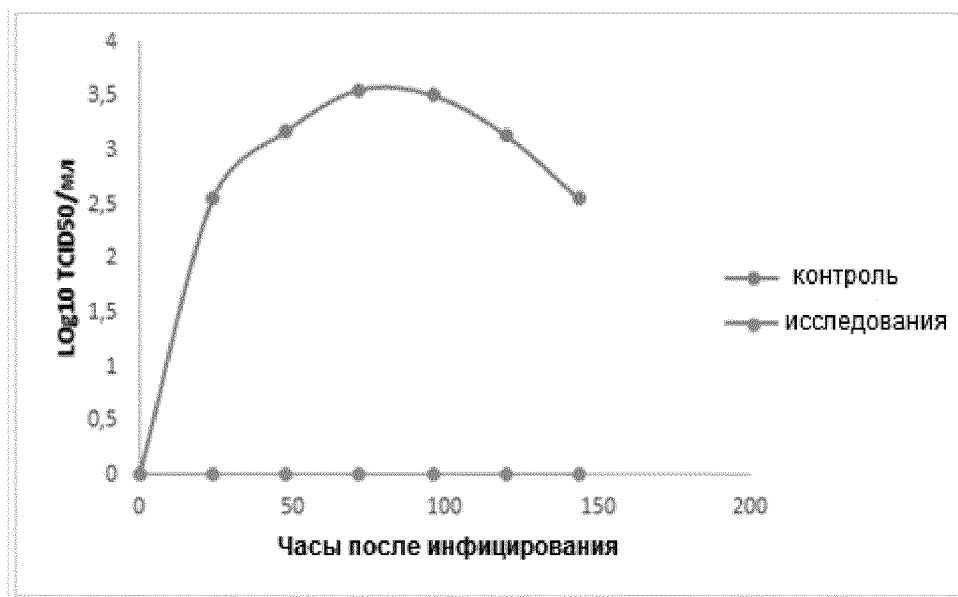


5B

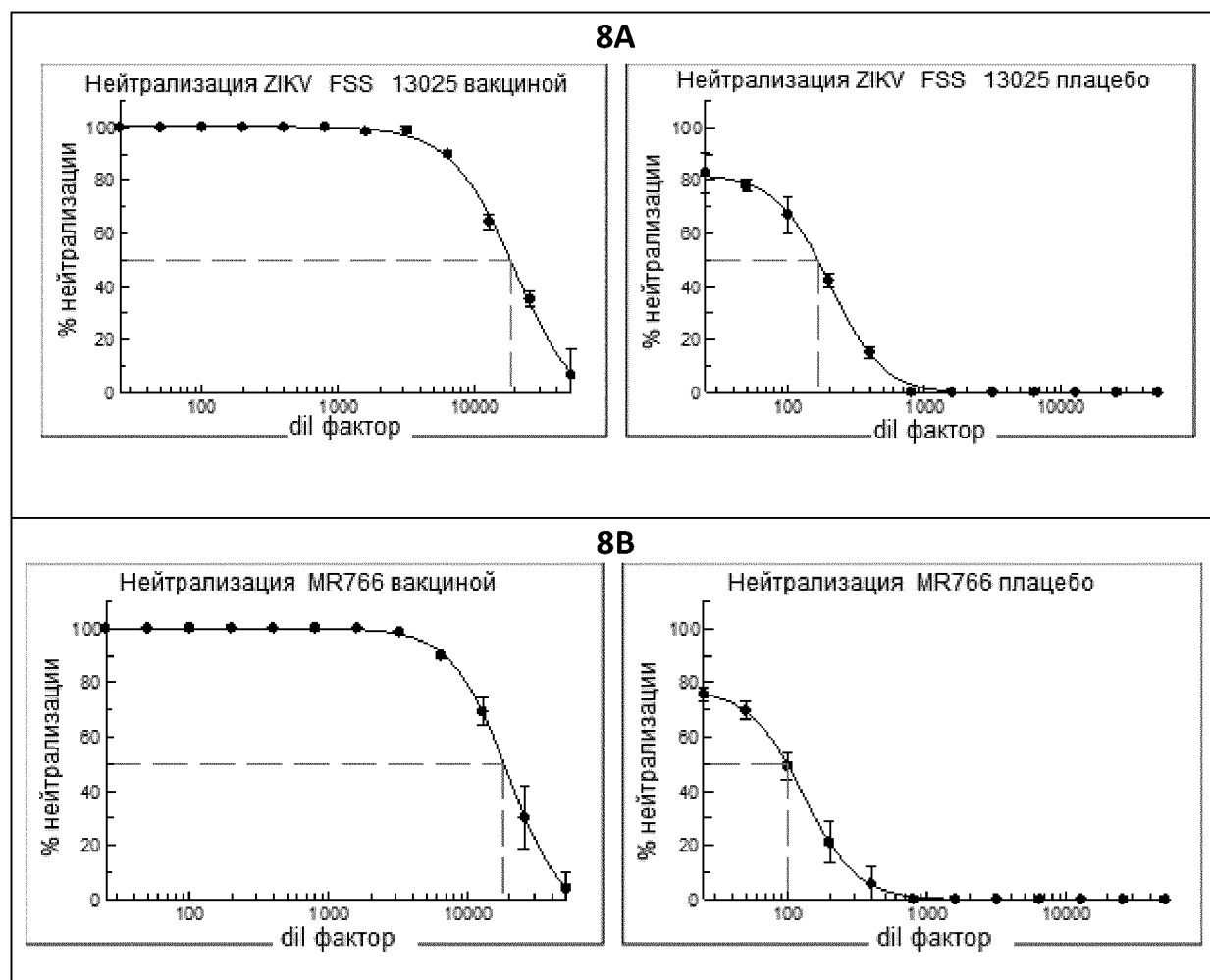
Фигура 5



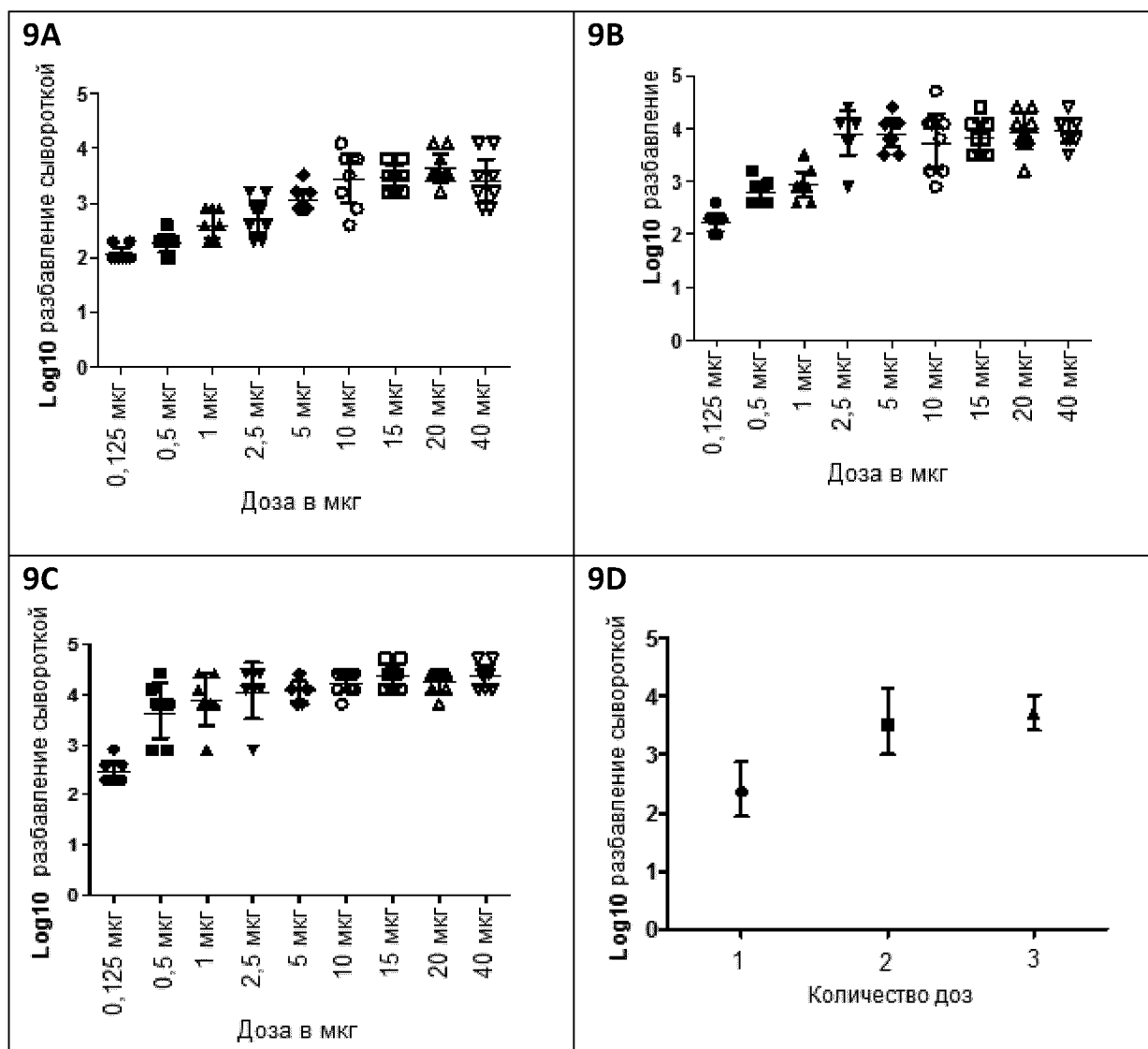
Фигура 6



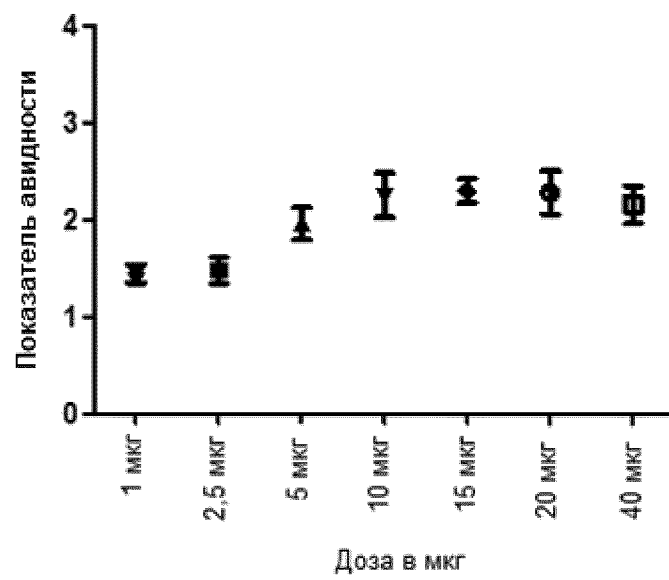
Фигура 7



Фигура 8

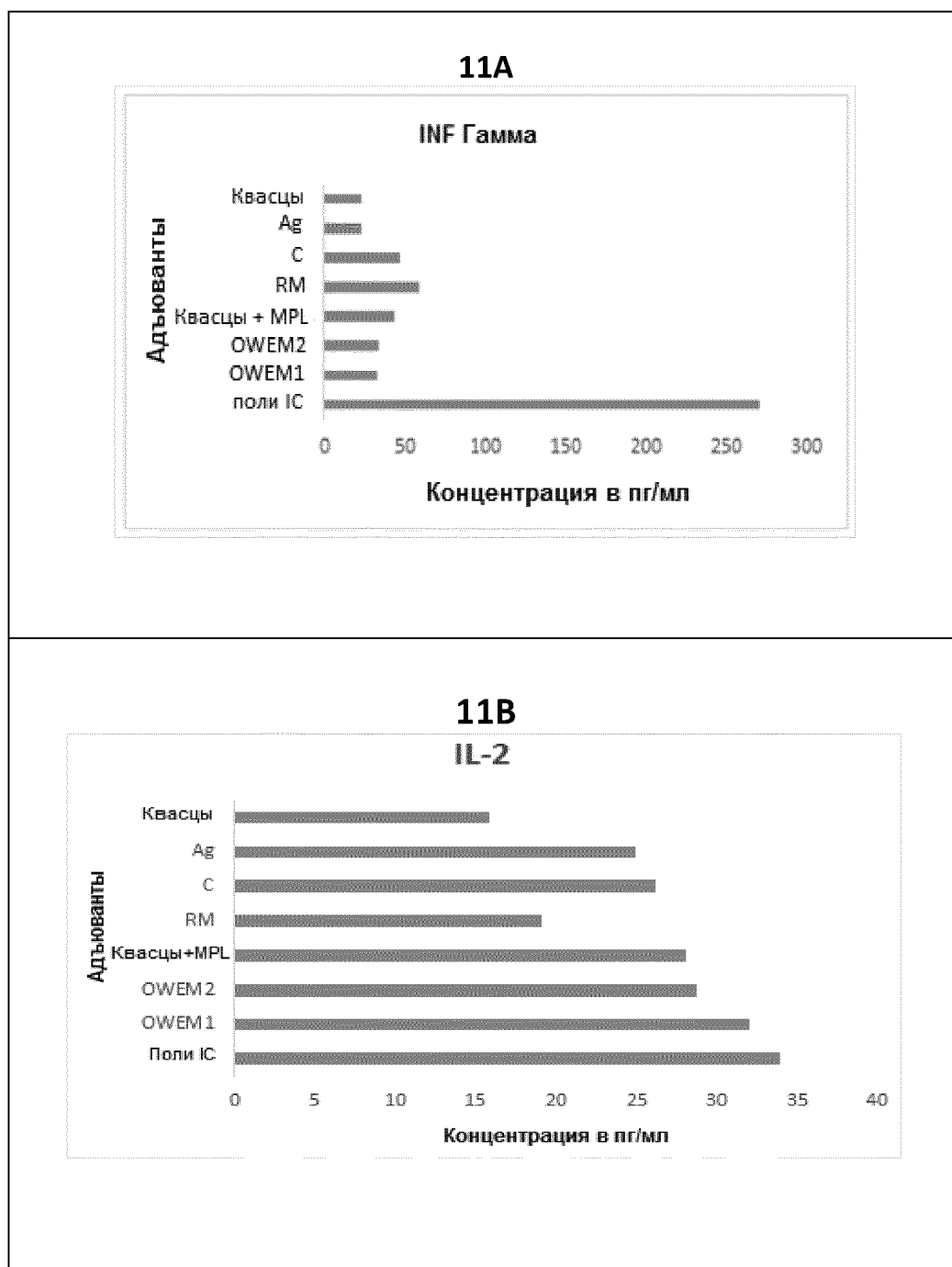


Фигура 9

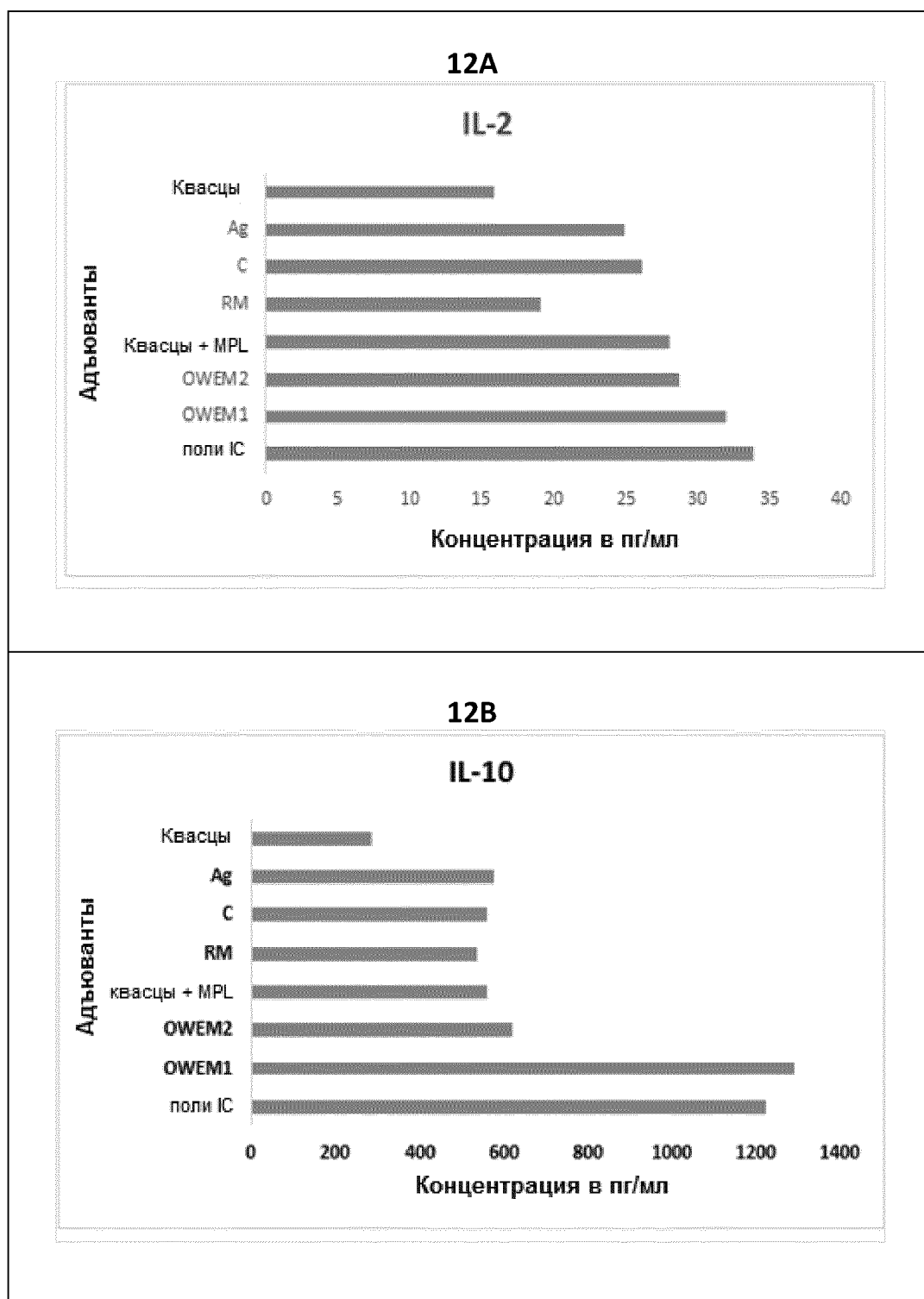


Фигура 10

11/12



Фигура 11



Фигура 12