



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.25

(21) Номер заявки
201790517

(22) Дата подачи заявки
2015.09.03

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

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ЗАЩИТНОГО
ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ФИЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

(31) 62/045,522; 62/116,021; 62/189,109

(32) 2014.09.03; 2015.02.13; 2015.07.06

(33) US

(43) 2017.07.31

(86) PCT/US2015/048357

(87) WO 2016/036955 2016.03.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**БАВАРИАН НОРДИК А/С (ДК);
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (НЛ); ДЗЕ
ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ ЭМЕРИКА,
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ДЗЕ
СЕКРЕТЭРИ, ДИПАРТМЕНТ ОФ
ХЕЛТ ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСИЗ
(US)**

(72) Изобретатель:

**Фолькманн Ариане, Штайгервальд
Робин, Дирмайер Ульрике (ДЕ), Пау
Мария Грация, Каллендре Бенуа
Кристоф Стефан (НЛ), Вард Люси А.
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2014037124

BAROUCH DAN H. ET AL.: "Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys (+methods)", NATURE, vol. 482, no. 7383, 2 February 2012 (2012-02-02), pages 89-93+1, XP002751728, ISSN: 1476-4687 page 98, left-hand column; figure 1 p. 92, right col.

GILBERT S. C. ET AL.: "Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimens", VACCINE, vol. 20, no. 7-8, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 1039-1045, XP004332973, ELSEVIER LTD, GB ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00450-9 table 1

ROSHORM YAOWALUCK ET AL.: "T cells induced by recombinant chimpanzee adenovirus alone and in prime-boost regimens decrease chimeric EcoHIV/NDK challenge virus load", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 42, no. 12, December 2012

(2012-12), pages 3243-3255, XP002751729, ISSN: 1521-4141 page 3246, right-hand column; figure 3

SUBBOTINA E. ET AL.: "Genetic factors of Ebola virus virulence in guinea pigs", VIRUS RESEARCH, vol. 153, no. 1, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 121-133, XP027307246, ISSN: 0168-1702 [retrieved on 2010-09-21] abstract & DATABASE UniProt [Online] 5 February 2008 (2008-02-05), "SubName: Full = GP1,2 {ECO:0000313:EMBL:AH70246.1}; SubName: Full = Virion spike glycoprotein {ECO:0000313:EMBL:ABX75367.1}", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A9QPL9 Database accession no. A9QPL9 sequence

SANCHEZ ANTHONY ET AL.: "Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 19, October 2004 (2004-10), pages 10370-10377, XP002751730, ISSN: 0022-538X abstract & DATABASE UniProt [Online] 5 February 2008 (2008-02-05), "RecName: Full=Envelope glycoprotein; AltName: Full=GP1,2; Short=GP; Contains:RecName: Full=GP1; Contains: RecName:Full=GP2;", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q7T9D9 Database accession no. Q7T9D9 sequence

TOWNER JONATHAN S. ET AL.: "Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 13, July 2006 (2006-07), pages 6497-6516, XP002751731, ISSN: 0022-538X abstract & DATABASE UniProt [Online] 15 January 2008 (2008-01-15), "RecName: Full=Envelope glycoprotein; AltName: Full=GP1,2; Short=GP; AltName:Full=Virion spike glycoprotein; Contains:RecName: Full=GP1; Contains:", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q1PD50 Database accession no. Q1PD50 sequence

ENTERLEIN SVEN ET AL.: "Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 2, January 2006 (2006-01), pages 1038-1043, XP002751732, ISSN: 0022-538X abstract & DATABASE UniProt [Online] 1 February 1994 (1994-02-01), "RecName: Full=Envelope glycoprotein; AltName: Full=GP1,2; Short=GP; AltName:Full=Virion spike glycoprotein; Contains:RecName: Full=GP1; Contains:", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P35253 Database accession no. P35253 sequence

JONATHAN S. TOWNER ET AL.: "Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda", PLOS PATHOGENS, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US vol. 4, no. 11, E1000212, 1 November 2008

(2008-11-01), pages 1-6, XP002669470, ISSN: 1553-7374, DOI:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000212 Retrieved from the Internet:URL: <http://www.plospathogens.Org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000212> [retrieved on 2008-11-21] abstract & DATABASE UniProt [Online] 3 March 2009 (2009-03-03), "SubName: Full=NP {ECO:0000313:EMBL:ACI28629.1}";", retrieved from EBI accession no.UNIPROT:B8XCN6 Database accession no. B8XCN6 sequence

GEISBERT THOMAS W. ET AL.: "Recombinant Adenovirus Serotype 26 (Ad26) and Ad35 Vaccine Vectors Bypass Immunity to Ad5 and Protect Nonhuman Primates against Ebolavirus Challenge", JOURNAL OF

VIROLOGY, vol. 85, no. 9, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 4222-4233, XP009150003, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02407-10 page 4223, left-hand column; figure 6; table 1

WANG D. ET AL.: "De novo syntheses of Marburg virus antigens from adenovirus vectors induce potent humoral and cellular immune responses", VACCINE, vol. 24, no. 15, 5 April 2006 (2006-04-05), pages 2975-2986, XP028011177, ELSEVIER LTD, GB ISSN: 0264-410X, DOI:10.1016/J.VACCINE.2005.11.046 [retrieved on 2006-04-05] paragraph [02.2]; figures 1, 6

-
- (57) В изобретении предлагаются композиции, вакцины и способы индуцирования защитного иммунитета против филовирусной инфекции, в частности, защитного иммунитета против инфекции, вызванной одним или более подтипами Эболавируса и вирусом Марбург.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, вакцинам и способам индуцирования защитного иммунитета против филовиральной инфекции, в частности, защитного иммунитета против инфекции, вызванной одним или более подтипами Эболавируса и вирусом Марбург.

Уровень техники

Эболавирусы, такие как эболавирус Заир (EBOV) и эболавирус Судан (SUDV), а также близкородственный вирус Марбург (MARV), ассоциируются со вспышками высоколетальной геморрагической лихорадки Эбола (ГЛЭ) у человека и приматов в Северной Америке, Европе и Африке. Эти вирусы относятся к семейству филовирусов, которые известны своей способностью инфицировать людей и нечеловекообразных приматов с серьезными последствиями для здоровья, включая смерть. Уровень смертности у людей, в результате филовиральных инфекций составляет до 90%. EBOV-, SUDV-и MARV-инфекции являются причиной ГЛЭ с наступлением смертельного исхода, как правило, в пределах от 7 до 10 дней после инфицирования. ГЛЭ представляет собой острый лихорадочный синдром, который проявляется высокой лихорадкой, тошнотой, рвотой, диареей, макулопапулезной сыпью, недомоганием, сильно выраженной слабостью, генерализованными признаками повышенной проницаемости сосудов, нарушением свертывания крови, а также нарушением регуляции врожденного иммунного ответа. По-видимому, патогенез заболевания в большей части обусловлен нарушением регуляции врожденного иммунного ответа на инфекцию и репликацией вируса в эндотелиальных клетках сосудов, что приводит к гибели клеток-хозяев, а также к разрушению эндотелиального барьера. Филовirusы могут распространяться малыми аэрозольными частицами или при непосредственном контакте с инфицированной кровью, органами и биологическими жидкостями организма человека или нечеловекообразного примата (НЧП). Сообщается, что для развития геморрагической лихорадки Эбола (ГЛЭ) в организме человека достаточно инфицирования одним вирионом. В настоящее время не существует одобренных лекарственных препаратов или вакцин для лечения или профилактики ГЛЭ. Поддерживающее лечение остается единственной одобренной медицинской помощью для индивидуумов, инфицированных филовirusами.

Являясь причиной тяжелого заболевания человека, филовirusы продолжают вызывать беспокойство как источник природных инфекций, а также как возможный агент для биотерроризма. Резервуар филовирусов в дикой природе окончательно не идентифицирован. Описаны четыре подтипа эболавирусов, вызывающих ГЛЭ, т.е. тех, которые являлись причиной случаев заболевания в Заире, Судане, Бундибуджио и Кот-д'Ивуар (Sanchez, A. et al., 1996 PNAS USA 93:3602-3607). Эти подтипы эболавирусов имеют схожую генетическую архитектуру, например, все они являются отрицательно-цепочечными РНК-вирусами, содержащими семь линейно выстроенных генов. Структурные генные продукты включают, например, гликопротеиновую оболочку, которая существует в двух альтернативных формах: секретируемый растворимый гликопротеин (срГП) и трансмембранный гликопротеин (ГП), сгенерированных с помощью редактирования РНК, которая опосредует проникновение вируса (Sanchez, et al., 1996PNAS USA 93:3602-3607).

Высказано предположение, что иммунизация может быть пригодной для защиты от инфекции Эбола, поскольку, как представляется, среди подтипов вируса Эбола существует меньший нуклеотидный полиморфизм, чем среди других РНК-содержащих вирусов (Sanchez et al., 1996 PNAS USA 93:3602-3607). До недавнего времени разработки профилактических вакцин против филовирусов не имели каких-либо существенных результатов, отчасти потому, что механизмы защитных иммунных ответов против филовиральных инфекций являются недостаточно изученными. Кроме того, большое количество филовирусов, циркулирующих в естественных резервуарах, затрудняет разработку вакцины, которая защищала бы от всех видов филовирусов.

В настоящее время существует несколько платформ доставки вакцинного антигена, продемонстрировавшие различные уровни защиты в нечеловекообразных приматов (НЧП), инфицированных высокими дозами филовирусов. Вакцины-кандидаты разрабатываются на основе различных базовых технологий, включая репликацию компетентных векторов (например, вируса везикулярного стоматита; вируса бешенства; вируса парагриппа); репликацию некомпетентных векторов (аденовируса, модифицированного вируса осповакцины Анкара); субъединицы белка, включая вирусоподобные частицы, экспрессированные в бактериальных клетках, клетках насекомых, клетках млекопитающих, клетках растений; ДНК-вакцины; и/или живого и убитого аттенуированного филовируса (Friedrich et al., 2012). Гликопротеин ГП вируса EBOV является важным компонентом вакцины, которая защищает от воздействия аналогичных видов EBOV. Кроме того, включение ГП от EBOV и SUDV, двух наиболее вирулентных видов эболавирусов, может защитить обезьян от воздействия EBOV и SUDV, вводимых внутримышечно, а также воздействия дальнеродственных видов вируса Бундибуджио (BDBV), эболавируса леса Таи (TAFV, ранее известного как вирус Берега Слоновой Кости или Кот-д'Ивуар). Кроме того, включение ГП от MARV может защитить обезьян от воздействия MARV, вводимого внутримышечно и аэрозольно. Первоочередной задачей является разработка мер медицинской защиты от этих вирусов, в частности, разработка ПАН-филовиральной вакцины, представляющей собой вакцину, которая защищает от всех патогенных филовирусов.

Аденовирусные векторы с дефектной репликацией (rAd) являются мощными индукторами клеточ-

ного иммунного ответа, и поэтому могут быть пригодными векторами для генноинженерных вакцин, особенно для лентивирусов и филовирюсов, а также других невирусных патогенов (Shiver, et al. (2002) *Nature* 415(6869): 331-5; (Hill, et al., *Hum Vaccin* 6(1): 78-83; Sullivan, et al.(2000) *Nature* 408(6812): 605-9; Sullivan et al. (2003) *Nature* 424(6949): 681-4; Sullivan, et al. (2006) *PLoS Med* 3(6): e177; Radosevic, et al. (2007); Santra, et al. (2009) *Vaccine* 27(42): 5837-45.

Вакцины на основе аденовирусов имеют ряд преимуществ в качестве вакцин для человека, поскольку они могут быть произведены в высоких титрах в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (НПП) и доказали свою безопасность и иммуногенность у человека (Asmuth, et al., *J Infect Dis* 201(1): 132-41; Kibuuka, et al., *J Infect Dis* 201(4):600-7; Koup, et al., *PLoS One* 5(2): e9015.; Catanzaro, et al., (2006) *J Infect Dis* 194(12):1638-49; Harro, et al. (2009) *Clin Vaccine Immunol* 16(9): 1285-92. Наряду с тем, что большая часть первоначальной работы над вакциной проведена с использованием rAd5, учитывая его выраженную активность в выявлении открытого антитела и ответов CD8+ Т-клеток, предварительно существующий иммунитет к rAd5 в организме человека может ограничить эффективность (Catanzaro, (2006); Cheng, et al. (2007) *PLoS Pathog* 3(2): e25.; McCoy, et al. (2007) *J Virol* 81(12): 6594-604.; Buchbinder, et al. (2008) *Lancet* 372(9653): 1881-93). Это свойство может ограничить использование rAd5 в клинической практике для многих вакцин, которые находятся в стадии разработки, включая вакцины против Эболавируса (EBOV) и вируса Марбург (MARV).

Аденовирусные векторы с дефектной репликацией: rAd26 и rAd35, полученные из серотипа 26 и серотипа 35 аденовируса, соответственно, имеют возможность уклоняться от предварительно существующего иммунитета к Ad5. rAd26-векторы можно культивировать до высоких титров в Ad5 E1-комплементарных клеточных линиях, пригодных для изготовления таких векторов в крупных масштабах и для клинического применения (Abbink, et al. 2007), а также было показано, что эти векторы индуцируют гуморальный и клеточный иммунный ответ в стратегии вакцинации "прайм-буст" (Abbink, et al., 2007; Liu, et al. (2009) *Nature* 457(7225):87-91). rAd35-векторы культивируют до высоких титров в клеточных линиях, пригодных для вакцин для клинического применения (Abbink, et al. (2006) *J Gen Virol* 87 (Pt 8): 2135-43), и выпускают в форме инъекций, а также стабильного ингаляционного порошка (Jin, et al., *Vaccine* 28(27): 4369-75). Эти векторы демонстрируют эффективную трансдукцию дендритных клеток человека (de Gruijl, et al. (2006) *J Immunol* 177(4): 2208-15; Lore, et al. (2007) *J Immunol* 179(3): 1721-9), и таким образом имеют возможность опосредовать высокоуровневую доставку и презентацию антигена.

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) является родственным с вирусом осповакцины, представителем рода ортопоксвирусов в семействе Poxviridae. Известно, что поксвирусы являются хорошими индукторами ответов CD8-Т-клеток из-за их внутрицитоплазматической экспрессии. Тем не менее, они, как правило, рассматриваются как слабые элементы для генерации Т-клеток CD4, рестриктированных классом II главного комплекса гистосовместимости (МНС) (см., например, Haslett et al., *Journal of Infectious Diseases* 181: 1264-72 (2000), page 1268). MVA разработан для использования в качестве вирусного вектора для экспрессии рекомбинантного гена или в качестве рекомбинантной вакцины.

Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были разработаны Bavarian Nordic. MVA дополнительно культивирован компанией Bavarian Nordic и обозначен как MVA-BN, репрезентативный образец которого был сдан на хранение 30 августа 2000 года в Европейскую коллекцию клеточных культур (ECACC) под регистрационным №. V00083008. MVA-BN, дополнительно описан в публикациях WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

MVA-BN можно прикрепить и ввести в человеческие клетки, в которых гены, закодированные вирусом, экспрессируются очень эффективно. MVA-BN является репликативно некомпетентным, а это означает, что вирус не размножается в клетках человека. В клетках человека вирусные гены экспрессируются, и не образуется ни один патогенный вирус. По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний в Соединенных Штатах для организма MVA-BN классифицируется как уровень 1 биологической безопасности. Препараты MVA-BN и его производные вводили многим видам животных, а также более 2000 человеческим субъектам, включая индивидуумов с иммунной недостаточностью. Все вакцинации оказались в целом безопасны и хорошо переносились. Несмотря на высокую аттенуацию и сниженную вирулентность, в доклинических исследованиях было показано, что MVA-BN вызывает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на вирус осповакцины и гетерологичные генные продукты, кодируемые генами, клонированными в геноме MVA [E. Harrer et al. (2005), *Antivir. Ther.* 10 (2) :285-300; A. Cosma et al. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14 (14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10 (16) :5381-5390].

Существует неудовлетворенная потребность в улучшенных вакцинах, которые вызывают иммунный ответ на филовирюсы, в частности, защитный иммунитет против более смертельных Эболавирусов и вирусов Марбург.

Краткое описание сущности изобретения

В настоящем изобретении обнаружено, что различные комбинации "прайм-буст" репликативно некомпетентных векторов генерируют эффективную иммунную защиту против филовирюсной инфекции.

Соответственно, один общий аспект настоящего изобретения относится к комбинированной вакцине, содержащей:

(i) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса или по существу аналогичный антигенный белок, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

(ii) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух подтипов филовируса или по существу аналогичные антигенные белки, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом одна из композиций представляет собой "прайм"-композицию, а другая композиция представляет собой "буст"-композицию.

Другой общий аспект настоящего изобретения относится к применению первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса или по существу аналогичный антигенный белок; и второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере двух подтипов филовируса или по существу аналогичные антигенные белки; для выработки защитного иммунного ответа на по меньшей мере один из подтипов филовируса; при этом первую и вторую композиции используют для указанного "прайм"- или "буст"- иммунного ответа.

В определенных вариантах реализации изобретения первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса. В других вариантах реализации изобретения первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

Согласно настоящему изобретению подтипы филовируса могут быть любым подтипом филовируса.

В предпочтительном варианте реализации изобретения первый, второй и третий подтипы филовируса выбирают из группы, состоящей из подтипов Заир, Судан, Рестон, Бундибуджио, леса Таи и Марбург. Антигенные белки могут быть любым белком из любого филовируса, содержащего антигенную детерминанту. В предпочтительном варианте реализации изобретения антигенные белки представляют собой гликопротеины или нуклеопротеины. Антигенные белки, кодируемые аденовирусными векторами или MVA-векторами, содержащимися в первом и втором растворе в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой любой антигенный белок из любого филовируса. В предпочтительном варианте реализации изобретения антигенные белки первого, второго и третьего типа филовируса выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. В предпочтительном варианте реализации изобретения первый, второй и третий подтип филовируса не является одним и тем же.

В другом варианте реализации изобретения аденовирусный вектор в первой композиции (i) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, имеющий отличительную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. Предпочтительно, композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, имеющий дополнительную отличительную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусный вектор в первой композиции (i) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 2. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 3.

В еще одном предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере четырех подтипов филовируса. Предпочтительно, указанный MVA-вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

Предполагается, что способы, вакцины и композиции, описанные в данном документе, могут быть воплощены в наборе. Например, в одном варианте реализации настоящее изобретение может включать набор, содержащий:

(i) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество аденовирусного

вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса или по существу аналогичный антигенный белок, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

(ii) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух подтипов филовируса или по существу аналогичные антигенные белки, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом одна из композиций представляет собой "прайм"-композицию, а другая композиция представляет собой "буст"-композицию.

Поэтому в предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к комбинированной вакцине, набору или применению, при этом аденовирусный вектор в первой композиции (i) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1; и при этом MVA-вектор в композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к комбинированной вакцине, набору или применению, при этом первая композиция содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую первый антигенный белок с SEQ ID NO: 1, аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую второй антигенный белок с SEQ ID NO: 2, аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую третий антигенный белок с SEQ ID NO: 3; и при этом MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусные векторы, содержащиеся в комбинированной вакцине, наборе по настоящему изобретению, или аденовирусные векторы, используемые для создания защитного иммунного ответа на по меньшей мере один из подтипов филовируса, представляют собой гAd26- или гAd35-векторы. В предпочтительном варианте реализации данного применения "буст"-композицию вводят через 1-12 недель после "прайм"-композиции.

Один дополнительный общий аспект настоящего изобретения относится к способу индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, причем указанный способ включает:

а) введение субъекту первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный гликопротеин первого подтипа филовируса или по существу аналогичный антигенный белок; и

б) введение субъекту второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух штаммов филовируса или по существу аналогичные антигенные белки;

при этом этапы (а) и (б) осуществляют в любом порядке.

В определенных вариантах реализации изобретения первая композиция дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса. В других вариантах реализации изобретения первая композиция дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

В другом варианте реализации изобретения аденовирусный вектор в первой композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 3.

В еще более предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор во второй композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере четырех подтипов филовируса.

Предпочтительно, указанный MVA-вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

Поэтому в предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, при этом аденовирусный вектор в первой композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1; и при этом MVA-вектор во второй композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, при этом первая композиция содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую первый антигенный белок с SEQ ID NO: 1,

аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую второй антигенный белок с SEQ ID NO: 2, аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую третий антигенный белок с SEQ ID NO: 3; и при этом MVA-вектор во второй композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных подтипов филловируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусные векторы, используемые в способе по настоящему изобретению, представляют собой rAd26- или rAd35-векторы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения этап (b) указанного способа проводится через 1-12 недель после этапа (a).

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "прайм"-вакцинация, т. е. этап (a), проводится в неделю 0, с последующей "буст"-вакцинацией, т. е. этап (b), в неделю 1-10, более предпочтительно в неделю 6-10, и еще более предпочтительно в неделю 8. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "прайм"-вакцинация, т. е. этап (a), проводится в неделю 0, с последующей "буст"-вакцинацией, т. е. этапом (b), в неделю 1-4, более предпочтительно в неделю 1, 2 или 4.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "прайм"-вакцинация, т. е. этап (b), проводится в неделю 0, с последующей "буст"-вакцинацией, т. е. этапом (a), в неделю 1-10, более предпочтительно в неделю 6-10, и еще более предпочтительно в неделю 8. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "прайм"-вакцинация, т. е. этап (b), проводится в неделю 0, с последующей "буст"-вакцинацией, т. е. этап (a), в неделю 1-4, более предпочтительно в неделю 1, 2 или 4.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанный способ включает "прайм"-вакцинацию иммунологически эффективным количеством одного или более rAd26-векторов, экспрессирующих один или более антигенных белков филловируса, с последующей "буст"-вакцинацией иммунологически эффективным количеством одного или более векторов, отличающихся от rAd26, предпочтительно MVA-векторов, экспрессирующих один или более гликопротеинов филловируса или по существу аналогичных гликопротеинов.

В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения один или более филловирсов представляют собой Эболавирусы или вирусы Марбург. Эболавирус может быть любого вида, например, эболавирус Заир (EBOV) и эболавирус Судан (SUDV), Рестон, Бундибуджио, леса Таи. Вирус Марбург (MARV) также может быть любого вида. Типичные аминокислотные последовательности пригодных антигенных белков филловируса приведены в SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 5.

Краткое описание графических материалов

Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание настоящего изобретения, будут более поняты при прочтении их совместно с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, что изобретение не ограничено приведенными точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере одно графическое изображение, выполненное в цвете. Копии этого патента или опубликованной патентной заявки с цветным графическим изображением(ями) будут предоставлены патентным ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

На графических материалах

на фиг. 1 описаны группы исследуемых животных;

на фиг. 2 проиллюстрирован экспериментальный дизайн исследования;

на фиг. 3 проиллюстрирован полученный результат после инфицирования штаммом вируса Эбола Заир Kikwit 1995 для инфицирования;

на фиг. 4 проиллюстрирован специфический гуморальный иммунный ответ на гликопротеин вируса Эбола Заир (оцененный с помощью ELISA), наблюдаемый в исследовании на животных: очень высокие титры антител были получены независимо от режимов вакцинации (НД=момент времени не анализировали);

на фиг. 5 проиллюстрирован специфический гуморальный иммунный ответ на гликопротеин вируса Судан Gulu (оцененный с помощью ELISA), наблюдаемый в исследовании на животных: очень высокие титры антител были получены независимо от режимов вакцинации (НД=момент времени не анализировали);

на фиг. 6 проиллюстрирован специфический гуморальный иммунный ответ на гликопротеин вируса Марбург Ангола (оцененный с помощью ELISA), наблюдаемый в исследовании на животных: очень высокие титры антител были получены независимо от режимов вакцинации (НД=момент времени не анализировали); и

на фиг. 7 проиллюстрирован специфический клеточный иммунный ответ на гликопротеин (ГП) вирусов ZEBOV, SEBOV и MARVA, проанализированный с помощью ИФН-γ ELISPOT;

на фиг. 8 проиллюстрирован специфический иммунный ответ на ГП ZEBOV, проанализированный с помощью анти-EBOV ГП ELISA, при котором на День 50 наблюдали более высокий гуморальный иммунный ответ после "буст"-иммунизации у пациентов, иммунизированных MVA в качестве "прайм"-вакцины и Ad26 в качестве "буст"-вакцины, по сравнению с обратным порядком вакцинации;

на фиг. 9 проиллюстрирован специфический Т-клеточный ответ на ГП ZEBOV в организме человека, проанализированный с помощью анализа ELISpot;

на фиг. 10 проиллюстрирован специфический CD8+ клеточный иммунный ответ на ГП ZEBOV у человека, проанализированный с помощью анализа ICS;

на фиг. 11 проиллюстрирована активность специфического CD8+ Т-клеточного ответа на ГП EBOV в организме человека, проанализированного с помощью анализа ICS, с 28-дневным интервалом между "прайм"- и "буст"- введением;

на фиг. 12 проиллюстрирована активность специфического CD8+ Т-клеточного ответа на ГП EBOV в организме человека, проанализированного с помощью анализа ICS, с 56-дневным интервалом "прайм-буст";

на фиг. 13 проиллюстрирован специфический CD4+ клеточный иммунный ответ на ГП ZEBOV в организме человека, проанализированный с помощью анализа ICS;

на фиг. 14 проиллюстрирована активность специфического CD4+ Т-клеточного ответа на ГП EBOV в организме человека, проанализированного с помощью анализа ICS, с 28-дневным интервалом "прайм-буст";

на фиг. 15 проиллюстрирована активность специфического CD4+ Т-клеточного ответа на ГП EBOV в организме человека, проанализированного с помощью анализа ICS, с 56-дневным интервалом "прайм-буст";

на фиг. 16 проиллюстрирован иммунный ответ, индуцированный "прайм"-иммунизацией с использованием Ad26.ZEBOV, с последующей "буст"-иммунизацией MVA-BN-Filo через 14 дней, оцененный с помощью ELISA (A), ELISpot(B) и ICS (C и D);

на фиг. 17 проиллюстрирован специфический клеточный иммунный ответ на ГП ZEBOV, проанализированный с помощью анти-EBOV ГП ELISA;

на фиг. 18 проиллюстрирован специфический Т-клеточный ответ на ГП ZEBOV в организме человека, проанализированный с помощью анализа ELISpot;

на фиг. 19 проиллюстрирован сильный и сбалансированный CD4+ (A) и CD8+ (B) клеточный иммунный ответ, специфический для ГП ZEBOV, в организме человека, проанализированный с помощью анализа ICS, и активность EBOV ГП-специфических CD8+ (C) и CD4+ (D) Т-клеточных ответов в организме человека, проанализированных с помощью анализа ICS, при использовании MVA в качестве "прайм"-иммунизации и Ad26 в качестве "буст"-иммунизации по истечению 14 дней;

на фиг. 20 проиллюстрированы ГП-связывающие антитела EBOV Mayinga, индуцированные вакцинацией с применением схем Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo и MVA-BN-Filo/Ad26.ZEBOV, выявленные с помощью ГП ELISA. Схемы вакцинации указаны под осью x. Высокий уровень ИМ и стандартный уровень ИМ соотносятся с дозой и способом введения MVA BN Filo. Горизонтальная пунктирная линия показывает нижний предел чувствительности (НПЧ).

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Уровень техники" и по всему описанию; при этом каждая из этих работ включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и тому подобное, которые были включены в настоящее описание, приведено для целей обеспечения контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы являются частью предшествующего уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае, некоторые термины, используемые в данном документе, имеют значения, указанные в описании. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, так, будто полностью изложены в данном документе. Следует отметить, что при использовании в данном документе и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует рассматривать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, с применением не более чем стандартных экспериментов. Такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

В данном описании и формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержит" и его вариации, такие как "включает" и "содержащий", следует понимать как включающее указанное целое значение или этап или группу целых значений или этапов, но не исключающее любое другое целое значение или этап или группу целых значений или этапов. В данном описании термин "содержащий" может быть заменен термином "который содержит" или "включающий" или иногда используемым в данном описании термином "имеющий". Любой из указанных выше терминов (содержащий, который содержит,

включающий, имеющий) во всех случаях при использовании в контексте аспекта или варианта реализации настоящего изобретения может быть заменен термином "состоящий из", хотя это и менее предпочтительно.

В данном контексте термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент не указанный в элементе формулы изобретения. В данном контексте термин "состоящий по существу из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики заявленного изобретения.

В данном контексте связывающий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами расценивается как охватывающий индивидуальные и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединяются с помощью "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов подходит по смыслу, и, следовательно, соответствует требованию термина "и/или", используемого в данном описании. Также подразумевается, что параллельная применимость более чем одного из вариантов подходит по смыслу, и, следовательно, соответствует требованию термина "и/или".

В данном контексте термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, который будет или уже пролечен с помощью способа в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. В данном контексте термин "млекопитающее" включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно человека.

В данном контексте термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфекцию, вызванную патогенным агентом, против которого была проведена вакцинация. Как правило, у субъекта с выработанным "защитным иммунным ответом" развиваются клинические симптомы только от легкой до умеренной степени тяжести или вообще не развиваются. Как правило, субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" против определенного агента, не умирает в результате инфекции, вызванной указанным агентом.

Термин "аденовирусный капсидный белок" относится к белку на капсиде аденовируса (например, Ad26 или Ad35), который участвует в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Аденовирусные капсидные белки, как правило, включают волокнистые, пентоновые и/или гексоновые белки. В данном контексте "капсидный белок Ad26" или "капсидный белок Ad35" может быть, например, химерным капсидным белком, который включает по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35. В некоторых вариантах реализации изобретения капсидный белок представляет собой полный капсидный белок из Ad26 или Ad35. В некоторых вариантах реализации изобретения гексоновыми, пентоновыми и волокнистыми белками являются белки из Ad26 или Ad35.

В данном контексте термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются взаимозаменяемо, и определяются как одно или более веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные и/или MVA-векторы по настоящему изобретению.

Термин "соответствующий", когда применяется относительно позиции аминокислотных остатков в последовательности, означает соответствующие позиции во множестве последовательностей, когда эти последовательности оптимально выровнены.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, гликопротеинов филловируса и полинуклеотидов, которые кодируют их) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что измеряется с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

При сравнении последовательностей обычно одну последовательность рассматривают как эталонную, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма для сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательность вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и устанавливают параметры алгоритма для сравнения последовательностей. Алгоритм для сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основании установленных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита-Ватермана (Smith & Waterman), Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch), J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью метода поиска подобия Пирсона-Липмана (Pearson & Lipman), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерного обеспечения этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer

Group, 575 Science Dr., Медисон, Висконсин), или путем визуального осмотра (см., в общем, Current Protocols in Molecular Biology, F.M.Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Дополнение) (Ausubel)).

Примеры алгоритмов, пригодных для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschuel et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов по алгоритму BLAST общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации. Этот алгоритм включает первичную идентификацию пар последовательностей с высоким баллом (HSP) путем идентификации коротких слов с длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают или соответствуют некоторому пороговому баллу T с положительным значением при выравнивании со словом той же длины из базы данных последовательностей. Значение T называется балльным порогом ближайшего слова (Altschul et al., выше). Эти первичные попадания ближайших слов играют роль "затравки" для начала поиска более длинных HSP, содержащих их. Попадания слов затем распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться совокупный балл выравнивания.

Для нуклеотидных последовательностей совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M (вознаграждающий балл для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). При вычислении совокупного балла для аминокислотных последовательностей используют матрицу подсчета баллов. Расширение попаданий слов в каждом направлении прекращается, когда: совокупный балл выравнивания уменьшается на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже, вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигается конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используются в качестве параметров по умолчанию длина слова (W), равная 11, ожидаемое значение (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP используются в качестве параметров по умолчанию длина слова (W), равная 3, ожидаемое значение (E), равное 10, и матрица подсчета баллов BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989)).

В дополнении к расчету процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)) Один показатель сходства, предоставляемый алгоритмом BLAST, представляет собой наименьшую сумму вероятностей ($P(N)$), которая является обозначением вероятности, с которой случайным образом будет возникать совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятности при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой будет менее чем около 0,1, более предпочтительно менее чем около 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем около 0,001.

Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются по существу идентичными, есть тот факт, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой является иммунологически перекрестно реагирующим с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является по существу идентичным со вторым полипептидом, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, есть тот факт, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже.

Термин "по существу сходный" в контексте антигенных белков филовируса согласно настоящему изобретению указывает на то, что полипептид содержит последовательность по меньшей мере с 90%, предпочтительно по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью в окне сравнения из 10-20 аминокислот. Процент идентичности последовательности определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е., пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит вставок или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения числа положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки определяются в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении обнаружено, что гетерогенные "прайм-буст" комбинации, в частности, "прайм"-введение Ad26 с последующим "буст"-введением MVA, и наоборот, являются на удивление эффективными для выработки защитного иммунного ответа против одного или более подтипов филовирусов.

Антигенные белки филовируса

Вирусы Эбола, а также генетически родственный вирус Марбург представляют собой филовирусы, с которыми ассоциируются вспышками высоколетальной геморрагической лихорадки у человека и приматов в Северной Америке, Европе и Африке (Peters, C.J. et al., в: *Fields Virology*, eds. Fields, B.N. et al., 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Peters, C.J. et al., 1994 *Semin Virol* 5:147-154). Несмотря на то, что определены несколько подтипов вирусов, их генетическая организация является сходной, при этом каждый из вирусов содержит семь линейно выстроенных генов. В числе вирусных белков гликопротеиновая оболочка существует в двух альтернативных формах: секретируемый растворимый гликопротеин (срГП) с массой 50-70 килодальтон (кДа) и трансмембранный гликопротеин (ГП) с массой 130 кДа, сгенерированных с помощью редактирования РНК, которая опосредует проникновение вируса (Peters, C.J. et al., в: *Fields Virology*, eds. Fields, B.N. et al., 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Sanchez, A. et al., 1996 *PNAS USA* 93:3602-3607). Другие структурные генные продукты включают нуклеопротеин (НП), матричные белки VP24 и VP40, предполагаемые неструктурные белки VP30 и VP35 и вирусную полимеразу (обзор приведен в Peters, C.J. et al., в: *Fields Virology*, eds. Fields, B.N. et al., 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996).

Молекулы нуклеиновой кислоты, содержащиеся в аденовирусном и MVA-векторах, могут кодировать структурные генные продукты любого вида филовируса, такие как подтипы Заир (типовой вид, также упоминается в данном документе как ZEBOV), Судан (также упоминается в данном документе как SEBOV), Рестон, Бундибуджио и Берег Слоновой Кости. Существует отдельный вид вируса - вирус Марбург (также упоминается в данном документе как MARV).

Аденовирусные векторы и MVA-векторы по настоящему изобретению могут быть использованы для экспрессии антигенных белков, которые представляют собой белки, содержащие антигенную детерминанту широкого спектра антигенов филовирусов. В типичном и предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения векторы включают нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранную форму вирусного гликопротеина (ГП). В других вариантах реализации настоящего изобретения векторы согласно изобретению могут кодировать секретируемую форму вирусного гликопротеина (срГП) или вирусный нуклеопротеин (НП).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антигенный белок филовируса, могут быть модифицированы, например, молекулы нуклеиновых кислот, указанные в данном документе, могут подвергаться мутации до тех пор, пока модифицированный экспрессированный белок вызывает иммунный ответ против патогена или заболевания. Таким образом, в данном контексте термин "антигенный белок" или "белок филовируса" относится к белку, который содержит по меньшей мере одну антигенную детерминанту белка филовируса, описанного выше. Термин охватывает гликопротеины филовируса (т.е. генные продукты филовируса) или нуклеопротеин филовируса, а также рекомбинантные белки, которые содержат один или более гликопротеиновых детерминант филовируса. Термин антигенные белки также охватывает антигенные белки, которые по существу являются одинаковыми.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок может быть мутирован настолько, чтобы стать менее токсичным по отношению к клеткам (см., например, WO/2006/037038), или может экспрессироваться с повышением или снижением уровня в клетках. Настоящее изобретение также включает вакцины, содержащие комбинацию молекул нуклеиновых кислот. Например, и без ограничения, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие ГП, срГП и НП в таких штаммах Эболавируса, как Заир, Судан, Марбург и Берег Слоновой Кости/леса Таи, могут быть объединены в любой комбинации в одной композиции вакцины.

Аденовирусы

Аденовирус согласно настоящему изобретению относится к семейству *Adenoviridae* и предпочтительно является вирусом, который принадлежит к роду *Mastadenovirus*. Это может быть не только аденовирус человека, но и аденовирус, который инфицирует другие виды, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус 3 крупного рогатого скота, BAdV3), аденовирус собаки (например, CAdV2), аденовирус свиньи (например, PAdV3 или 5) или аденовирус приматов (который включает аденовирус обезьяны и аденовирус других приматов, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно, аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu; в настоящем изобретении подразумевается аденовирус человека, если упоминается Ad без указания вида, например, краткое обозначение "Ad5" означает то же самое, что и HAdV5, что является серотипом 5 аденовируса человека), или обезьяньим аденовирусом, таким как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV).

Большинство современных исследований были выполнены с использованием аденовирусов человека, при этом аденовирусы человека являются предпочтительными согласно некоторым аспектам настоящего изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах реализации рекомбинантный аденовирус согласно настоящему изобретению основан на аденовирусе человека. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный аденовирус основан на серотипе 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 или 50 аденовируса человека. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализа-

ции настоящего изобретения, аденовирус представляет собой аденовирус человека одного из серотипов 26 или 35.

Преимуществом этих серотипов является низкая серораспространенность и/или низкие титры ранее существовавших нейтрализующих антител в человеческой популяции. Получение rAd26-векторов описано, например, в публикации WO 2007/104792 и в Abbink et al. (2007) *Virology* 361(1):4654-63, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Типичные последовательности генома Ad26 можно найти в базе GenBank под номером доступа EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Получение rAd35-векторов описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al. (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Типичные последовательности генома Ad35 можно найти в базе GenBank под номером доступа AC_000019 и на фиг. 6 в WO 00/70071.

Аденовирусы приматов обычно также имеют низкую серораспространенность и/или низкие титры ранее существовавших нейтрализующих антител в человеческой популяции, при этом известно о значительном количестве научных работ с использованием аденовирусных векторов шимпанзе (например, US6083716; WO 2005/071093; WO 2010/08 6189; WO 2010085984; Farina et al., 2001, *J Virol* 75:11603-13; Cohen et al., 2002, *J Gen Virol* 83:151-55; Kobinger et al., 2006, *Virology* 346:394-401; Tatsis et al., 2007, *Molecular Therapy* 15:608-17; см. также обзор Bangari и Mittal, 2006, *Vaccine* 24:849-62; и обзор Lasaro и Ertl, 2009, *Mol Ther* 17:1333-39). Следовательно, в других предпочтительных вариантах реализации рекомбинантный аденовирус согласно настоящему изобретению основан на аденовирусе приматов, например, аденовирусе шимпанзе. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе приматов типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Аденовирусные rAd26- и rAd35-векторы

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению аденовирусные векторы содержат капсидные белки из двух редких серотипов: Ad26 и Ad35. В типичном варианте реализации изобретения вектор представляет собой вирус rAd26 или rAd35.

Таким образом, векторы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, содержат капсидный белок Ad26 или Ad35 (например, волокнистый, пентоновый или гексоновый белок). Специалисту будет понятно, что нет необходимости использовать весь капсидный белок Ad26 или Ad35 в векторах по настоящему изобретению. Таким образом, химерные капсидные белки, которые включают по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35, могут быть использованы в векторах по настоящему изобретению. Векторы по настоящему изобретению могут также включать капсидные белки, в которых волокнистый, пентоновый или гексоновый белки получают каждый из различных серотипов, при том условии, что по меньшей мере один капсидный белок получают из Ad26 или Ad35. В предпочтительных вариантах реализации изобретения волокнистый, пентоновый или гексоновый белки получают каждый из Ad26 или каждый из Ad35.

Специалисту будет понятно, что элементы, полученные из множества серотипов, могут быть объединены в один рекомбинантный аденовирусный вектор. Таким образом, может быть произведен химерный аденовирус, который сочетает в себе желательные свойства из различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах реализации химерный аденовирус по настоящему изобретению может сочетать отсутствие ранее выработанного иммунитета на серотипы Ad26 и Ad35 с характеристиками, такими как температурная стабильность, возможность комплектации, прикрепление, выход продукции, перенаправление или оптимизация инфекции, стабильность ДНК в клетке-мишени и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный аденовирусный вектор, пригодный для изобретения, является производным в основном или полностью от Ad35 или Ad26 (т.е. вектор представляет собой rAd35 или rAd26). В некоторых вариантах реализации изобретения аденовирус является дефектным по репликации, например, из-за того, что он содержит делецию в E1-области генома. Для аденовирусов по изобретению, производных от Ad26 или Ad35, характерным является обмен E4-orf6-кодирующей последовательности аденовируса на E4-orf6 аденовируса человеческой подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает размножение таких аденовирусов в известных дополняющих клеточных линиях, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и тому подобное (см., например Havenga et al., 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; WO 03/104467). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой серотип 35 аденовируса человека с делецией в E1-области, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4 orf6-областью Ad5. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой серотип 26 аденовируса человека с делецией в E1-области, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4 orf6-областью Ad5. Для аденовируса Ad35 характерно сохранение 3'-конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п.н. непосредственно перед открытой рамкой считывания pIX или фрагментом, содержащим это, таким как фрагмент 243 п.н. непосредственно перед старт-кодоном pIX, отмеченном на 5'-конце сайтом рестрикции Bsu36I, поскольку это увеличивает стабильность аденовируса, так как промотор гена pIX частично локализуется в данной области (см., например, Havenga et al., 2006, выше; WO 2004/001032).

Способы получения рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известны в данной области техники.

Получение гAd26-векторов описано, например, в публикации WO 2007/104792 и в Abbink et al. (2007) Virol 81(9): 4654-63. Типичные последовательности генома Ad26 можно найти в базе GenBank под номером доступа EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Получение гAd35-векторов описано, например, в патенте США № 7270811 и в Vogels et al. (2003) J Virol 77(15): 8263-71. Типичную последовательность генома Ad35 можно найти в базе GenBank под номером доступа AC_000019.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, векторы, пригодные для настоящего изобретения, включают векторы, которые описаны в публикации WO2012/082918, описание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Как правило, вектор, пригодный для изобретения, получают с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей полный рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмиду, космиду или бакловирусный вектор). Таким образом, в настоящем изобретении также предлагаются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют аденовирусные векторы по изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут существовать в форме РНК или в форме ДНК, полученных с помощью клонирования или синтетически. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

Аденовирусные векторы, пригодные для изобретения, как правило, являются дефектными по репликации. В этих вариантах реализации настоящего изобретения вирус приводится в состояние дефектного по репликации путем удаления или инактивации областей, критических для репликации вируса, таких как E1-область. Области могут быть по существу удалены или инактивированы, например, путем встраивания гена, представляющего интерес (обычно связанный с промотором). В некоторых вариантах реализации, векторы по настоящему изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как E2-, E3- или E4-области, или встраивания гетерологичных генов, связанных с промотором. Для E2- и/или E4-мутировавших аденовирусов, как правило, E2- и/или E4-дополняющие клеточные линии используются для создания рекомбинантных аденовирусов. Мутации в E3-области аденовируса не обязательно должны дополняться клеточной линией, поскольку для репликации E3 не требуется.

Пакующая клеточная линия, как правило, используется для получения достаточного количества аденовирусных векторов по настоящему изобретению. Пакующая клетка представляет собой клетку, которая включает те гены, которые были удалены или инактивированы в дефектном по репликации векторе, тем самым позволяя вирусу реплицироваться в клетке. Пригодные клеточные линии включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

Как было отмечено выше, в векторах может экспрессироваться множество гликопротеинов филовируса. При необходимости, гетерологичный ген, кодирующий гликопротеины филовируса, может быть кодон-оптимизированным для обеспечения надлежащей экспрессии в организме хозяина, получающего лечение (например, в организме человека). Кодон-оптимизация представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники. Как правило, гетерологичный ген клонируют в E1- и/или E3-область генома аденовируса.

Гетерологичный ген филовируса может контролироваться (т.е. быть функционально связанный с) промотором, производным от аденовируса (например, основным поздним промотором), или может контролироваться гетерологичным промотором. Примеры пригодных гетерологичных промоторов включают ЦМВ-промотор и РСВ-промотор. В предпочтительном варианте промотор расположен в кассете экспрессии выше от гетерологичного гена, представляющего интерес.

Как было отмечено выше, аденовирусные векторы, пригодные для данного изобретения могут включать широкий спектр гликопротеинов филовируса, известных специалистам в данной области техники.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, гAd-вектор(ы) включает один или более ГП, выбранных из группы, состоящей из ГП эболавируса Заир (EBOV), ГП эболавируса Судан (SUDV), ГП вируса Марбург (MARV), и ГП, по существу аналогичных им.

MVA-векторы

В MVA-векторах, пригодных для настоящего изобретения, используется аттенуированный вирус, полученный из модифицированного вируса осповакцины Анкара, который характеризуется потерей способности к репродуктивной репликации в клеточных линиях человека. MVA-векторы экспрессируют широкий спектр гликопротеинов филовируса, а также другие структурные белки филовируса, такие как VP40 и нуклеопротеин (НП).

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту гликопротеина (ГП) филовируса, в частности гликопротеина оболочки. В другом аспекте настоящего изобретения предлагается рекомбинантный MVA-вектор, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту гликопротеина филовируса, в частности гликопротеина оболочки, и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного белка филовируса.

MVA был получен в результате более чем 570 последовательных пассажей дермального штамма вируса осповакцины Анкара на фибробластах куриных эмбрионов [Хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара, CVA; для обзора см. Mayr et al. (1975), *Infection* 3, 6-14], который хранится в Институте вакцинации, Анкара, Турция, на протяжении многих лет и используется в качестве основы для человеческой вакцины. Тем не менее, в связи с частыми тяжелыми осложнениями после вакцинации, связанными с вирусами осповакцины, было предпринято несколько попыток создания более аттенуированной и более безопасной вакцины против оспы.

В период с 1960 по 1974 год профессор Anton Mayr успешно аттенуировал CVA с помощью более чем 570 непрерывных пассажей в клетках CEF [Mayr et al. (1975)]. В различных моделях на животных показано, что полученный MVA был авирулентным [Mayr, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-234]. Как часть первоначальной разработки MVA в качестве предварительной вакцины против оспы, были проведены клинические испытания с использованием MVA-517 в комбинации с Lister Elstree [Stickl (1974), *Prev. Med.* 3: 97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munch. Med. Wochenschr.* 113: 1149-1153] у субъектов с высоким риском нежелательных реакций от вакцин. В 1976 году MVA, полученный из посевного материала MVA-571 (что соответствует 571-ому пассажу), был зарегистрирован в Германии в качестве "прайм"-вакцины в программе парентеральной двухэтапной вакцинации против оспы. Впоследствии, MVA-572 применили в около 120000 субъектов, выходцев из Кавказа, преимущественно детей в возрасте от 1 до 3 лет, без сообщений о серьезных побочных эффектах, хотя многие из субъектов состояли в группе высокого риска развития осложнений, связанных с вакцинальной болезнью (Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572 был сдан на хранение в Европейскую коллекцию культур клеток животных под регистрационным ECACC V94012707.

В результате проведения пассажей с целью аттенуирования MVA возник целый ряд различных штаммов или изолятов в зависимости от числа пассажей, осуществленных в клетках CEF. Например, MVA-572 использовали в низкой дозе при предварительной вакцинации в Германии во время программы ликвидации оспы, а MVA-575 широко использовали в качестве вакцины в ветеринарии. MVA, а также MVA-BN испытывают недостаток в около 15% (31 т.п.н. от шести областей) генома по сравнению с предковым вирусом CVA. Делеции влияют на количество генов вирулентности и круга хозяев, а также на ген телец включения типа А. MVA-575 был сдан на хранение в Европейскую коллекцию культур клеток животных (ECACC) 7 декабря 2000 года под регистрационным № V00120707. Аттенуированный MVA CVA-вируса (модифицированного вируса осповакцины Анкара) получали путем последовательного размножения (более 570 пассажей) CVA на первичных фибробластах куриных эмбрионов.

Даже при том, что Mayr et al., еще в 1970-х годах продемонстрировал, что MVA является сильно аттенуированным и авирулентным в организме человека и млекопитающих, некоторые исследователи сообщили, что MVA не полностью аттенуируется в клеточных линиях млекопитающих и человека, поскольку в этих клетках может происходить остаточная репликация [Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211; патент США № 5185146; Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55:569]. Предполагается, что результаты, представленные в этих публикациях, были получены с использованием различных известных штаммов MVA, поскольку используемые вирусы по существу отличаются по своим свойствам, в частности, по характеру роста в различных клеточных линиях. Такая остаточная репликация является нежелательной по различным причинам, включая проблемы, связанные с безопасностью, при использовании в организме человека.

Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были разработаны Bavarian Nordic. MVA дополнительно культивирован компанией Bavarian Nordic и обозначен как MVA-BN, репрезентативный образец которого был сдан на хранение 30 августа 2000 года в Европейскую коллекцию клеточных культур (ECACC) под регистрационным №. V00083008. MVA-BN дополнительно описан в публикациях WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

MVA-BN можно прикрепить и ввести в человеческие клетки, в которых гены, закодированные вирусом, экспрессируются очень эффективно. MVA-BN сильно адаптирован к первичным клеткам фибробласта куриного эмбриона (CEF) и не реплицируется в клетках человека. В клетках человека вирусные гены экспрессируются, и не образуется ни один патогенный вирус. По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний в Соединенных Штатах для организма MVA-BN классифицируется как уровень 1 биологической безопасности. Препараты MVA-BN и его производные вводили многим видам животных, а также более 2000 человеческим субъектам, включая индивидуумов с иммунной недостаточностью. Все вакцинации оказались в целом безопасны и хорошо переносились. Несмотря на высокую аттенуацию и сниженную вирулентность, в доклинических исследованиях было показано, что MVA-BN вызывает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на вирус осповакцины и гетерологичные генные продукты, кодируемые генами, клонированными в геноме MVA [E. Harrer et al. (2005), *Antivir. Ther.* 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14(14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10(16):5381-5390].

Термины "производные" или "варианты" MVA относятся к вирусам, проявляющих по существу

аналогичные с MVA характеристики репликации, как описано в данном документе, но демонстрирующих различия в одной или более частей их геномов. MVA-BN, а также производное или вариант MVA-BN не способны репродуктивно реплицироваться *in vivo* в организме человека и мышей, даже в мышей с сильно выраженной иммуносупрессией. Более конкретно, MVA-BN или его производное или вариант MVA-BN предпочтительно характеризуются также способностью к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способны к репродуктивной репликации в человеческой линии кератиноцитов HaCat [Boukamp et al. (1988), J.Cell Biol. 106:761-771], человеческой клеточной линии остеосаркомы кости 143B (№ доступа в ECACC 91112502), человеческой эмбриональной линии клеток почки 293 (№ доступа в ECACC 85120602), а человеческой клеточной линии аденокарциномы шейки матки HeLa (№ доступа в ATCC CCL-2). Кроме того, производное или вариант MVA-BN имеет коэффициент вирусной амплификации по меньшей мере в два раза меньше, более предпочтительно в три раза меньше, чем MVA-575 в клетках Hela и клеточных линиях HaCaT. Исследования и анализ этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699).

Термин "не способный к репродуктивной репликации" или "нет возможности репродуктивной репликации" представляет собой, например, определение, описанное в публикации WO 02/42480, которая также дает представление, как получить MVA с желаемыми свойствами, упомянутыми выше. Этот термин относится к вирусу, который характеризуется коэффициентом амплификации на День 4 после инфицирования менее чем 1, с использованием анализов, описанных в WO 02/42480 или в патенте США №6761893, содержание которого в полном объеме включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Термин "не может репродуктивно реплицироваться" относится к вирусу, который характеризуется коэффициентом амплификации на День 4 после инфицирования менее чем 1. Анализы, описанные в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, применимы для определения коэффициента амплификации вируса.

Амплификация или репликация вируса, как правило, выражается как отношение количества вируса, полученного из инфицированной клетки (выход), к количеству вируса, первоначально использованного для инфицирования клетки в первом месте (введение), и упоминается в данном документе как "коэффициент амплификации". Коэффициент амплификации "1" определяет состояние амплификации, при котором количество вируса, полученного из инфицированных клеток, является аналогичным количеству, первоначально использованному для инфицирования клеток, а это означает, что инфицированные клетки являются перmissive для внедрения и репродукции вируса. В отличие от этого, коэффициент амплификации меньше 1, т. е., снижение количества вируса "на выходе" по сравнению с количеством вируса при введении, указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, аттенуацию вируса.

Преимущества вакцин на основе MVA включают их надлежащий профиль безопасности, а также доступность для крупномасштабного производства. Доклинические исследования показали, что MVA-BN демонстрирует более совершенную аттенуацию и эффективность по сравнению с другими штаммами MVA (WO 02/42480). Дополнительным свойством штаммов MVA-BN является способность вызывать по существу аналогичный уровень иммунитета при применении схемы "прайм"-вакцинации на основе вируса осповакцины/"буст"-вакцинации на основе вируса осповакцины, по сравнению со схемой ДНК-"прайм"-вакцинации/"буст"-вакцинации на основе вируса осповакцины.

В наиболее предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантные вирусы MVA-BN считаются безопасными из-за их отчетливой репликативной дефектности в клетках млекопитающих и прочно установившейся авирулентности. Кроме того, в дополнение к указанной эффективности, может быть выгодной возможность производства их в промышленных масштабах. Кроме того, вакцины на основе MVA могут доставлять множество гетерологичных антигенов и одновременно индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет.

MVA-векторы, пригодные для настоящего изобретения, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, таких как способы, описанные в публикациях WO/2002/042480 и WO/2002/24224, полное описание которых включено в настоящее описание посредством ссылок.

В другом аспекте дефицитные по репликации вирусные штаммы MVA, такие как MVA-572, MVA-575 или любой подобным образом аттенуированный штамм MVA, также могут быть пригодными для изобретения. Пригодным также может быть мутантный MVA, такой как хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара с делециями (dCVA). Вирус dCVA содержит сайты делеции del I, del II, del III, del IV, del V и del VI на MVA-геноме. Указанные сайты особенно пригодны для встраивания множества гетерологичных последовательностей. Вирус dCVA может репродуктивно реплицироваться (с коэффициентом амплификации более 10) в клеточной линии человека (например, клеточных линиях человека 293, 143B и MRC-5) с возможностью последующей оптимизации путем дополнительной мутации, целесообразной для стратегии вакцинации на основе вируса (см. WO 2011/092029).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, MVA-вектор(ы) содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более антигенных белков, выбранных из группы, состоящей из ГП эболавируса Заир (EBOV), ГП эболавируса Судан (SUDV), ГП вируса Марбург (MARV), НП

вируса леса Таи и ГП или НП по существу аналогичных им.

Белок филовirusа может быть встроен в одну или более межгенных областей (МГО) вируса MVA. В некоторых вариантах реализации изобретения МГО выбирают из группы, состоящей из МГО 07/08, МГО 44/45, МГО 64/65, МГО 88/89, МГО 136/137 или МГО148/149. В некоторых вариантах реализации изобретения менее 5, 4, 3 или 2 МГО рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты гликопротеиновой оболочки филовirusа и/или дополнительного белка филовirusа. Гетерологичные нуклеотидные последовательности могут быть, дополнительно или альтернативно, встроены в один или более встречающихся в природе сайтов делеции, в частности, в основные сайты делеции I, II, III, IV, V или VI генома MVA. В некоторых вариантах реализации изобретения менее 5, 4, 3 или 2 встречающихся в природе сайтов делеции рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты гликопротеиновой оболочки филовirusа и/или дополнительного белка филовirusа.

Количество сайтов встраивания в MVA, содержащих гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты белка филовirusа, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более. В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичные нуклеотидные последовательности встраивают в 4, 3, 2 или меньше сайтов встраивания. Предпочтительно используют два сайта встраивания. В некоторых вариантах реализации изобретения используют три сайта встраивания. Предпочтительно рекомбинантный MVA содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, встраиваемых в 2 или 3 сайта встраивания.

Рекомбинантные вирусы MVA, представленные в данном документе, могут быть получены обычными способами, известными в данной области техники. Способы получения рекомбинантных поксвирусов или встраивания экзогенных кодирующих последовательностей в геном поксвируса, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, способы осуществления стандартных методик молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, анализ Вестерн-блот, технология амплификации ОТ-ПЦР и ПЦР описаны в *Molecular Cloning, A laboratory Manual* (2nd Ed.) [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], а способы обработки и обращения с вирусами описаны в *Virology Methods Manual* [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. Подобным образом, способы и ноу-хау относительно обработки, обращения и генной инженерии MVA описаны в *Molecular Virology: A Practical Approach* [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, Глава 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)] и *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Son, Inc. (1998) (см., например, Глава 16, Раздел IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)].

Для генерации различных рекомбинантных MVA, описанных в данном документе, могут применяться различные способы. Последовательность ДНК, предназначенная для встраивания в вирус, может быть помещена в плазмидную конструкцию *E. coli*, в которую встроена ДНК, являющаяся гомологичной участку ДНК вируса MVA. Отдельно, последовательность ДНК, предназначенная для встраивания, может быть лигирована с промотором. Связь "промотор-ген" может быть установлена в плазмидной конструкции, таким образом, что указанная связь "промотор-ген" будет примыкать к обоим концам с помощью ДНК, являющейся гомологичной с последовательностью ДНК, примыкающей к области ДНК MVA, содержащей неосновной локус. Полученная плазмидная конструкция может быть амплифицирована путем размножения в бактерии *E.coli* и выделена. Выделенная плазмида, содержащая генную последовательность ДНК, предназначенную для встраивания, может быть трансфицирована в клеточную культуру, например, фибробласты куриных эмбрионов (CEF), одновременно с инфицированием культуры вирусом MVA. С помощью рекомбинации между гомологичной ДНК MVA в плазмиде и вирусным геномом, соответственно, может генерироваться модифицированный MVA при наличии чужеродных ДНК-последовательностей.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации изобретения клетки пригодной клеточной культуры, как, например, клетки CEF, могут быть инфицированы поксвирусом. Инфицированная клетка может быть, в дальнейшем, трансфицирована первым плазмидным вектором, содержащим чужеродный или гетерологичный ген или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем элемента, контролирующего экспрессию поксвируса. Как объяснялось выше, плазмидный вектор также содержит последовательности, способные направлять встраивание экзогенной последовательности в выбранную часть генома поксвируса. В некоторых случаях плазмидный вектор также содержит кассету, содержащую маркерный и/или селекционный ген, функционально связанный с поксвирусным промотором.

Пригодные маркерные или селекционные гены представляют собой, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок, β -галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Использование селекционных или маркерных кассет упрощает идентификацию и выделение генерируемого рекомбинантного поксвируса. Тем не менее, рекомбинантный поксвирус также может быть идентифицирован с помощью ПЦР-технологии. Впоследствии, дополнительная клетка может быть инфицирована рекомбинантным поксвирусом, полученным согласно описанию выше, и трансфицирована вторым вектором, содержащим второй чужеродный или гетерологичный ген или гены. В случае, если этот ген будут встраивать в другой сайт встраивания поксвирусного генома, второй вектор также будет

отличаться в поксвирусных гомологичных последовательностях, направляющих интеграцию второго чужеродного гена или генов в геном поксвируса. После осуществления гомологичной рекомбинации, может быть выделен рекомбинантный вирус, содержащий два или более чужеродных или гетерологичных гена. С целью встраивания дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус, этапы инфицирования и трансфицирования можно повторить с использованием рекомбинантного вируса, выделенного в предыдущих этапах инфицирования, и с помощью дополнительного вектора, содержащего дополнительный чужеродный ген или гены для трансфицирования.

В альтернативном варианте этапы инфицирования и трансфицирования, как описано выше, являются взаимозаменяемыми, т.е. пригодная клетка может быть сначала трансфицирована плазмидным вектором, содержащим чужеродный ген, а впоследствии инфицирована поксвирусом. В дополнительном альтернативном варианте также возможно встраивание каждого чужеродного гена в различные вирусы, коинфицирование клетки всеми полученными рекомбинантными вирусами и скринирование на наличие рекомбинанта, включая все чужеродные гены. Третьим альтернативным вариантом является лигирование ДНК генома и чужеродных последовательностей *in vitro* и воссоздание рекомбинантного генома ДНК вируса осповакцины с помощью вируса-помощника. Четвертым альтернативным вариантом является гомологичная рекомбинация в *E.coli* или других видах бактерий между геномом вируса осповакцины, таким как MVA, клонированного в виде бактериальной искусственной хромосомы (BAC), и линейной чужеродной последовательностью, примыкающей к последовательности ДНК, гомологичной последовательности, примыкающей к желаемому сайту интеграции в геноме вируса осповакцины.

Гетерологичный ген филовируса может контролироваться (т.е. быть функционально связанным с) одним или более поксвирусными промоторами. В некоторых вариантах реализации изобретения поксвирусный промотор представляет собой промотор Pr7.5, гибридный ранний/поздний промотор или промотор PrS, промотор PrS5E, синтетический или природный ранний или поздний промотор, или промотор АТІ вируса коровьей оспы.

Иммуногенные композиции

Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммунологически эффективное количество очищенных или частично очищенных аденовирусных или MVA-векторов для использования в настоящем изобретении. Указанные композиции могут быть приготовлены в виде вакцины (также называемой как "иммуногенная композиция") согласно способам, хорошо известным в данной области техники. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунного ответа. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе могут быть определены с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники, с учетом настоящего описания.

Способы получения и применения иммуногенных композиций хорошо известны специалистам в данной области техники. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, включают жидкий носитель, такой как вода, продукты нефтепереработки, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также в состав могут быть включены физиологический солевой раствор, декстроза или другой раствор сахаридов, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать другие антигены филовируса или "прайм"-, или "буст"-вакцины могут содержать другие антигены. Другие антигены, используемые в комбинации с аденовирусными векторами по настоящему изобретению, не имеют решающего значения для изобретения и могут быть, например, антигенами филовируса и нуклеиновыми кислотами, экспрессирующими их.

Иммуногенные композиции, пригодные для использования в настоящем изобретении, могут включать адъюванты.

Адъюванты, пригодные для совместного введения согласно настоящему изобретению должны такими, которые потенциально безопасны, хорошо переносимым и эффективными в людей, включая QS-21, Детокс-PC, MPL- SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005., GERBU, ТЕРамид, PSC97B, Адьюмер, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Адьювакс, CpG ODN, Бетафектин, Алюм и MF59.

Другие адъюванты, которые могут вводиться, включают лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), фактор некроза опухолей (ФНО), эпидермальный фактор роста (ЭФР), ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-12, или кодирующие их нуклеиновые кислоты.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны снижать эффективность активного ингредиента. Истинные свойства носителя или другого материала могут зависеть от способа введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутрислизистого (например, через слизистую оболочку кишечника), интраназального или интритрибрюшинного пути.

Способ индуцирования защитного иммунитета против инфекции, вызванной филовирусом

В настоящем изобретении предлагается способ формирования у индивидуума иммунного ответа против одного или более филовирусов в результате "прайм"- и "буст"-введения композиции, содержащей аденовирусный вектор в комбинации с другим аденовирусным вектором и/или MVA-вектором.

Согласно одному общему аспекту настоящего изобретения способ индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта включает:

а) введение субъекту первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный протеин первого подтипа филовируса; и

б) введение субъекту второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух штаммов филовируса;

при этом этапы (а) и (б) осуществляют в любом порядке. В предпочтительном варианте реализации изобретения последующий этап проводят через 1-12 недель после первого этапа.

В определенных аспектах настоящего изобретения первая композиция дополнительно содержит один или более аденовирусных векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса. В других вариантах реализации изобретения первая композиция дополнительно содержит один или более аденовирусных векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

В одном варианте реализации описанных способов аденовирусный вектор используется для формирования первичного ("прайм") иммунного ответа, а другой аденовирусный и/или MVA-вектор используется для усиления ("буст") иммунного ответа, по истечению около 1-12 недель после "прайм"-вакцинации. "Буст"-композиции обычно вводят по истечению нескольких недель или месяцев после введения "прайм"-композиции, например, по истечению около 1 или 2 недель, 3 недель, 4 недель, или 6 недель, или 8 недель, или 12 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недель, или 28 недель, или 32 недель или по истечению от одного до двух лет после введения "прайм"-композиции.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения аденовирусные векторы, описанные в данном документе, включают rAd26- или rAd35-вектор. В одном примерном варианте реализации изобретения rAd26- или rAd35-вектор используется для формирования первичного иммунного ответа ("прайм"), а MVA-вектор используется для усиления иммунного ответа ("буст") или наоборот.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, согласно этому способу, rAd26-вектор используется для "прайм"-иммунизации с последующей "буст"-иммунизацией MVA-вектором. Предпочтительно, "буст"-композицию вводят через 1-12 недель после введения "прайм"-композиции, более предпочтительно через 1, 2, 4 или 8 недель после введения "прайм"-композиции. В предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 8 недель после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 1 неделю после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 2 недели после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 4 недели после введения "прайм"-композиции.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, согласно этому способу, MVA-вектор используется для "прайм"-иммунизации с последующей "буст"-иммунизацией rAd26-вектором. Предпочтительно, "буст"-композицию вводят через 1-12 недель после введения "прайм"-композиции, более предпочтительно через 1, 2, 4 или 8 недель после введения "прайм"-композиции. В предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 8 недель после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 1 неделю после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 2 недели после введения "прайм"-композиции. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения "буст"-композицию вводят через 4 недели после введения "прайм"-композиции.

В настоящем изобретении также предлагаются способы индуцирования иммунного ответа против более чем одного подтипа филовируса путем "прайм" и "буст"-иммунизации, предпочтительно с применением комбинации гетерологичных векторов.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против множества субтипов филовирусов включает:

а) введение субъекту иммунологически эффективного количества множества rAd26- или rAd35-векторов, содержащих множество нуклеиновых кислот, кодирующих гликопротеины или по существу аналогичные гликопротеины множества подтипов филовирусов; а также

б) введение субъекту иммунологически эффективного количества множества MVA-векторов, содержащих множество нуклеиновых кислот, кодирующих гликопротеины или по существу аналогичные гликопротеины, при этом этапы (а) и (б) осуществляют в любом порядке.

В одном или более вариантах реализации описанного способа множество rAd26- или rAd35-

векторов используется для формирования первичного ("прайм") иммунного ответа, а множество MVA-векторов используется для усиления ("буст") иммунного ответа или наоборот.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, согласно описанному способу, множество rAd26-векторов используется для "прайм"-иммунизации с последующей "буст"-иммунизацией множеством MVA-векторов. Предпочтительно, "буст"-иммунизацию проводят через 1-12 недель после проведения "прайм"-иммунизации, более предпочтительно через 1, 2, 4 или 8 недель после проведения "прайм"-иммунизации.

Антигены в соответствующих "прайм"- и "буст"-композициях (тем не менее, используются многие "буст"-композиции) не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть по существу сходными между собой.

Введение иммуногенных композиций, содержащих векторы, как правило, осуществляется внутримышечно или подкожно. Однако, могут быть предусмотрены также и другие способы введения, такие как внутривенное, кожное, внутрикожное или назальное введение. Внутримышечное введение иммуногенных композиций может быть осуществлено с помощью иглы для введения суспензии аденовирусного вектора. Альтернативным способом является использование безыгольного инъектора для введения композиции (например, Biojector (TM)) или лиофилизированного порошка, содержащего вакцину.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения вектор должен иметь форму парентерально приемлемого водного раствора с апиогенными свойствами, подходящими pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники вполне способны приготовить пригодные растворы с использованием, например, изотонических растворителей, таких как раствор натрия хлорида для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. Также при необходимости в состав могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Также может использоваться состав с замедленным высвобождением.

Как правило, введение будет осуществляться с профилактической целью для формирования иммунного ответа против антигена филловируса до инфицирования или развития симптомов. Заболевания и нарушения, которые можно лечить или предупреждать согласно настоящему изобретению, включают в себя такие патологии, в которых иммунный ответ может играть защитную или терапевтическую роль. В других вариантах реализации настоящего изобретения аденовирусные и MVA-векторы могут вводить с целью постконтактной профилактики.

Иммуногенные композиции, содержащие аденовирусные векторы, вводят субъекту, тем самым формируя у субъекта иммунный ответ против филловирсов. Количество композиции, достаточное для индуцирования детектируемого иммунного ответа, определяется как "иммунологически эффективная доза". Как показано ниже, иммуногенные композиции по настоящему изобретению индуцируют гуморальный, а также клеточно-опосредованный иммунный ответ. В типичном варианте реализации изобретения иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фактическое количество для введения, а также скорость и динамика введения будут зависеть от этиологии и тяжести заболевания, по поводу которого проводится лечение. Назначение лечения, например, решения относительно дозы и т. п., находятся в пределах компетенции врачей общей практики и врачей другого профиля, или в контексте ветеринарии - ветеринарных врачей; при этом обычно учитывается характер заболевания, подлежащего лечению, состояние здоровья конкретного пациента, место и способ введения, а также другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

После получения аденовирусных и MVA-векторов и необязательного включения таких частиц в композиции, векторы могут быть введены индивидууму, в частности человеку или другому примату. Введение можно осуществить человеку или другому млекопитающему, например, мыши, крысе, хомяку, морской свинке, кролику, овце, козе, свинье, лошади, корове, ослу, обезьяне, собаке или кошке. Введение млекопитающему, не являющегося человеком, не обязательно должно осуществляться в терапевтических целях, а может быть использовано в экспериментальном контексте, например, в исследовании механизмов иммунного ответа против аденовирусных или MVA-векторов.

Согласно одной типовой схеме аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от около 100 мкл до 10 мл, содержащем концентрации от около 10^4 до 10^{12} вирусных частиц/мл.

Предпочтительно аденовирусный вектор вводят в объеме от 0,25 до 1,0 мл. Более предпочтительно аденовирусный вектор вводят в объеме 0,5 мл.

Как правило, аденовирус вводят в количестве от около 10^9 до около 10^{12} вирусных частиц (вч) субъекту-человеку за одно введение, более типично в количестве от около 10^{10} до около 10^{12} вч. В предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусный вектор вводят в количестве около 5×10^{10} вч. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусный вектор вводят в количестве около $0,8 \times 10^{10}$ вч. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения аденовирусный вектор вводят в количестве около 2×10^{10} вч. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения аде-

новирусный вектор вводят в количестве около 4×10^{10} вч. В некоторых вариантах реализации изобретения аденовирусы составлены в виде трехвалентной композиции, в которой три аденовируса, каждый с разной вставкой, смешивают друг с другом. В трехвалентной композиции каждый отдельный аденовирус, предпочтительно, присутствует в количестве около 4×10^{10} вч. В указанной трехвалентной композиции общее число частиц аденовируса на дозу составляет около 1×10^{11} вч. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения каждый отдельный аденовирус в трехвалентной композиции присутствует в количестве около 1×10^{11} вч. В указанной трехвалентной композиции общее число частиц аденовируса на дозу впоследствии составляет около 3×10^{11} вч. После первичной вакцинации проводится "буст"-вакцинация, как описано выше.

Согласно другой типовой схеме MVA-вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от около 100 мкл до около 10 мл солевого раствора, содержащего дозу от около 1×10^7 TCID₅₀ до 1×10^9 TCID₅₀ (50% инфекционной дозы в тканевой культуре) или Инф.Ед. (инфекционная единица). Предпочтительно MVA-вектор вводят в объеме от 0,25 до 1,0 мл. Более предпочтительно MVA-вектор вводят в объеме 0,5 мл.

Как правило, MVA-вектор вводят в дозе от около 1×10^7 TCID₅₀ до 1×10^9 TCID₅₀ (или Инф.Ед) субъекту-человеку за одно введение.

В предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве от около 5×10^7 TCID₅₀ до 5×10^8 TCID₅₀ (или Инф.Ед). В более предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве около 5×10^7 TCID₅₀ (или Инф.Ед). В более предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве около 1×10^8 TCID₅₀ (или Инф.Ед). В другом предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве около $1,9 \times 10^8$ TCID₅₀ (или Инф.Ед). В еще одном предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве около $4,4 \times 10^8$ TCID₅₀ (или Инф.Ед). В более предпочтительном варианте реализации изобретения MVA-вектор вводят в количестве около 5×10^8 TCID₅₀ (или Инф.Ед).

Если желательно, композиция может быть представлена в виде набора, упаковки или дозатора, который может содержать одну или более единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Набор, упаковка, или дозатор может сопровождаться инструкциями для введения.

Композиции по настоящему изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с другими способами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

Примеры

Следующие примеры приведены в иллюстративных целях, а не для ограничения настоящего изобретения, изложенного в заявке.

Пример 1.

В рамках продолжения начатых разработок с целью идентификации поливалентной филовиральной вакцины с фактической эффективностью $\geq 80\%$ по отношению ко многим филовирусам [например, Марбург, Эбола (также известный как Заир) и Судан] было проведено исследование на животных. В исследовании анализировали расширенную схему вакцинации с двумя или тремя введениями и эффект использования гетерологичных (в отличие от гомологичных) комбинаций вакцин на полученные иммунные ответы против целевых филовирусов у НЧП. Вакцинированных НЧП инфицировали вирусом Эбола Kikwit с целью анализа эффективности применяемых вакцинаций.

Обращение с животными

Эти исследования не противоречили всем применимым разделам Окончательных правил положений Закона о защите животных (9 CFR Части 1, 2 и 3) и Руководству по уходу и использованию лабораторных животных - National Academy Press, Washington D.C. Восмое издание (Руководство).

В общей сложности 16 яванских макаков (*Macaca fascicularis*) (НЧП) (12 самцов и 4 самки), яванских макаков маврикийского происхождения в возрасте 4-5 лет, около 4-8 кг каждый, были приобретены у PrimGen (Хайнс, Иллинойс). Животные были экспериментально наивными относительно вируса Рестон (RESTV), что доказано с помощью ELISA до вакцинации. Животные, ранее инфицированные *Mycobacterium tuberculosis*, обезьяньим вирусом иммунодефицита (SIV), обезьяньим Т-лимфотропным вирусом-1 (STLV-1), герпесвирусом Macacine 1 (вирус герпеса В) и обезьяньим ретровирусом (SRV1 и SRV2), исключались из исследования; кроме того, проводили анализ на активные инфекции, вызванные *Salmonella* и *Shigella*, и подтверждали отрицательный результат на *Mycobacterium tuberculosis*.

Филовirus являются патогенами 4 группы риска (требующие высокого уровня защиты); поэтому все манипуляции с эболавирусом Заир, эболавирусом Судан или вирусами Марбург проводили в CDC-аккредитованной лаборатории с высоким уровнем защиты (уровень биологической безопасности (BSL)-4/уровень биологической безопасности животных (ABSL-4)).

Вакцинные материалы

rAd-векторы изготовлены компанией Crucell Holland B.V. Эти векторы представляют собой очищенные репликационно дефицитные рекомбинантные аденовирусные вакцинные векторы типа 26 или

типа 35 (Ad26 и Ad35, соответственно), с удаленным E1/E3, содержащие гены гликопротеина (ГП) филловируса, встроенные в положение E1. Эти векторы деблокировали в клетках PER.C6®, бляшки очищали, укрупняли, затем очищали с помощью двухэтапной процедуры CsCl-бэндинга, после этого вводили в композиционный буфер на основе ТРИС и хранили при температуре ниже -65°C. Выпуск этих векторов для использования *in vivo* разрешается при прохождении теста бионагрузки, низком уровне ферментативных единиц (<5 ФЕ/мл) и подтверждении экспрессии и целостности трансгена.

В частности, векторы rAd экспрессировали ГП EBOV Mayinga (SEQ ID NO: 1), ГП SUDV Gulu (SEQ ID NO: 2) и ГП MARV Ангола (SEQ ID NO: 3). Каждый rAd-вектор экспрессировал один отдельный антигенный белок (ГП).

MVA-векторы изготовлены компанией Bavarian Nordic. В частности, MVA-мультивектор (MVA-BN-Filo) экспрессировал 4 различных антигенных белков: ГП EBOV Mayinga (SEQ ID NO: 1), ГП SUDV Gulu (SEQ ID NO: 2) и ГП MARV Musoke (SEQ ID NO: 4), а также НП вируса леса Таи (TAFV) (SEQ ID NO: 5).

Вакцинные материалы хранили при температуре -80°C в морозильной камере с регулируемой температурой.

Вакцинация и дизайн эксперимента

См. фиг. 1 и 2 для получения характеристик групп в исследовании и ознакомления с дизайном эксперимента.

Яванских макаков (*Macaca fascicularis*) (НЧП) вакцинировали с использованием двух различных вакцинных платформ, по 2 животных на группу, в дополнение к контрольной группе, состоящей из двух "наивных" контролей (которым вводили пустой вектор). Животные были впервые вакцинированы рекомбинантным вектор(ами) в группах, как показано на фиг. 1. Каждый макак получал анестезию и внутримышечную (в/м) инъекцию вакцины в левое заднее бедро. "Прайм"- и "буст"-дозы вводили с интервалом 4 или 8 недель (фиг. 1). Каждая доза аденовирусов заключалась в одной внутримышечной инъекции в левое заднее бедро. MVA-векторы вводили подкожно.

Цельную кровь с ЭДТК или гепарином отправляли в течение ночи при комнатной температуре в Texas Biomed на Д28, Д56 и Д63. Дополнительно, цельную кровь с ЭДТК или гепарином собирали на Д77, тогда как животных помещали в Texas Biomed. Во все эти моменты времени цельную кровь с ЭДТК обрабатывали для получения МКПК и плазмы в Texas Biomed.

МКПК применяли в анализе ИФН-g ELISPOT с использованием пептидных пулов 1 и 2 эболавируса Заир, пептидных пулов 1 и 2 вируса Судан Gulu, консенсусного пептидного пула Эболавируса, пептидных пулов 1 и 2 вируса Марбург Ангола и консенсусного пептидного пула вируса Марбург, вместе с ДМСО только для отрицательного контроля и стимуляцией анти-CD3 - для положительного контроля. Все стимуляции проводили в двух повторностях, в общей сложности 20 лунок на НЧП.

Дополнительно цельную кровь без антикоагулянта обрабатывали для получения сыворотки в Bioqual на Д0, Д28, Д56 и Д68, а также на Д77 в Texas Biomed. Аликвоты сыворотки, собранной в Bioqual, отправляли в замороженном состоянии в Texas Biomed на Д68. Все образцы сыворотки анализировали методом ELISA на специфические ГП вируса ZEBOV. Кроме того, сыворотку, собранную на Д0, Д56 и Д77, анализировали методом ELISA на специфические ГП вируса SEBOV и ГП вируса MARVA (два разных анализа).

Таблица 1. Анализируемые параметры до инфицирования вирусом Эбола

Параметр	Недели исследования					
	0	4	8	9	10	11
МКПК и обработка плазмы		X	X	X		X
ГП ZEBOV ELISA - все животные	X	X	X		X	X
ГП SEBOV ELISA - все животные	X		X			X
ГП MARVA ELISA - все животные	X		X			X
Филловирус ELISPOT - все животные		X	X	X		X

Инокулят филловируса для инфицирования животных. Как показано на фиг. 2, по истечению около 4 недель после "буст"-вакцинации животных инфицировали вирусом EBOV. В частности, для инфицирования животных использовали вирус EBOV kikwit-9510621, поставляемый компанией Texas Biomed. Второй пассаж клеточной культуры (P2) вируса EBOV kikwit-9510621 получали от д-ра Tom Ksiazek (при NIAID's WRCEVA в UTMB's Национальной лаборатории здравоохранения г. Галвестон) в 2012 году и третий раз размножали в клетках Vero E6 в Texas Biomed с получением титра $2,1 \times 10^5$ БОЕ/мл. EBOV kikwit-9510621. Партия №2012099171.

Титр при получении: $2,1 \times 10^5$ БОЕ/мл использовали для настоящего исследования.

С помощью глубокого секвенирования подтверждено, что исходный материал для инфицирования является вирусом EBOV kikwit 9510621 дикого типа, имеющим только 1 SNP-отличие от консенсусной последовательности GenBank P2. Исходный материал для инфицирования хранили в жидкой фазе паров азота в аликвотах по 500 ± 50 мкл, содержащих носитель (MEM), содержащей 10% FBS. Для получения 100 БОЕ, агент филловирального инфицирования разбавляли до целевой дозы 200 БОЕ/мл в фосфатно-

солевом буфере. Вкратце, исходный вирусный материал разбавляли с помощью трех последовательных разбавлений 1:10 в PBS до достижения концентрации материала для инфицирования 200 БОЕ/мл. В общей сложности каждому животному вводили 0,5 мл материала для инфицирования.

Перед введением вируса обезьянам с целью седации внутримышечно вводили телазол (от 2 до 6 мг/кг; от 5 до 8 мг/кг кетамина в/м, по необходимости, для дополнительной анестезии). На День 0 исследования собирали кровь и каждой обезьяне затем вводили целевую дозу 100 БОЕ вируса EBOV в объеме 0,5 мл путем внутримышечной инъекции в дельтовидную мышцу правого предплечья. Место введения инфицирующего агента записывали.

После введения вируса всех обезьян возвращали в родные клетки и наблюдали до завершения действия анестетика (стерильное лежачее положение/способность поддерживать вертикальное положение). Конечными критериями оценки в этом исследовании были выживаемость/невыживаемость. Невыживаемость определяли как наличие у животного неизлечимого заболевания или смерть животного. Состояние здоровья животных фиксировали в оценочном листе ежедневного клинического наблюдения.

Анализ ELISA для выявления антител анти-EBOV ГП IgG

Филовирус-специфический гуморальный ответ определяли в моменты времени, описанные в табл. 1, с помощью модифицированного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), как описано ранее в публикации Sullivan et al. (2006) (Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. PLoS Medicine 3, e177), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Вкратце, планшеты ELISA покрывали на ночь лектином Galanthus Nivalis в концентрации 10 мкг/мл. Затем, после блокирования планшеты покрывали либо супернатантом специфического ГП штамма Эбола, либо штамма Марбург. Эти супернатанты получали путем транзитного трансфицирования HEK293T с экспрессионными плазмидами, кодирующими филовирусный гликопротеин удаляемого трансмембранного домена и цитоплазматического концевой сегмента. Образцы сыворотки обезьян тестировали в 4-кратной серии разбавлений, начиная с 1:50. Связанный IgG выявляли с помощью колориметрии при длине волны 492 нм. Относительные титры антител в сыворотке крови рассчитывали по отношению к эталонной специфической сыворотке с гликопротеином штамма филовируса. Результаты анализа Elisa приведены на фиг. 4-6.

Анализ ИФН-g ELISPOT

Филовирус-специфический клеточный ответ определяли в моменты времени, описанные в табл. 1, с помощью иммуноферментного спот-анализа с интерфероном-гамма (ELISPOT), как описано ранее в публикации Ophorst et al., 2007 (Increased immunogenicity of recombinant Ad35-based malaria vaccine through formulation with aluminium phosphate adjuvant. Vaccine 25, 6501-6510), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Пептидные пулы, используемые для стимуляции гликопротеина как штамма Эбола, так и штамма Марбург, состоят из 15-меров, перекрывающихся 11 аминокислотами. Для того, чтобы свести к минимуму нежелательные эффекты слишком большого количества пептидов в пуле, каждый гликопротеиновый пептидный пул разделили на две части: одна N-концевая, а другая C-концевая.

Пептиды, которые перекрываются с более чем девятью последовательными аминокислотами в пределах трех Эболавирусов (Заир, Судан и леса Таи) или двух вирусов Марбург (вирусы Марбург и Ravn), объединяли в консенсусный пул. Пептидные пулы и отдельные пептиды применяли в конечной концентрации 1 мкг/мл для каждого отдельного пептида. Результаты анализа ELISPOT приведены на фиг. 7.

Результаты проведенного исследования на животных, представленные на фиг. 3-7, демонстрируют пригодность rAd- и MVA-векторов в комбинациях "прайм-буст" для профилактики филовирусных инфекций у приматов. В частности, введение одного или более rAd26-векторов, экспрессирующих ГП одного или более типов филовирусов, или MVA-векторов, экспрессирующих множество антигенов филовируса, приводило к эффективному первичному ("прайм") гуморальному ответу против одного или более типов филовирусов. После "буст"-иммунизации на 8 неделе с применением гетерологичного вектора, все вакцинальные схемы индуцировали сходный гуморальный и клеточный иммунный ответ на один или более типов филовирусов, и гарантировали 100% защиту против инфицирования высокопатогенным вирусом Эбола Заир.

Пример 2.

Второе исследование с НЧП проводили для подтверждения иммуногенности и защитной эффективности 2 схем "прайм-буст" с интервалами 0-4 недели и 0-8 недель. Одна схема включала моновалентную вакцину Ad26.ZEBOV для "прайм"-введения и MVA-BN-Filo для "буст"-введения; другая схема включала MVA-BN-Filo для "прайм"-введения и Ad26.ZEBOV для "буст"-введения. Все вакцинации осуществляли внутримышечно. Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) использовали в качестве "прайм"-вакцины в схеме 0-8 недель и комбинировали с "буст"-вакциной MVA-BN-Filo (4 НЧП) в количестве 1×10^8 TCID₅₀ и MVA-BN-Filo (4 НЧП) в количестве 5×10^8 TCID₅₀ с целью оценки влияния стандартной и высокой дозы MVA в этой схеме. Двум дополнительным группам из 4 НЧП вводили в качестве "прайм"-вакцины 1×10^8 TCID₅₀ MVA-BN-Filo и 5×10^8 TCID₅₀ MVA-BN-Filo, соответственно, что в обоих случаях по истечению 4 недель сопровождалось последующей "буст"-иммунизацией Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) с целью анализа влияния

дозы MVA-BN-Filo в качестве "прайм"-вакцины в 4-недельной схеме. Кроме того, двум НЧП вводили Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) в качестве "прайм"-вакцины с последующим введением MVA-BN-Filo в количестве 1×10^8 TCID₅₀. И, наконец, 2 НЧП иммунизировали пустым вектором Ad26 (не экспрессирующим каких-либо антигенов филовируса, в количестве 5×10^{10} вч в/м) и TBS в качестве отрицательного контроля иммунизации в исследовании. Всех животных инфицировали вирусом EBOV Kikwit 1995 дикого типа P3 для инфицирования в количестве 100 БОЕ через 4 недели после последней иммунизации. Характеристика групп в данном исследовании обобщена в табл. 2.

Таблица 2. Экспериментальные группы в исследовании защитного иммунитета нечеловекообразных приматов, инфицированных вирусом EBOV

Группа	Иммунизация 1 (Доза 1)	Иммунизация 2 (Доза 2)	График иммунизации (недели)	Инфицирование После 4 недель	Коэффициент выживаемости (%)
1/A	Ad26.пустой (5×10^{10} вч)	Отрицательный контроль MVA (TBS)	0-8	EBOV (Kikwit)	0/2 (0%)
2/B	Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч)	MVA-BN-Filo (5×10^8 TCID ₅₀)	0-8	EBOV (Kikwit)	4/4 (100%)
3/C	MVA-BN-Filo (5×10^8 TCID ₅₀)	Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч)	4-8	EBOV (Kikwit)	2/4 (50%)
4/D	Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч)	MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID ₅₀)	0-8	EBOV (Kikwit)	4/4 (100%)
5/E	MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID ₅₀)	Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч)	4-8	EBOV (Kikwit)	2/4 (50%)
6/F	Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч)	MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID ₅₀)	4-8	EBOV (Kikwit)	2/2 (100%)

Сокращения: TBS: ТРИС-буферизированный солевой раствор; TCID₅₀: 50% инфекционной дозы в тканевой культуре; вч: вирусные частицы. 100% выживаемость выделена жирным шрифтом.

Иммуногенность

Иммунный ответ в НЧП оценивали с учетом выработки антител, связывающих и нейтрализующих филовирусный ГП (ELISA), а также цитокинов, продуцирующих Т-клетки (ELISpot).

ELISA

Реакционноспособные антитела к ГП EBOV Mayinga анализировали с помощью ГП-специфического анализа ELISA для всех моментов времени (см. фиг. 20).

Анализ ELISA для выявления антител анти-EBOV ГП IgG проводили, как описано в эксперименте 1. Титры антител в анализе ELISA не определялись у контрольных вакцинированных животных. Вакцинальные схемы характеризовались иммуногенностью у всех животных. Самые высокие титры наблюдались в Группе В, получавшей Ad26.ZEBOV и высокую дозу MVA-BN-Filo с 8-недельным интервалом.

Профилактическая эффективность

Обе 8-недельные "прайм/буст" схемы Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo приводили к полному выживанию после инфицирования вирусом EBOV, независимо от дозы MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀ или 5×10^8 TCID₅₀). Кроме того, 4-недельная схема Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo обеспечила защиту 2 из 2 НЧП. Обе 4-недельные схемы MVA-BN-Filo/Ad26.ZEBOV обеспечили защиту 2 из 4 НЧП.

Пример 3.

Провели клиническое исследование с участием людей для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности схем с использованием MVA-BN-Filo в дозе 1×10^8 TCID₅₀ и Ad26.ZEBOV в дозе 5×10^{10} вч. Исследование состояло из двух частей.

Основное исследование представляло собой рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование с маскированием данных для наблюдателя и проводилось с участием 72 здоровых взрослых субъектов, которые никогда до этого не получали экспериментальную кандидатную вакцину против вируса Эбола и не имели какого-либо известного контакта с вирусом Эбола или диагностированного заболевания, вызванного вирусом Эбола. В этом исследовании анализировали 4 схемы: 2 схемы включали MVA-BN-Filo в качестве "прайм"-вакцины и Ad26.ZEBOV в качестве "буст"-вакцины с 28- или 56-дневным интервалом, и 2 схемы включали Ad26.ZEBOV в качестве "прайм"-вакцины и MVA-BN-Filo в качестве "буст"-вакцины с 28- или 56-дневным интервалом.

Группа из 15 здоровых взрослых субъектов участвовала в открытой, неконтролируемой нерандомизированной части подисследования, проводимой с целью оценки безопасности, переносимости и иммуногенности схемы с применением Ad26.ZEBOV в дозе 5×10^{10} вч в качестве "прайм"-вакцины и MVA-BN-Filo в дозе 1×10^8 TCID₅₀ в качестве "буст"-вакцины через 14 дней.

Исследование состояло из периода вакцинации, в котором субъектов вакцинировали на исходном уровне (День 1), а затем проводили "буст"-иммунизацию на День 15, 29 или 57, а также наблюдали в периоде после "буст"-иммунизации до наступления для всех субъектов Визита на День 21 после "буст"-

иммунизации (День 36, 50 или 78) или до прекращения участия субъектов в исследовании раньше.

Субъектов в основном исследовании распределяли на 4 разных группы по 18 здоровых субъектов в каждой. В целом, субъекты были рандомизированы в пределах группы в соотношении 5:1 для получения активной вакцины или плацебо (0,9% солевой раствор) путем в/м инъекций (0,5 мл) следующим образом:

MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) на День 1, с последующим "буст"-введением Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) на День 29 (Группа 1) или День 57 (Группа 2), или

Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) на День 1, с последующим "буст"-введением MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) на День 29 (Группа 3) или День 57 (Группа 4).

15 субъектов в подисследовании получали активную вакцину путем в/м инъекций (0,5 мл) следующим образом:

Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) на День 1, с последующим "буст"-введением MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) на День 15 (Группа 5).

Примерные графики вакцинации в исследовании приведены в табл. 3.

Таблица 3. Графики вакцинации в исследовании

Группа	N	День 1	День 15	День 29	День 57
1	18	15 MVA-BN-Filo 1×10^8 TCID ₅₀	-	Ad26.ZEBOV 5×10^{10} вч	-
		3 плацебо (0,9% солевой раствор)	-	плацебо (0,9% солевой раствор)	-
2	18	15 MVA-BN-Filo 1×10^8 TCID ₅₀	-	-	Ad26.ZEBOV 5×10^{10} вч
		3 плацебо (0,9% солевой раствор)	-	-	плацебо (0,9% солевой раствор)
3	18	15 Ad26.ZEBOV 5×10^{10} вч	-	MVA-BN-Filo 1×10^8 TCID ₅₀	-
		3 плацебо (0,9% солевой раствор)	-	плацебо (0,9% солевой раствор)	-
4	18	15 Ad26.ZEBOV 5×10^{10} вч	-	-	MVA-BN-Filo 1×10^8 TCID ₅₀
		3 плацебо (0,9% солевой раствор)	-	-	плацебо (0,9% солевой раствор)
5	15	Ad26.ZEBOV 5×10^{10} вч	MVA-BN-Filo 1×10^8 TCID ₅₀	-	-

N: количество субъектов, рандомизированных для получения исследуемой вакцины; TCID₅₀: 50% инфекционной дозы в тканевой культуре; вч: вирусные частицы.

Безопасность оценивали путем сбора запрашиваемых сообщений о местных и системных нежелательных явлениях, незапрашиваемых сообщений о нежелательных явлениях и серьезных нежелательных явлениях, а также при физикальном обследовании. Кроме того, в различные моменты времени оценивали стандартные биохимические, гематологические (включая коагуляционные) параметры и анализ мочи.

Иммуногенность оценивали с помощью иммунологических анализов, сведенных в табл. 4 и 5. Блок поисковых анализов мог включать, но не ограничиваясь этим, перечисленные анализы.

Таблица 4. Краткое описание иммунологических анализов (серология)

Анализ	Цель
Вторичные критерии оценки	
Анализ нейтрализации вируса	Анализ нейтрализующих антител к ГП EBOV
ELISA	Анализ антител, связывающихся с ГП EBOV
Поисковые критерии оценки	
Анализ нейтрализации аденовируса/MVA	Нейтрализующие антитела к аденовирусу/MVA
Молекулярная характеристика антител	Анализ характеристик антител анти-EBOV ГП, SUDV ГП, MARV ГП и/или TAFV НП, включая субтипирование IgG
Поисковый анализ ELISA	Анализ связывающих антител к другому источнику ГП EBOV

EBOV: Вирус Эбола; ELISA: твердофазный иммуносорбентный анализ; ГП: гликопротеин; IgG: иммуноглобулин G; MARV: Вирус Марбург; MVA: модифицированный вирус осповакцины Анкара; NP: нуклеопротеин; SUDV: вирус Судан; TAFV: вирус леса Таи.

Таблица 5. Краткое описание иммунологических анализов (клеточные анализы)

Анализ	Цель
Вторичные критерии оценки	
ELISpot	Т-клеточные ИФН-γ ответы на ГП EBOV
Поисковые критерии оценки	
ICS-анализ замороженных МКПК	Анализ ответов Т-клеток на ГП EBOV, ГП SUDV, ГП MARV и/или НП TAFV (включая CD4/8, ИЛ-2, ИФН-γ, ФНО-α и/или маркеры активации)
ICS и/или ELISpot свежих МКПК	Анализ Т-клеточных ответов на ГП EBOV, включая CD4-положительные и низкие по силе Т-клеточные ответы

EBOV: Вирус Эбола; ELISpot: метод иммуноферментных пятен; ГП: гликопротеин; ICS: внутриклеточное цитокиновое окрашивание; ИФН: интерферон; ИЛ: интерлейкин; MARV: Вирус Марбург; НП: нуклеопротеин; МКПК: мононуклеарные клетки периферической крови; SUDV: вирус Судан; TAFV: вирус леса Таи; ФНО: фактор некроза опухоли.

Клиническое исследование продолжается. Некоторые из первичных результатов описаны ниже.

Оценка безопасности

Безопасность оценивали путем сбора запрашиваемых сообщений о местных и системных нежелательных явлениях, незапрашиваемых сообщений о нежелательных явлениях и серьезных нежелательных явлениях, а также при физикальном обследовании. Кроме того, в различные моменты времени оценивали стандартные биохимические, гематологические (включая коагуляционные) параметры и анализ мочи.

Данные по безопасности этого первого исследования с участием людей показали, что на этом этапе обе вакцины по всей видимости хорошо переносятся с наличием обратимых реакций, которые обычно ожидаются от вакцинации. С применением вакцины не ассоциировалось каких-либо существенных нежелательных явлений. Большинство явлений имели легкую степень тяжести, возникали по истечению от одного до двух дней после вакцинации и длились в среднем от одного до двух дней. Случаи лихорадки наблюдались очень редко.

Оценка иммунного ответа

Иммуногенность оценивали до 21 дня после "буст"-иммунизации с помощью метода ELISA - для анализа антител, связывающихся с ГП EBOV, с помощью метода ELISpot - для анализа EBOV ГП-специфического Т-клеточного ответа, и с помощью ICS-анализов - для выявления CD4+ и CD8+ Т-клеточных ответов на ГП EBOV. Образцы для анализов гуморального и клеточного иммунного ответа, индуцированного исследуемой вакциной, собирали в Дни 1, 8, 29, 36 и 50 в Группы 1 и 3 и в Дни 1, 8, 29, 57, 64 и 78 в Группы 2 и 4.

Оценка гуморального иммунного ответа

Ответы связывающих антител, индуцированные исследуемыми вакцинами, оценивали с помощью анализа анти-EBOV ГП ELISA (фиг. 8). Важно отметить, что у всех субъектов, получивших вакцину согласно схеме, отмечали сероконверсию на День 21 после "буст"-иммунизации. Сильный иммуногенный ответ наблюдали во всех иммунизированных субъектах.

В то время как EBOV ГП-специфический иммунный ответ после "прайм-буст"-введения вакцины MVA-BN-Filo наблюдали только при низких уровнях в 7-40% субъектов, сильный антиген-специфический ответ наблюдали после "буст"-введения вакцины Ad26.ZEBOV на День 28 или День 56 после "прайм"-введения. Неожиданно было обнаружено, что этот ответ является более сильным, чем индуцированный обратной схемой вакцинации с тем же "прайм-буст" временным интервалом (Группа 3 и Группа 4, "прайм"-введение Ad26.ZEBOV с последующим "буст"-введением MVA-BN-Filo через 28 или 56 дней, соответственно) на День 21 после "буст"-иммунизации [Геометрические средние титры с 95% доверительным интервалом для ФЕ/мл 10573 (6452; 17327) и 4274 (2350; 7775) для Групп 1 и 3, соответственно, и 18729 (12200; 28751) и 7553 (511; 1115) для Групп 2 и 4, соответственно].

Следует отметить, что в нечеловекообразного примата (НЧП) бустирование Ad26-вектором "прайм"-введения MVA приводило к формированию EBOV ГП-специфического иммунного ответа, который был сравним по силе с ответом, индуцированным обратной схемой вакцинации (Ad/MVA), с тем же "прайм-буст" временным интервалом (см. фиг. 4) или был сравним с ответом, который уступал по силе (фиг. 20). Таким образом, иммунные ответы, наблюдаемые при применении одной конкретной схемы "прайм-буст" в НЧП не являлись предиктивными для иммунных ответов, наблюдаемых в результате применения аналогичной схемы "прайм-буст" у людей.

Оценка клеточного иммунного ответа

EBOV ГП-специфический клеточный ответ определяли с помощью анализа ELISpot с интерфероном-гамма (ИФН-γ) и анализа ICS. Для оценки клеточного иммунного ответа сохраненные МКПК (мононуклеарные клетки периферической крови) оттаивали и стимулировали пептидами, организованными в 2 пула (Пулы 1 и 2). Сумма Т-клеточных ответов, стимулированных в пуле, приведена на фиг. 9.

С помощью анализа ELISpot (фиг. 9), ответ ИФН-γ может быть легко обнаружен в 50-60% субъектов на День 29 после "прайм"-иммунизации с применением Ad26.ZEBOV (средний ИФН-γ ответ 103 и 58 пятноформирующих единиц на миллион МКПК для Группы 3 и 4 соответственно) и у 86% субъектов в

День 57 после "прайм"-иммунизации вакциной Ad26.ZEBOV (Группа 4, средний ИФН- γ ответ 283 пикоформующих единицы на миллион (ПОЕ/10⁶) МКПК). Эти ответы дополнительно усиливали с помощью "буст"-иммунизации на День 29 или День 57 с применением MVA-BN-Filo (87% "ответчиков", средний ИФН- γ ответ 463 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 3, 86% "ответчиков", 648 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 4) и поддерживали на этом уровне вплоть до Дня 21 после "буст"-введения (79% "ответчиков", средний ИФН- γ ответ 390 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 3 и 100% "ответчиков", 464 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 4).

Результаты клеточных анализов, измеряющих специфические CD4+ и CD8+Т-клеточные ответы с помощью ICS, приведены на фиг. 10-15.

Как и следовало ожидать, никакого EBOV ГП-специфического CD8+или CD4+ Т-клеточного ответа не наблюдали в индивидуумах, иммунизированных плацебо (фиг. 10 и 13). Также не наблюдали CD8+ цитокиновых ответов на День 29 или День 57 после "прайм"-иммунизации вакциной MVA-BN-Filo (Группы 1 и 2). Тем не менее, вакциноиндуцированный CD8+ Т-клеточный ответ наблюдали у 53% субъектов через 7 дней после "буст"-введения Ad26.ZEBOV (средний общий цитокиновый ответ: 0,08% и 0,07%, в случае если "буст"-иммунизацию Ad26-вектором проводили в День 29 или День 57 соответственно; фиг. 10). Этот ответ сохранялся на День 21 после "буст"-иммунизации (средний общий цитокиновый ответ: 0,1% и 0,06%, в случае если "буст"-иммунизацию Ad26-вектором проводили в День 29 или День 57 соответственно; фиг. 10). Для сравнения, у 57% субъектов, получавших "прайм"-иммунизацию вакциной Ad26.ZEBOV (Группа 3 и Группа 4), на День 29 отмечался CD8+ Т-клеточный ответ (средний общий цитокиновый ответ: 0,12 и 0,05%, соответственно); у 86% субъектов, получавших "прайм"-иммунизацию вакциной Ad26.ZEBOV (Группа 4), на День 57 отмечался CD8+ Т-клеточный ответ (средний общий цитокиновый ответ: 0,19%). Этот ответ дополнительно усиливался после "буст"-иммунизации вакциной MVA-BN-Filo на День 29, при этом у 67% и 73% субъектов отмечался ответ на День 7 и 21 после "буст"-иммунизации, соответственно (средний ответ: 0,27% в оба дня).

Неожиданно было обнаружено, что в то время как в Группе 1 наблюдали меньший процент "ответчиков" (MVA-Ad2 6, схема "прайм-буст" 0-28 дней) по сравнению с Группой 3 (Ad26-MVA схема "прайм-буст" 0-28 дней), доля полифункциональных CD8+ Т-клеток (CD8+ Т-клетки, экспрессирующие более одного цитокина), индуцированных введением "прайм-буст" MVA-Ad26 в этих "ответчиков", была выше после "буст"-иммунизации, чем клеток, индуцированных введением "прайм-буст" Ad2 6-MVA (фиг. 11). Это различие не наблюдалось, в случае если "прайм"- и "буст"-иммунизацию проводили в День 57. При этом графике вакцинации, как схема "MVA - прайм, Ad26 - буст" (Группа 2), так и схема "Ad26 - прайм, MVA - буст" (Группа 4), индуцировали продукцию точно такой же высокой доли полифункциональных CD8+ Т-клеток (фиг. 12).

Неожиданно было обнаружено, что "прайм"-иммунизация вакциной MVA-BN-Filo последующим "буст"-введением Ad26.ZEBOV после 28-дневного интервала (Группа 1), индуцировали очень стойкий CD4+ Т-клеточный ответ, который достигал своего пика через 7 дней после "буст"-иммунизации (93% "ответчиков", средний общий цитокиновый ответ 0,37%; фиг. 13). На своем пике указанный CD4+ Т-клеточный ответ был более высоким, чем ответ, наблюдаемый в Группе 3 после "прайм"-иммунизации вакциной Ad26.ZEBOV с последующей "буст"-иммунизацией вакциной MVA-BN-Filo после 28-дневного интервала (67% "ответчиков", средний общий цитокиновый ответ 0,11%). День 21 после "буст"-иммунизации CD4+ Т-клеточные ответы, индуцированные обеими схемами, оставались сопоставимы. Увеличение интервала в схеме MVA-BN-Filo/Ad26.ZEBOV до 56 дней приводило к снижению CD4+ Т-клеточных ответов. Схема Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo индуцировала несколько ниже CD4+ Т-клеточные ответы при интервале 28 дней и сопоставимые ответы при интервале 56 дней. CD4+ Т-клетки, индуцируемые обеими вакцинными комбинациями, были преимущественно полифункциональными (фиг. 14 и 15).

Результаты подисследования, оценивающего иммуногенность "прайм"-иммунизации вакциной Ad26.ZEBOV в количестве 5×10^{10} вч с последующей "буст"-иммунизацией через 14 дней вакциной MVA-BN-Filo в количестве 1×10^8 TCID₅₀, приведены ниже.

В целом, было показано, что эта относительно короткая схема с 14-дневным интервалом между "прайм"- и "буст"-введениями является иммуногенной. Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию оценивали с помощью ELISA. Согласно наблюдениям при более продолжительных интервалах, у всех субъектов отмечали сероконверсию на День 21 после "буст"-иммунизации (фиг. 16А). Кроме того, у 92% субъектов на День 21 после "буст"-иммунизации с помощью анализа ELISpot регистрировали клеточный иммунный ответ (фиг. 16В). Указанный клеточный иммунный ответ обуславливался как CD4+ (67% "ответчиков", средний ответ 0,08% на День 21 после "буст"-иммунизации), так и CD8+ (64% "ответчиков", средний ответ 0,15% на День 7 после "буст"-иммунизации) специфическими Т-клетками. Иммунный ответ, индуцированный схемой с 2-недельным интервалом, определялся несколько ниже, чем ответ, индуцированный при применении схем с более длинными интервалами между "прайм"- и "буст"-введениями (см. предыдущий раздел).

Пример 4.

Рандомизированное, плацебо-контролируемое, исследование с маскированием данных для наблю-

дателя (с предшествующей первичной открытой вакцинацией в общей сложности 6 контрольных субъектов исследования) проводили с целью оценки безопасности, переносимости и иммуногенности гетерологичного введения (а) разовой дозы MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) или плацебо (0,9% солевой раствор) в качестве "прайм"-иммунизации с последующей одной дозой Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) или плацебо в качестве "буст"-иммунизации в различные моменты времени (14, 28 или 56 дней после "прайм"-введения; Группы от 1 до 3) и (б) разовой дозы Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) или плацебо в качестве "прайм"-иммунизации с последующей одной дозой MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) или плацебо в качестве "буст"-иммунизации через 28 дней после "прайм"-введения (Группа 4).

С целью оценки безопасности 2 вакцин изолированно, в исследование были включены Группы 5 и 6, при этом гомологичные схемы 2 разовых доз MVA-BN-Filo (1×10^8 TCID₅₀) или плацебо, или 2 разовых доз Ad26.ZEBOV (5×10^{10} вч) или плацебо, вводили с коротким графиком вакцинации "прайм-буст", состоящим от 1 до 15 дней. Данное исследование проводили с участием около 92 здоровых субъектов в возрасте от 18 до 50 лет (включительно), которые никогда до этого не получали экспериментальную кандидатную вакцину против вируса Эбола и не имели какого-либо известного контакта с вирусом Эбола или диагностированного заболевания, вызванного вирусом Эбола.

Исследование состояло из периода вакцинации, в котором субъектов вакцинировали на исходном визите (День 1), а затем проводили "буст"-иммунизацию на День 15, 29 или 57, а также наблюдали в периоде после "буст"-иммунизации до наступления дня для всех субъектов Визита на День 21 после "буст"-иммунизации или до прекращения участия субъектов в исследовании раньше. В тот момент исследования "демаскировали".

Субъектов определяли в 6 разных групп, включающих 18 (Группы от 1 до 4) или 10 (Группы 5 и 6) здоровых субъектов каждая. В Группе от 1 до 4 субъекты были рандомизированы в соотношении 5:1 для получения активной вакцины или плацебо в течение всего исследования. В каждой из Групп 5 и 6 была сигнальная когорта, состоящая из 3 субъектов, которые получали активную вакцину в демаскированном виде, и когорта, состоящая из 7 субъектов, рандомизированных в соотношении 6:1 для получения активной вакцины или плацебо в маскированном виде. Графики вакцинации в исследовании в разных группах представлены в табл. 6.

Безопасность оценивали путем сбора запрашиваемых сообщений о местных и системных нежелательных явлениях, незапрашиваемых сообщений о нежелательных явлениях и серьезных нежелательных явлениях, а также при физикальном обследовании. Кроме того, в различные моменты времени оценивали стандартные биохимические, гематологические (включая коагуляционные) параметры и анализ мочи.

Иммуногенность оценивали с помощью иммунологических анализов, сведенных в табл. 7 и 8. Блок поисковых анализов мог включать, но не ограничиваясь этим, перечисленные анализы.

Таблица 6. Графики вакцинации в исследовании

Группа	N	n	День 1	День 15	День 29	День 57
1	18	15	MVA-BN-Filo	Ad26.ZEBOV		
		3	Плацебо	Плацебо		
2	18	15	MVA-BN-Filo		Ad26.ZEBOV	
		3	Плацебо		Плацебо	
3	18	15	MVA-BN-Filo			Ad26.ZEBOV
		3	Плацебо			Плацебо
4	18	15	Ad26.ZEBOV		MVA-BN-Filo	
		3	Плацебо		Плацебо	
5	10	3	MVA-BN-Filo (сигнальный)	MVA-BN-Filo (сигнальный)		
		6	MVA-BN-Filo	MVA-BN-Filo		
		1	Плацебо	Плацебо		
6	10	3	Ad26.ZEBOV (сигнальный)	Ad26.ZEBOV (сигнальный)		
		6	Ad26.ZEBOV	Ad26.ZEBOV		
		1	Плацебо	Плацебо		

N: количество субъектов, рандомизированных для получения исследуемой вакцины уровень дозы MVA-BN-Filo составляет 1×10^8 TCID₅₀ (50% инфекционной дозы в тканевой культуре) во всех группах; уровень дозы Ad26.ZEBOV составляет 5×10^{10} вч (вирусных частиц) во всех группах; Плацебо представляет собой 0,9% солевой раствор

Таблица 7. Краткое описание иммунологических анализов (серология)

Анализ	Цель
Вторичные критерии оценки	
Анализ нейтрализации вируса	Анализ нейтрализующих антител к ГП EBOV
ELISA	Анализ антител, связывающихся с ГП EBOV
Поисковые критерии оценки	
Анализ нейтрализации аденовируса/MVA	Нейтрализующие антитела к аденовирусу/MVA
Молекулярная характеристика антител	Анализ характеристик антител анти-EBOV ГП, SUDV ГП, MARV ГП и/или TAFV НП, включая субтипирование IgG
Поисковый анализ ELISA	Анализ связывающих антител к другому источнику ГП EBOV

EBOV: Вирус Эбола; ELISA: твердофазный иммуносорбентный анализ; ГП: гликопротеин; IgG: иммуноглобулин G; MARV: Вирус Марбург; MVA: модифицированный вирус осповакцины Анкара; NP: нуклеопротеин; SUDV: вирус Судан; TAFV: вирус леса Таи.

Таблица 8. Краткое описание иммунологических анализов (клеточные анализы)

Анализ	Цель
Вторичные критерии оценки	
ELISpot	Т-клеточные ИФН-γ ответы на ГП EBOV
Поисковые критерии оценки	
ICS-анализ замороженных МКПК	Анализ ответов Т-клеток на ГП EBOV, ГП SUDV, ГП MARV и/или НП TAFV (включая CD4/8, ИЛ-2, ИФН-γ, ФНО-α и/или маркеры активации)
ICS и/или ELISpot свежих МКПК	Анализ Т-клеточных ответов на ГП EBOV, включая CD4-положительные и низкие по силе Т-клеточные ответы

EBOV: Вирус Эбола; ELISpot: метод иммуноферментных пятен; ГП: гликопротеин; ICS: внутриклеточное цитокиновое окрашивание; ИФН: интерферон; ИЛ: интерлейкин; MARV: Вирус Марбург; НП: нуклеопротеин; МКПК: моноклеарные клетки периферической крови; SUDV: вирус Судан; TAFV: вирус леса Таи; ФНО: фактор некроза опухоли.

Клиническое исследование продолжается. Некоторые из первичных результатов описаны ниже.

Оценка гуморального иммунного ответа

Предварительные результаты подтверждают иммуногенность комбинации Ad26.ZEBOV в количестве 5×10^{10} вч и MVA-BN-Filo в количестве 1×10^8 TCID₅₀ в случае если одна вакцина используется для "прайм"-введения, а другая - для "буст"-введения.

Как показано на фиг. 17, у всех субъектов отмечали сероконверсию на День 21 после "буст"-иммунизации, подтвержденную анализом ELISA. Как и в предыдущих экспериментах, более высокий иммунный ответ наблюдался на День 21 после "буст"-иммунизации, в случае если MVA использовали в качестве "прайм"-вакцины, а Ad26 - в качестве "буст"-вакцины, вводимой через 28 дней (Группа 2, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 6987), по сравнению с обратным порядком иммунизации (Группа 4, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 2976).

Сила гуморального иммунного ответа коррелировала с интервалом между "прайм"- и "буст"-введениями, при этом более высокие концентрации антител наблюдали при 56-дневном интервале между "прайм"-введением MVA и "буст"-введением Ad26 (Группа 3, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 14048), по сравнению с более короткий графиком (Группа 1, 14-дневный интервал, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 4418; и Группа 2, 28-дневный интервал, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 6987).

Неожиданно было обнаружено, что сильный гуморальный иммунный ответ, оцениваемый с помощью ELISA, наблюдали в случае введения MVA-BN-Filo в качестве "прайм"-вакцины с последующей "буст"-иммунизацией вакциной Ad26.ZEBOV через 14 дней. У всех субъектов отмечали сероконверсию на День 21 после "буст"-иммунизации, а концентрация антител в этот момент времени достигала аналогичных или более высоких уровней, по сравнению с введением комбинации "Ad26 в качестве "прайм"-вакцины с MVA в качестве "буст"-вакцины" с 28-дневными интервалами (среднее геометрическое значение титра ФЕ/мл составляло 4418 и 2976, соответственно). Неожиданно было обнаружено, что концентрации антител, индуцированные этой комбинацией "прайм-буст" MVA/Ad26 с 14-дневным интервалом, были существенно выше, чем при иммунном ответе, индуцированном обратной схемой вакцинации с тем же "прайм-буст" временным интервалом (см. пример 2, фиг. 16А, геометрическая средняя концентрация ФЕ/мл составляла 915). Это подтверждает индуцирование сильного иммунного ответа с помощью комбинации MVA в качестве "прайм"-вакцины и Ad26 в качестве "буст"-вакцины" и преимущество такой комбинации при соблюдении короткого интервала "прайм-буст"(14 дней).

Оценка клеточного иммунного ответа

EBOV ГП-специфический клеточный ответ определяли с помощью анализа ELISpot с интерфероном-гамма (ИФН-γ) и анализа ICS. Для оценки клеточного иммунного ответа сохраненные МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) оттаивали и стимулировали пептидами, организованными в 2 пула (Пулы 1 и 2). Сумма Т-клеточных ответов, стимулированных в пуле, приведена на фиг. 18-19.

С помощью анализа ELISpot (фиг. 18) подтверждали индуцирование ИФН-γ ответа с использованием как Ad26.ZEBOV в качестве "прайм"-вакцины с последующим "буст"-введением MVA-BN-Filo, так и при применении обратной схемы вакцинации. В исследованиях со всеми интервалами "прайм-буст" клеточный ответ усиливался после "буст"-иммунизации. ИФН-γ ответ был самым высоким при использовании Ad26 в качестве "прайм"-вакцины с последующим "буст"-введением MVA через 28 дней (87% "ответчиков", средний ИФН-γ ответ 687 и 600 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 4 на День 7 и День 21 после "буст"-введения, соответственно). Неожиданно было обнаружено, что при использовании MVA-BN-Filo в качестве "прайм"-вакцины с последующим "буст"-введением Ad26.ZEBOV, более сильный ИФН-γ ответ наблюдался при соблюдении более короткого 14-дневного интервала между "прайм"-и "буст"-введением (87 и 93% "ответчиков", 395 и 577 ПОЕ/10⁶ МКПК в Группе 1 на День 7 и День 21 после "буст"-введения,

соответственно) по сравнению с ответом, индуцированным за 28 дней (Группа 2, 73 и 67% "ответчиков", средний ИФН-γ ответ 427 и 375 ПОЕ/10⁶ МКПК на День 7 и День 21 после "буст"-введения) или в течение 56-дневного интервала (Группа 3, 47% "ответчиков", средний ИФН-γ ответ 118 и 153 ПОЕ/10⁶ МКПК на День 7 и День 21 после "буст"-введения).

Примечательно, что клеточный иммунный ответ, индуцированный "прайм"-введением MVA-BN-Filo и "буст"-введением Ad26.ZEBOV с интервалом в 14 дней, был пропорциональный как с EBOV ГП-специфическим CD8+ Т-клеточным, так CD4+ Т-клеточным ответом (73% "ответчиков" как для CD4+, так и CD8+ Т-клеток, CD4+ средний общий цитокиновый ответ 0,15 и 0,19% на День 7 и День 21 после "буст"-введения, соответственно; CD8+ средний общий цитокиновый ответ 0,19 и 0,34% на День 7 и День 21 после "буст"-введения, соответственно; фиг. 19 А и В). Как CD8 + , так и CD4 + Т-клетки, индуцируемые этими вакцинными комбинациями, были преимущественно полифункциональными (фиг. 19 С и D).

В приведенных ниже табл. 9-12 представлены обобщенные результаты клинических исследований, представленных в данном документе. Исследования, представленные в примерах 3 и 4, пронумерованы как исследования 1001 и 1002, соответственно.

Табл. 9 представляет собой обобщенные результаты гуморальных иммунных ответов, полученные с помощью анализов ELISA в ходе исследования и описанные в примерах 3 и 4.

Таблица 9. Обзор титров ELISA в клинических исследованиях

День исследования	Ad26/ MVA 0, 14	Ad26/ MVA 0, 28	Ad26/ MVA 0, 28	Ad26/ MVA 0, 56	MVA/ Ad26 0, 14	MVA/ Ad26 0, 28	MVA/ Ad26 0, 28	MVA/ Ad26 0, 56
Исследование	1001	1001	1002	1001	1002	1001	1002	1001
д8	22 (13)	18 (0)	20 (7)	22 (0)	19 (7)	18 (0)	22 (0)	21 (0)
д15	164 (79)*	-	-	-	22 (13)*	-	-	-
д22	298 (83)	-	-	-	293 (87)	-	-	-
д29	-	533 (93)*	477 (100)*	582 (100)	-	36 (40)*	55 (47)*	22 (7)
д36	<u>915</u> <u>(100)</u>	946 (100)	965 (100)	-	<u>4418</u> <u>(100)</u>	269 (80)	1025 (93)	-
д50	-	<u>4274</u> <u>(100)</u>	<u>2976</u> <u>(100)</u>	-	-	<u>10573</u> <u>(100)</u>	<u>6987</u> <u>(100)</u>	-
д57	-	-	-	854 (100)*	-	-	-	21 (7)*
д64	-	-	-	1554 (100)	-	-	-	568 (100)
д78	-	-	-	<u>7553</u> <u>(100)</u>	-	-	-	<u>18729</u> <u>(100)</u>

Данные представлены в виде средней геометрической концентрации (СГК) в ELISA на мл. Процент "ответчиков" в каждый момент времени указан в скобках;. Ad26: иммунизация вакциной Ad26.ZEBOV; MVA: иммунизация вакциной MVA-BN-Filo; схема "прайм-буст" указана в заголовках. 0, 14: 14-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 28: 28-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 56: 56-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; *: день "буст"-иммунизации; СГК: Средняя геометрическая концентрация Исследование 1001 описано в примере 3, а исследование 1002 описано в примере 4.

Табл. 10 представляет собой обобщенные результаты клеточных иммунных ответов, полученные с помощью анализов ELISpot в ходе исследования и описанные в примерах 3 и 4.

Таблица 10. Обзор клеточных иммунных ответов в клинических исследованиях, оцененных с помощью ELISpot

День исследования	Ad26/ MVA 0, 14	Ad26/ MVA 0, 28	Ad26/ MVA 0, 56	MVA/ Ad26 0, 14	MVA/ Ad26 0, 28	MVA/ Ad26 0, 56
Исследование	1001	1001	1001	1002	1001	1001
д8	25 (13)	25 (7)	25 (7)	25 (13)	25 (0)	25 (0)
д15	113 (79)*	-	-	52 (20)*	-	-
д22	354 (75)	-	-	<u>293 (87)</u>	-	-
д29	-	103 (60)*	58 (50)	-	25 (7)*	25 (0)
д36	203 (92)	<u>463 (87)</u>	-	<u>552 (100)</u>	<u>882 (93)</u>	-
д50	-	<u>390 (79)</u>	-	-	<u>455 (73)</u>	-
д57	-	-	243 (86)*	-	-	25 (0)*
д64	-	-	<u>648 (86)</u>	-	-	<u>440 (100)</u>
д78	-	-	<u>464 (100)</u>	-	-	<u>238 (87)</u>

Данные представлены в виде средних значений ПОЕ/10⁶ МКПК. Процент "ответчиков" в каждый момент времени указан в скобках; Ad26: Иммунизация вакциной Ad26.ZEBOV; MVA: иммунизация вакциной MVA-BN-Filo; схема "прайм-буст" указана в заголовках. 0, 14: 14-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 28: 28-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 56: 56-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; *: день "буст"-иммунизации; ПОЕ: пятнообразующие единицы; МКПК: моноклеарные клетки периферической крови. Исследование 1001 описано в примере 3, а исследование 1002 описано в примере 4. Исследование 1001 описано в примере 3, а исследование 1002 описано в примере 4.

Табл. 11 представляет собой обобщенные результаты CD4+ Т-клеточных ответов, полученные с помощью анализов внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) в ходе исследования и описанные в примерах 3 и 4.

Таблица 11. Обзор CD4+ Т-клеточного иммунного ответа в клинических исследованиях, оцененного с помощью анализа ICS

День исследования	Ad26/ MVA 0, 14	Ad26/ MVA 0, 28	Ad26/ MVA 0, 56	MVA/ Ad26 0, 14	MVA/ Ad26 0, 28	MVA/ Ad26 0, 56
Исследование	1001	1001	1001	1002	1001	1001
д8	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)
д15	0,06 (36)*	-	-	0,02 (7)*	-	-
д22	0,06 (45)	-	-	<u>0,15 (73)</u>	-	-
д29	-	0,07 (43)*	0,06 (31)	-	0,02 (13)*	0,02 (7)
д36	0,08 (67)	<u>0,11 (64)</u>	-	<u>0,19 (73)</u>	<u>0,37 (93)</u>	-
д50	-	<u>0,15 (60)</u>	-	-	<u>0,16 (67)</u>	-
д57	-	-	0,05 (36)*	-	-	0,02 (0)*
д64	-	-	<u>0,16 (71)</u>	-	-	<u>0,17 (67)</u>
д78	-	-	<u>0,12 (57)</u>	-	-	<u>0,08 (53)</u>

Данные представлены в виде среднего общего CD4+цитокинового ответа в %. Процент "ответчиков" в каждый момент времени указан в скобках; Ad26: Иммунизация вакциной Ad26. ZEBOV; MVA: иммунизация вакциной MVA-BN-Filo; схема "прайм-буст" указана в заголовках. 0, 14: 14-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 28: 28-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 56: 56-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; *: день "буст"-иммунизации. Исследование 1001 описано в примере 3, а исследование 1002 описано в примере 4.

Табл. 12 представляет собой обобщенные результаты CD8+ Т-клеточных ответов, полученные с помощью анализов внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) в ходе исследования и описанные в примерах 3 и 4.

Таблица 12. Обзор CD8+ Т-клеточного иммунного ответов клинических исследований, оцененного с помощью анализа ICS

День исследования	Ad26/ MVA 0, 14	Ad26/ MVA 0, 28	Ad26/ MVA 0, 56	MVA/ Ad26 0, 14	MVA/ Ad26 0, 28	MVA/ Ad26 0, 56
Исследование	1001	1001	1001	1002	1001	1001
д8	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)
д15	0,02 (29)*	-	-	0,02 (0)*	-	-
д22	0,15 (64)	-	-	0,19 (73)	-	-
д29	-	0,12 (57)*	0,05 (57)	-	0,02 (0)*	0,02 (0)
д36	0,07 (50)	0,27 (67)	-	0,34 (73)	0,08 (53)	-
д50	-	0,27 (73)	-	-	0,1 (53)	-
д57	-	-	0,19 (86)*	-	-	0,02 (0)*
д64	-	-	0,24 (86)	-	-	0,07 (53)
д78	-	-	0,24 (79)	-	-	0,06 (47)

Данные представлены в виде среднего общего CD8+цитокинового ответа в %. Процент "ответчиков" в каждый момент времени указан в скобках; Ad26: Иммунизация вакциной Ad26.ZEBOV; MVA: иммунизация вакциной MVA-BN-Filo; схема "прайм-буст" указана в заголовках. 0, 14: 14-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 28: 28-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; 0, 56: 56-дневный интервал между "прайм"- и "буст"-иммунизацией; *: день "буст"-иммунизации. Исследование 1001 описано в примере 3, а исследование 1002 описано в примере 4.

Подразумевается, что примеры и варианты реализации, описанные в данном документе, приведены только с иллюстративными целями и, что различные модификации или изменения в соответствующем свете будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в пределах сути и области применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1

Гликопротеин вируса Эбола Заир, штамм Mayinga (аминокислотная последовательность):

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLR
SVGLNLENGVATDVPSATKRWGFRSGVPPKVNNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDG
IRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKD
FFSSHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEDNLTYYVQLESRTFPQFLQL
NETIYTSGRKSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTTVVSNGAKNISG
QSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGP
DNSTHNTFVYKLDISEATQVEQHRRRTDNDSTASDTPSATTAAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPAT
TTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRTREAIVNAQPKCN
PNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRAT
TELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGD
NDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVALFCICKFVF

SEQ ID NO: 2

Гликопротеин вируса Эбола Судан, штамм Gulu (аминокислотная последовательность):

MGGLSLLQLPRDKFRKSSFFVWVILFQKAFSMP LGVVTNSTLEVTEIDQLVCKDHLASTDQLK
 SVGLNLEGSGVSTDIPSATKRWGFRSGVPPKVVS YEAGewaENCYNLEIKKPDGSECLPPPPDG
 VRGFPRCRYVHKAQGTGPCPGDYAFHKDGAFFLYDRLASTVIYRGVNFAEGVIAFLILAKPKET
 FLQSPPIREAVNYTENTSSYYATSYLEYEIENFGAQHSTTLFKIDNNTFVRLDRPHTPQFLFQL
 NDTIHLHQQLSNTTGRLIWTL DANINADIGEWAFWENKKNLSEQLRGEELSFEALSLNETEDDD
 AASSRITKGRISDRATRKYS DLVPKNSPGMVPLHIPEGETTLPSQNSTEGRRVG VNTQETITET
 AATIIGTNGNHMQISTIGIRPSSSQIPSSSPTTAPS EAQTPTTHTSGPSVMATEEPTTPPGSS
 PGPTTEAPTLTTPENITTAVKTVLPQESTSNGLITSTVTGILGSLGLRKRSRRQTNTKATGKCN
 PNLHYWTAQE QHNAAGIAWIPYFGPGAEGIYTEGLMHNQNALVCGLRQLANETTQALQLFLRAT
 TELRITYTILNRKAIDFLLRRWGGTCRILGPDC CIEPHDWTKNITDKINQI IHDFIDNPLPNQDN
 DDNWWTGWRQWIPAGIGITGIIIAIIALLCVCKLLC

SEQ ID NO: 3

Гликопротеин вируса Марбург Ангола (аминокислотная последовательность):

MKTTCLLISLILIQGVKTLPILEIASNIQPQNVD SVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPL
 EASKRWA FRAGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLD PPTNIRDYPCKCTIHHIQGQ
 NPHAQGIALHLWG AFFLYDRIASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMNLT
 STNKYWTSSNGTQTNDTGCFGLTQEYNSTKNQTCAPSKKPLPLPTAHPEVKLTSTSTDATKLNT
 TDPNSDDEDLTTS GSGSGEQEPYTTSDAATKQGLSSTM PPTPSPQPSTPQQGNNTNHSQGVVT
 EPGKNTNTAQPSMPPHNTTTISTNNTSKHNLSTPSVPIQ NATNYNTQSTAPENEQTSAPSKTTL
 LPTENPTTAKSTNSTKSPTTTVPNTTNKYSTSPSPTPNSTA QHLVYFRKRNI LWREGDMFPFL
 DGLINAPIDFDPVPNTKTI FDESSSSGASAEEDQHASP NISLTLSYFPKNENTAHSGENENDC
 DAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEGLYTAGLIKNQNNLVCRLRLRLANQTAKSLELLLRV
 TTEERTFSLINRH AIDFLLARWGGTCKVLGPDC CIGIEDLSRNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGL
 GGKWWTSDWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRIFTKYIG

SEQ ID NO: 4

Гликопротеин вируса Марбург Musoke (аминокислотная последовательность):

MKTT CFLISLILIQGTKNLPILEIASNNQPQNVD SVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPL
 EASKRWA FRGTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLD PPTNIRDYPCKCTIHHIQGQ
 NPHAQGIALHLWG AFFLYDRIASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMNLT
 STNKYWTSSNGTQTNDTGCFGALQEYNSTKNQTCAPSKIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNT
 TDPSSDDEDLATSGSGSGEREPHTTSDAVTKQGLSSTM PPTPSPQPSTPQQGNNTNHSQDAVT
 ELDKNNTTAQPSMPPHNTTTISTNNTSKHNFSTLSAPLQNTTNDNTQSTITENEQTSAPSITTL
 PPTGNPTTAKSTSSKKG PATTAPNTTNEHFTSPPTPSSTA QHLVYFRKRNI LWREGDMFPFL
 DGLINAPIDFDPVPNTKTI FDESSSSGASAEEDQHASP NISLTLSYFPNINENTAYS GENENDC
 DAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEGLYTAVLIKNQNNLVCRLRLRLANQTAKSLELLLRV
 TTEERTFSLINRH AIDFLLTRWGGTCKVLGPDC CIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGL
 GGKWWTSDWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRIFTKYIG

SEQ ID NO: 5

Нуклеопротеин Эболавируса леса Таи/Берега Слоновой Кости (аминокислотная последовательность):

MESRAHKAWMTHTASGFETDYHKILTAGLSVQQGIVRQRVIQVHQVTNLEEICQLIIQAFEAGV
DFQESADSFLMLCLHAYQG DYKQFLESNAVKYLEGHGFRFEVRKKEGVKRLEELLPAASSGK
SIRRTLAAAMPEEETTEANAGQFLSFASLFLPKLVVGEKACLEKVQRQIQVHSEQGLIQYPTAWQ
SVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMH MVAGHDANDAVIANSVAQARFSGLLIVKTVLDHILQ
KTEHGVRLHPLARTAKVKNEVNSFKAALSSLAQHGEYAPFARLLNL SGVNNLEHGLFPQLSAIA
LGVATANGSTLAGVNVGEQYQQLREAATEAEKQLQKYAESRELDHLGLDDQEKILKDFHQKKN
EISFQQTTAMVTLRKERLAKLTEAITSTSLKTKGQYDDDNDIPFPGPINDNENSEQQDDDDPTD
SQDTTIPDIIIVDPDDGRYNNYGDYPSETANAPEDLVLFDELDGEDDHRPSSSSSENNNKHSLTG
TDSNKTSNWNRNPTNMPKKDSTQNNDNPAQRAQEYARDNIQDTPTPHRALTPISEETGSNGHNE
DDIDSIPPLESDEENNTETTITTTKNTTAPPAPVYRSNSEKEPLPQEKSQKQPNQVSGSENTDN
KPHSEQSVEEMYRHILQTQGFDAI LYYMMTEEP IVFSTSDGKEYVYPDSLEGENPPWLSEKE
ALNEDNRFITMDDQQFYWPFVMNHRNKFMAILQHNK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная комбинация для индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, содержащая:

(i) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

(ii) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух подтипов филовируса, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой "прайм"-композицию, а другая композиция представляет собой "буст"-композицию.

2. Вакцинная комбинация по п.1, отличающаяся тем, что первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса.

3. Вакцинная комбинация по п.2, отличающаяся тем, что первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

4. Вакцинная комбинация по п.1, отличающаяся тем, что аденовирусный вектор в первой композиции (i) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1.

5. Вакцинная комбинация по п.4, отличающаяся тем, что композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 2.

6. Вакцинная комбинация по п.5, отличающаяся тем, что композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 3.

7. Вакцинная комбинация по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере четырех подтипов филовируса.

8. Вакцинная комбинация по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки четырех подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

9. Вакцинная комбинация по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что аденовирусный вектор представляет собой rAd26- или rAd35-вектор.

10. Применение вакцинной комбинации по любому из пп.1-9 в формировании защитного иммунного ответа против по меньшей мере одного подтипа филовируса.

11. Способ индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, при этом указанный способ включает стадии, в которых:

а) вводят субъекту первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса; и

б) вводят субъекту вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество

MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух штаммов филовируса,

причем этапы (a) и (b) осуществляют в любом порядке.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что первая композиция дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что первая композиция дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что аденовирусный вектор в первой композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 1.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что первая композиция дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 2.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок с SEQ ID NO: 3.

17. Способ по любому из пп.11-16, отличающийся тем, что MVA-вектор во второй композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере четырех подтипов филовируса.

18. Способ по любому из пп.11-17, отличающийся тем, что MVA-вектор во второй композиции содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки четырех разных подтипов филовируса, имеющий SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

19. Способ по любому из пп.11-18, отличающийся тем, что аденовирусный вектор представляет собой rAd26- или rAd35-вектор.

20. Способ по любому из пп.11-19, отличающийся тем, что этап (b) проводят через 1-12 недель после этапа (a).

21. Набор для индуцирования иммунного ответа против филовируса у субъекта, содержащий:

(i) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого подтипа филовируса, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

(ii) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество MVA-вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух подтипов филовируса, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом одна из композиций представляет собой "прайм"-композицию, а другая композиция представляет собой "буст"-композицию.

22. Набор по п.21, отличающийся тем, что первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго подтипа филовируса.

23. Набор по п.22, отличающийся тем, что первая композиция (i) дополнительно содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок третьего подтипа филовируса.

24. Набор по п.21, отличающийся тем, что аденовирусный вектор в первой композиции (i) содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

25. Набор по любому из пп.21-24, отличающийся тем, что MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере четырех подтипов филовируса.

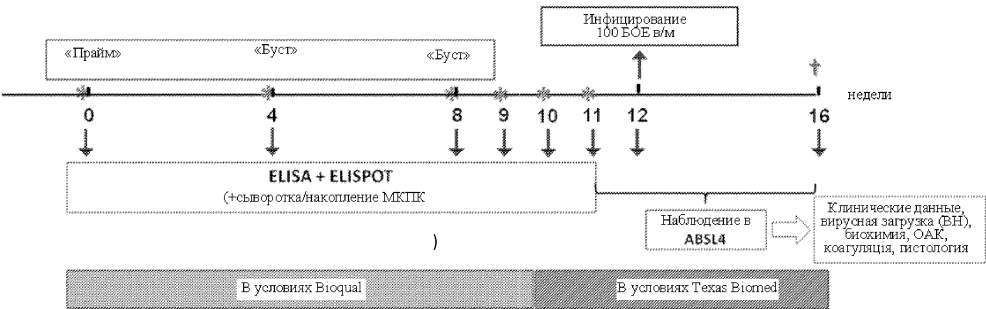
26. Набор по любому из пп.21-25, отличающийся тем, что MVA-вектор в композиции (ii) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки четырех подтипов филовируса, имеющих SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

27. Набор по любому из пп.21-26, отличающийся тем, что аденовирусный вектор представляет собой rAd26- или rAd35-вектор.

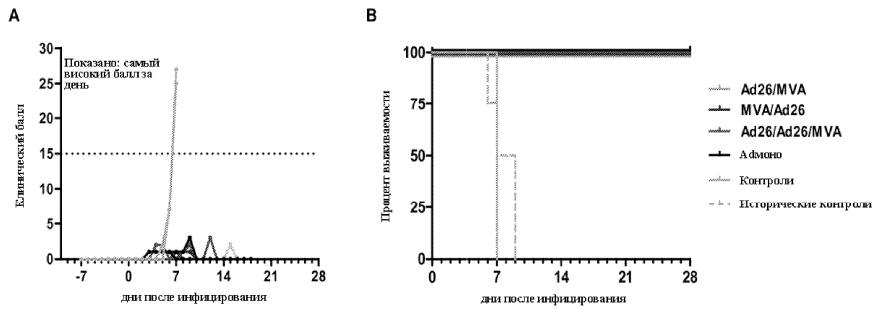
28. Применение вакцинной комбинации по любому из пп.1-9 в приготовлении фармацевтической композиции или лекарственного средства для индуцирования иммунного ответа против филовируса.

Группа	N	Введение исследуемого или контрольного изделия				Инфицирование вирусом Эбола (день)
		«Прайм»	«Буст»	Доза	График (день)	
A	2	Отр. контроль (Ad26 пустой)	Отр. контроль (MVA пустой)	1.2×10^{11} вч/ 5×10^8 TCID50	0, 56	День 84 Вирус Эбола Kikwit в/м 100 ЕОЕ (по истечению около 4 недель после последней иммунизации)
B	2	Ad26.ZEBOV	Ad35.ZEBOV	1.2×10^{11} вч	28, 56	
C	2	Ad26.MARVA Ad26.SEBOV Ad26.ZEBOV	MVA-Мульти	4×10^{10} вч (каждый)/ 5×10^8 TCID50	0, 56	
D	2	MVA-Мульти	Ad26.MARVA Ad26.SEBOV Ad26.ZEBOV	5×10^8 TCID50/ 4×10^{10} вч (каждый)	0, 56	
E	2	Ad26.MARVA Ad26.SEBOV Ad26.ZEBOV	Ad26.MARVA Ad26.SEBOV Ad26.ZEBOV	MVA-Мульти 4×10^{10} вч (каждый)/ 5×10^8 TCID50	0, 28, 56	

Фиг. 1

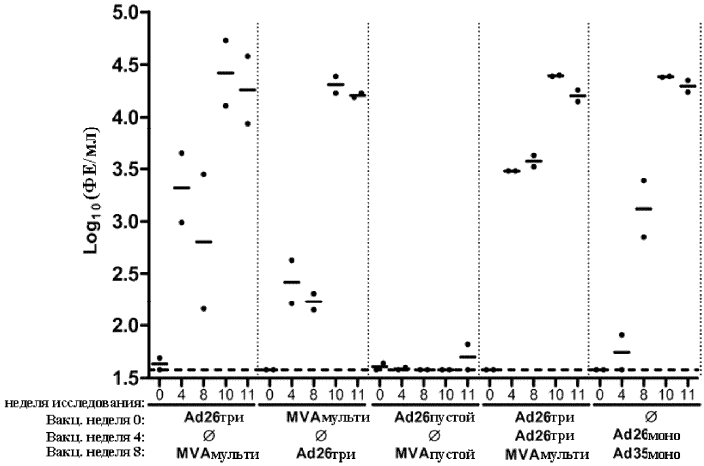


Фиг. 2



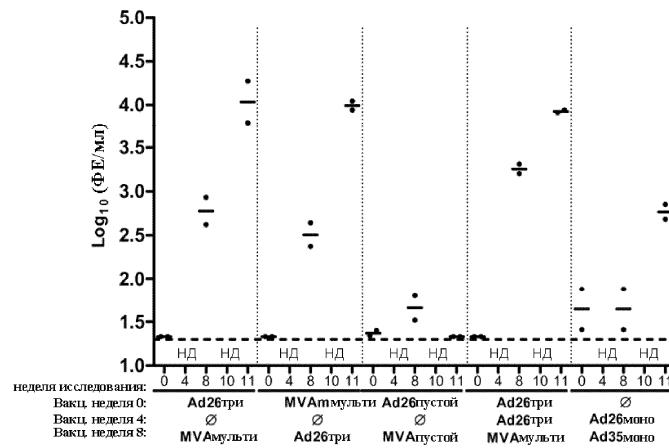
Фиг. 3

ZEBOV ГП ELISA



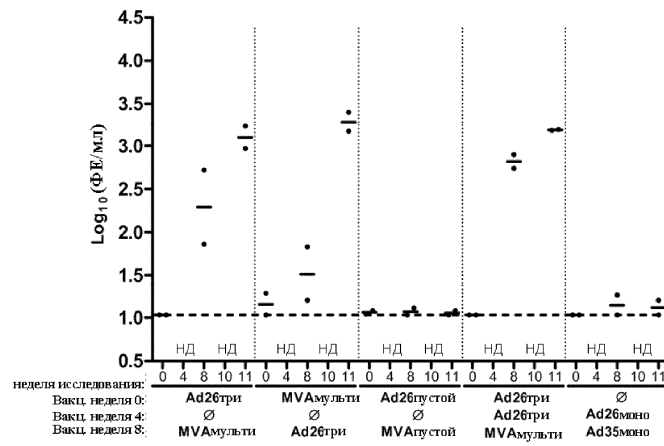
Фиг. 4

SEBOV ГП ELISA

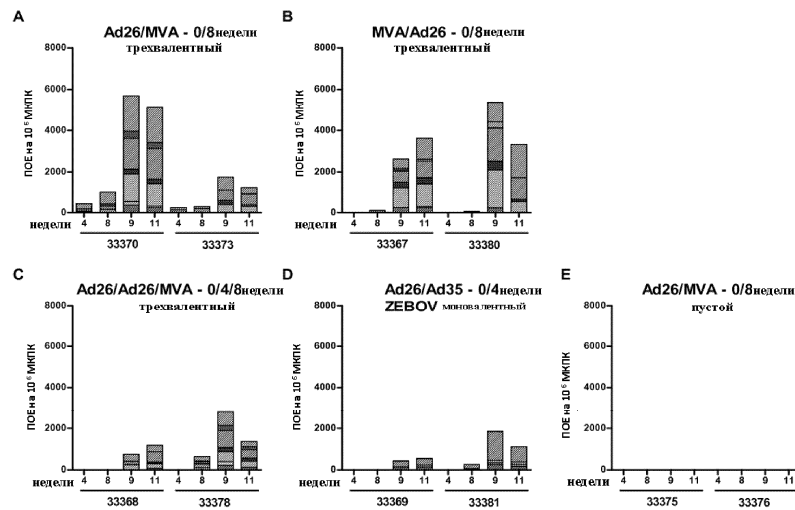


Фиг. 5

MARVA ГП ELISA

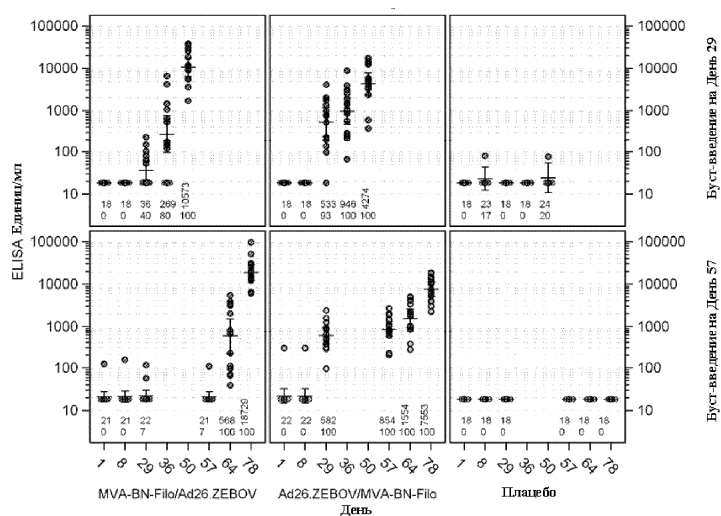


Фиг. 6



Фиг. 7

Антителный ответ (ELISA): Фактические значения в динамике

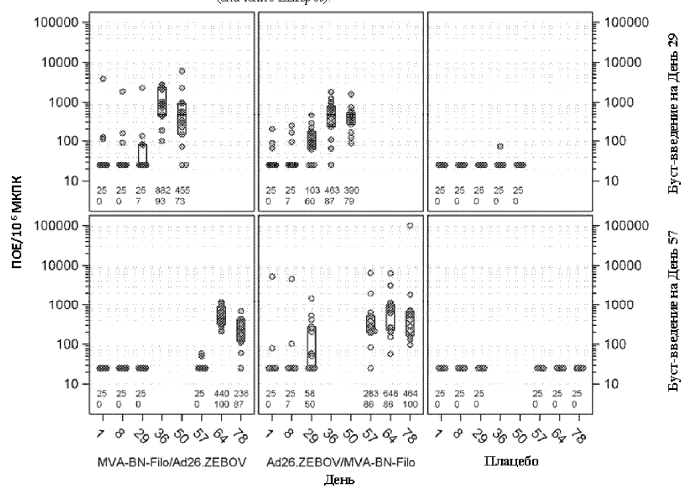


Фиг. 8

Клеточный ответ (ELISpot): Фактические значения в динамике

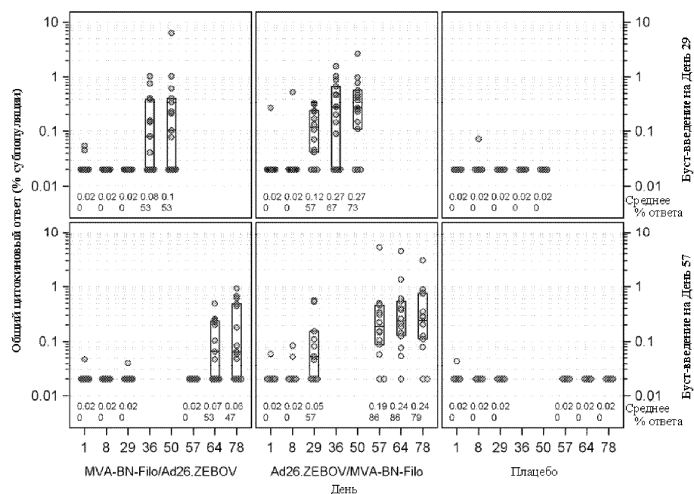
ЕВОВ ГП-специфический Т-клеточный ответ (ИФН- γ) Пул 1+2

(значение ELISpot)



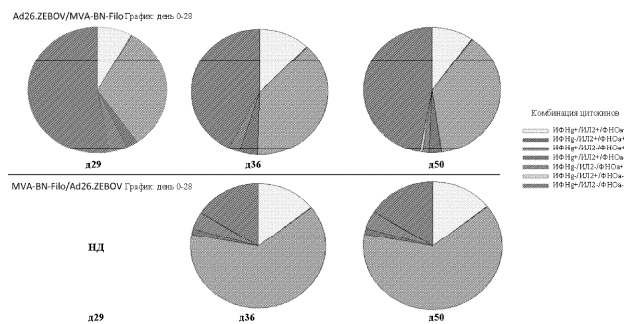
Фиг. 9

Клеточный ответ (ICS): Фактические значения в динамике (CD8)



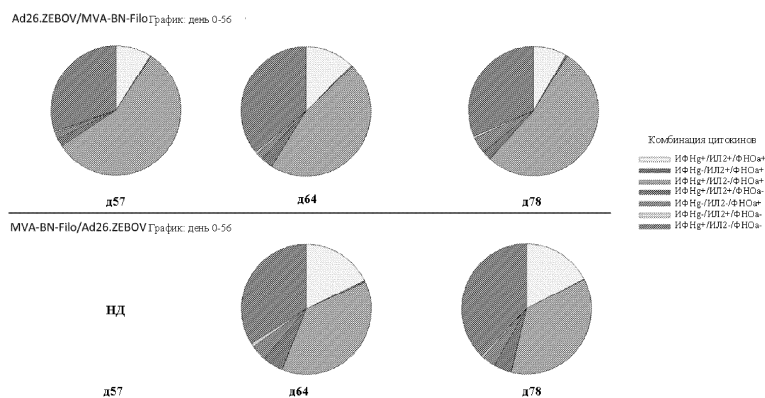
Фиг. 10

Клеточный ответ (ICS): Функциональность CD8-ответов



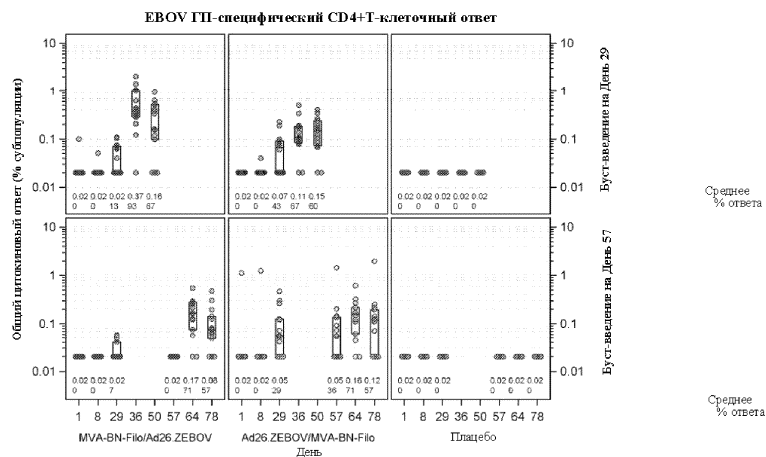
Фиг. 11

Клеточный ответ (ICS): Функциональность CD8-ответов



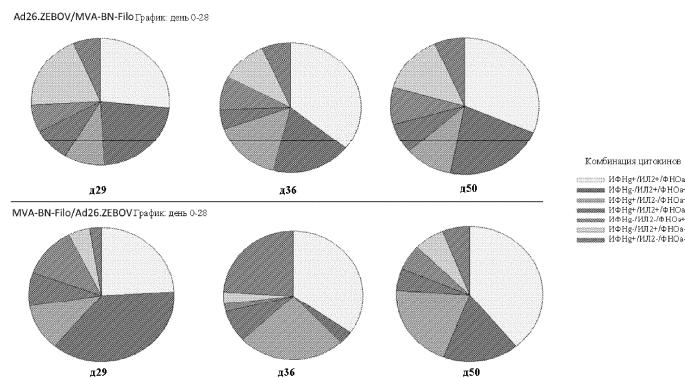
Фиг. 12

Клеточный ответ (ICS): Фактические значения в динамике (CD4)



Фиг. 13

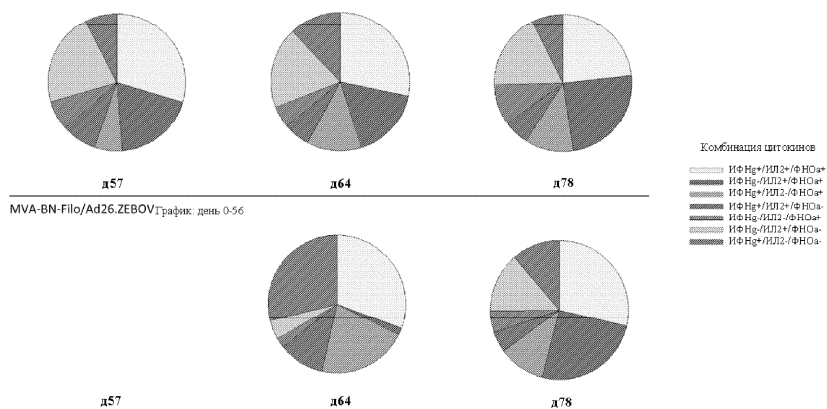
Клеточный ответ (ICS): Функциональность CD4-ответов



Фиг. 14

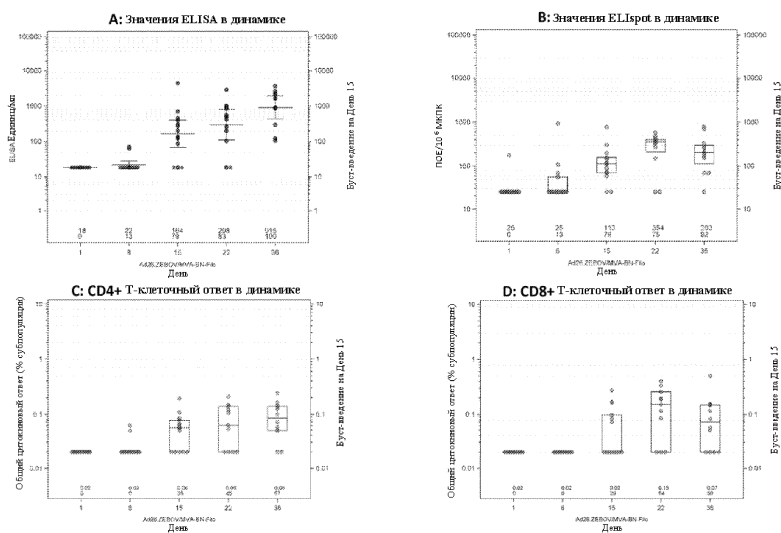
Клеточный ответ (ICS): Функциональность CD4-ответов

Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo График: день 0-56



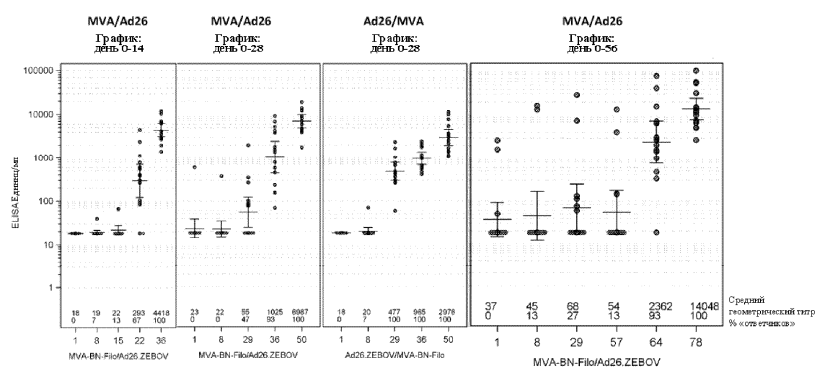
Фиг. 15

Ad26.ZEBOV / MVA-BN-Filo График: день 0, 14 – Обзор иммунного ответа



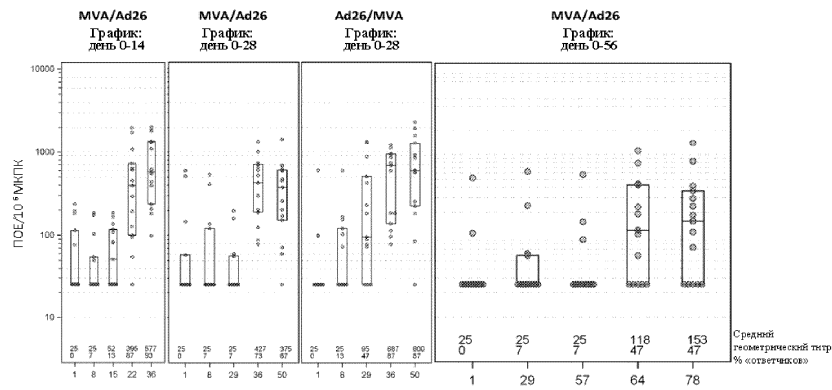
Фиг. 16

Антителный ответ (ELISA): Фактические значения в динамике



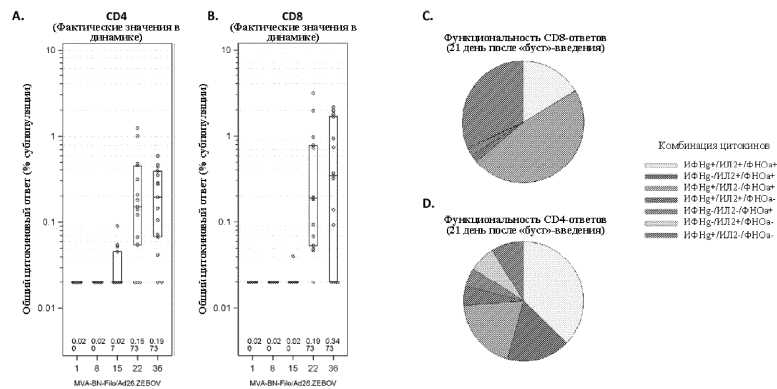
Фиг. 17

Клеточный ответ (ELISpot): Фактические значения в динамике



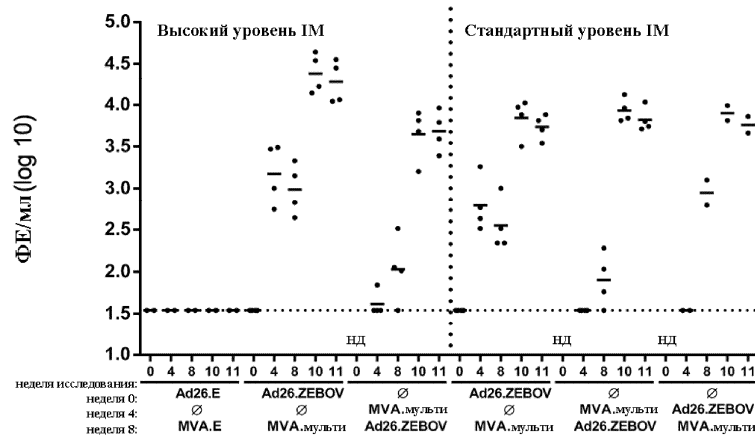
Фиг. 18

Клеточный ответ (ICS): MVA/Ad26 График: день 0-14



Фиг. 19

EBOV Mayinga ГП ELISA



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2