

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039037**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.24

(51) Int. Cl. **C12N 15/86 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201691120

(22) Дата подачи заявки
2014.11.25

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПОКСВИРУС ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПОЗВОНОЧНОГО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **13005541.1**

(32) **2013.11.28**

(33) **EP**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/EP2014/075522**

(87) **WO 2015/078856 2015.06.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАВАРИАН НОРДИК А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Хаусманн Юрген, Вольферштеттер
Михаэль (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-2006073594**

US-A1-2005281782

DMITRIEV I. P. ET AL.: "Immunization with recombinant vaccinia viruses expressing structural and part of the nonstructural region of tick-borne encephalitis virus cDNA protect mice against lethal encephalitis", **JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL**, vol. 44, no. 1, 26 January 1996 (1996-01-26), pages 97-103, XP004036854, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/0168-1656(95)00141-7 the whole document

CHARLIE GARNETT ET AL.: "TRICOM Vector Based Cancer Vaccines", **CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN**, vol. 12, no. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 351-361, XP055110442, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/138161206775201929 the whole document

VIJAYSRI ET AL.: "Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: Intranasal vaccination", **VACCINE, ELSEVIER LTD, GB**, vol. 26, no. 5, 4 December 2007 (2007-12-04), pages 664-676, XP022419778, ISSN: 0264-410X the whole document

GB-A-2027033

WOLFERSTAETTER MICHAEL ET AL.: "Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Generating Excess Early Double-Stranded RNA Transiently Activates Protein Kinase R and Triggers Enhanced Innate Immune Responses", **JOURNAL OF VIROLOGY**, vol. 88, no. 24, December 2014 (2014-12), pages 14396-14411, XP009182480, the whole document

(57) Изобретение относится к рекомбинантному поксвирусу для усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного, содержащему гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие избыток двухцепочечной РНК (дцРНК) на раннем этапе инфекции. Изобретение также относится к иммуногенной фармацевтической композиции, содержащей указанный рекомбинантный поксвирус, а также к способу усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного и к применению указанного рекомбинантного поксвируса для производства фармацевтической композиции для усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного.

B1

039037

039037

B1

Область техники

Изобретение, предложенное в данном документе, относится к рекомбинантным поксвирусам, содержащим гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие комплементарную РНК, образующую двухцепочечную РНК (дцРНК) на раннем этапе инфекции. Ранняя дцРНК также может быть сгенерирована путем транскрибирования обеих нитей нативных генов рекомбинантных поксвирусов. Рекомбинантные поксвирусы, представленные в данном документе, могут дополнительно содержать гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или более костимулирующих молекул, и/или гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более ассоциированных с заболеванием антигенов или опухоль-ассоциированных антигенов. Эти рекомбинантные поксвирусы усиливают врожденную и адаптивную иммунную активацию у субъекта по сравнению с идентичными рекомбинантными поксвирусами с отсутствующими гетерологичными нуклеиновыми кислотами, экспрессирующими раннюю дцРНК. Также в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие любой из рекомбинантных поксвирусов, представленных в данном документе, а также способы и применение таких рекомбинантных поксвирусов.

Уровень техники

Иммунная система распознает различные патогены, включая вирусы, с помощью рецепторов распознавания паттернов (PRR), которые обнаруживают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP). PRR охватывают семейство Толл-подобных рецепторов (TLR), RIG-подобных хеликаз (RLH), NOD-подобных рецепторов (NLR) и других до настоящего времени менее четко определенных PRR (Iwasaki (2012), *Annu. Rev. Microbiol.* 66:177-196; Desmet & Ishii (2012), *Nat. Rev. Immunol.* 12:479-491; Melchjorsen (2013), *Viruses.* 5:470-527). Активация PRR приводит к активации различных иммунных клеток, включая дендритные клетки (DC), и возможной индукции врожденных и адаптивных иммунных ответов. Активация PRR также приводит к индукции противовирусного состояния в неиммунных клетках посредством индукции и действия интерферонов типа I (ИФН), которые содержат ИФН-альфа (ИФН- α) и ИФН-бета (ИФН- β), а также индукции и действию других цитокинов и хемокинов, которые предупреждают еще неинфицированные клетки хозяина и координируют иммунный ответ. ИФН типа I регулирует многие аспекты иммунного ответа, в том числе врожденные механизмы устойчивости к патогенам, а также выработку антител и активацию Т-клеток, например, вызывая повышение экспрессии ГКГС класса I и II, кросс-презентацию и активацию DC (Iwasaki & Medzhitov (2010), *Science* 327:291-295; Desmet & Ishii (2012), *Nat. Rev. Immunol.* 12:479-491).

Важный для организма способ обнаружения присутствия вирусов представляет собой узнавание вирусной РНК или ДНК с помощью как нормальных, так и иммунных клеток. TLR3, TLR7/8, TLR9 и TLR13 были идентифицированы как рецепторы для двухцепочечной РНК (дцРНК), одноцепочечной РНК (оцРНК), ДНК, и рибосомальной РНК (рРНК) соответственно. Вирусы с двухцепочечной ДНК (дцДНК), подобной геному герпесвирусов, аденовирусы и поксвирусы, узнавались с помощью TLR9-зависимого и TLR9-независимого пути (Hochrein et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101:11416-11421; Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* 118:1776-1784). Предыдущая работа показала, что поксвирусы эффективно ингибируют как TLR9-зависимый, так и TLR9-независимые пути узнавания дцДНК.

Обнаружение ДНК поксвируса иммунными клетками через TLR9 приводит к продукции интерферонов типа I (например, ИФН- α/β) и интерферонов типа III (например, ИФН- λ), а также других цитокинов и хемокинов (Lauterbach et al. (2010), *J. Exp. Med.* 207:2703-2717; Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* 118:1776-1784). Плазмцитоподобные DC (pDC) селективно компетентны для продуцирования больших количеств ИФН-I и ИФН-III в ответ на TLR7/8- или TLR9-зависимую стимуляцию. В pDC, TLR9-зависимая стимуляция приводит к продукции ИФН-I и ИФН-III. Как ДНК, так и другие вирусные нуклеиновые кислоты узнаются в цитоплазме инфицированных клеток, тем самым подавая этим клеткам сигнал к продуцированию ИФН-I и ИФН-III, среди других цитокинов. TLR9-независимые пути узнавания поксвируса в основном используются различными подмножествами обычных дендритных клеток (cDC) (Hochrein & O'Keefe (2008), *Handbook Exp Pharmacol* 183:153-179).

Другой важной отличительной чертой вирусной инфекции является дцРНК, которая является сгенерированной при инфицировании клеток не только РНК-вирусами, но также поксвирусами, которые имеют дцДНК геном. ДцРНК в поксвирусной инфекции генерируется перекрытием транскрипции генов, расположенных на верхней и нижней нити генома дцДНК. В частности, прекращение транскрипции промежуточных и поздних генов не жестко регламентированное событие, приводящее к вирусной мРНК с длинными 3' нетранслируемыми участками (3' НТО) гетерогенной длины (Cooper, Wittek, and Moss (1981), *J. Virol.* 39:733-745; Xiang et al. (1998), *J. Virol.* 72:7012-7023). Когда такие транскрипты происходят от двух соседних генов в противоположной ориентации (например, которые транскрибируются в направлении друг к другу), транскрипция вызывает перекрытие комплементарных фрагментов секвенирования мРНК, которые формируют дцРНК посредством гибридизации друг с другом или с ранними транскриптами (Boone, Paug, and Moss (1979), *J. Virol.* 30:365-374). Генерация вирусных дцРНК является в значительной степени ограниченной поздней фазой цикла репликации поксвируса (Colby & Duesberg (1969), *Nature* 222:940-944; Duesberg & Colby (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 64:396-403; Moss (2007),

5:2905-2945). Ранее сообщалось, что дцРНК вирусных транскриптов может быть найдена в начале инфекции (Boone, Parr, and Moss (1979), *J Virol.* 30:365-374; Lynch et al. (2009), *Virology* 391:177-186; Willis et al. (2009), *Virology* 394:73-81; Willis, Langland, and Shisler (2011), *J. Biol. Chem.* 286:7765-7778). Однако похоже, что существует селективное давление, которое предотвращает генерацию достаточного количества ранней дцРНК для запуска клеточной системы распознавания, например, путем обеспечения эффективного прекращения транскрипции смежных ранних генов транскрибированных в противоположном направлении (Smith, Symons, and Alcamí (1998), *Seminars in Virology* 8:409-418). Поксвирус развил специфический сигнал ранней терминации с последовательностью ТТТТТНТ на кодирующей цепи, который останавливает раннюю транскрипцию от 20 до 50 нуклеотидов вниз по этой последовательности (Yuen & Moss (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:6417-6421). Ранние гены, транскрибированные по направлению друг к другу, обычно содержат множественные сигналы терминации, указывающие, что жесткий контроль ранней быстрой терминации транскрипции таких генов позволяет избежать продукции комплементарных РНК в начале инфекции, что по-видимому, важно для приспособленности вируса.

Клетки-хозяева и организмы создали различные рецепторы распознавания для дцРНК для выявления вирусной инфекции. В то время как TLR3 в основном экспрессируется в иммунных клетках и может воспринимать внеклеточные дцРНК, большинство других рецепторов дцРНК, таких как RIG-I, MDA-5, DDX1/DDX21/DHX36, протеинкиназа R (PKR), и 2'-5'-олигоаденилатсинтетаза (2'-5'-OAS), экспрессируются повсеместно в органах и типах клеток-хозяев и локализованы в цитоплазме клетки. По отношению к индукции ИФН типа I, RIG-I и MDA-5 считается, что представляют наиболее важные цитозольные рецепторы дцРНК для выявления вирусной инфекции (Melchjorsen (2013), *Viruses*. 5:470-527). Другой важный рецептор дцРНК, дцРНК-активированная протеинкиназа R (PKR), считается, что осуществляет свою противовирусную роль, главным образом, с помощью фосфорилирования фактора элонгации трансляции eIF2 α , что приводит к остановке клеточного и вирусного транслирования, тем самым ограничивая репликацию вируса. (García et al. (2006), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:1032-1060; Williams (1999), *Oncogene* 18:6112-6120). Существует также доказательство, что у PKR есть роль в индукции ИФН типа I. (Barry et al. (2009), *J. Gen. Virol.* 90:1382-1391; Gilfooy & Mason (2007), *J Virol.* 81: 11148-11158).

Для ингибирования противовирусного эффекта, вызванного дцРНК, поксвирус выделяет по меньшей мере два белка, E3 и K3, для ингибирования важного рецептора дцРНК PKR. Оба вирусных белка подробно изучались. Среди них, E3 является центральным. E3 связывает и изолирует дцРНК и ингибирует активацию PKR. Мутанты вируса осповакцины (VACV), лишенные E3L гена (VACV- Δ E3L), имеют ограниченный круг хозяев и индуцируют апоптоз во многих типах клеток (Hornemann et al. (2003), *J. Virol.* 77:8394-8407; Kibler et al. (1997), *J Virol.* 71:1992-2003), предполагая, что PKR-опосредованный апоптоз является основным результатом активации PKR в VACV-инфицированных клетках. Однако, также сообщается о высокой чувствительности VACV- Δ E3L к воздействию ИФН-I (Beattie, Paoletti, and Tartaglia (1995), *Virology* 210:254-263) и повышенной индукции ИФН- α/β в пре-апоптотических клетках, инфицированных E3-удаленным VACV мутантом (Hornemann et al. (2003), *J. Virol.* 77:8394-8407). Здесь мы опишем способ для индукции активации PKR в клетках, инфицированных модифицированным вирусом осповакцины Анкара (MVA) и хориоаллантоисным вирусом осповакцины Анкара (CVA) без индукции обнаруживаемый гибели клеток или апоптоза, но влекущих за собой высвобождение большого количества ИФН- α/β и других хемокинов и цитокинов. Это было достигнуто путем экспрессии дцРНК в начале инфекции до начала репликации ДНК. Стабильная экспрессия дцРНК была достигнута путем транскрипции двух комплементарных мРНК из двух независимых вставок рекомбинантного гена. В случае с CVA, индукция ИФН типа I привела к почти непатогенной инфекции у мышей, и этот результат зависел от наличия функциональной системы ИФН типа I.

MVA была разработана с помощью >570 пассажей полностью репликационно-компетентного штамма вакцины оспы хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA) (Meisinger-Henschel et al. (2007), *J. Gen. Virol.* 88:3249-3259) на фибробластах куриного эмбриона. Было показано, что репликационно-компетентный CVA плохо индуцирует ИФН-I, тогда как репликационно-рестриктированный MVA довольно эффективно индуцирует ИФН-I (Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* 118:1776-1784). CVA ингибирование ИФН-I продукции было опосредовано частично с помощью ИФН-I-связывающего белка поксвируса (ИФН-IR), кодируемого геном B19R. Белок B19 связывается с ИФН- α и таким образом ингибирует его биологическую активность. Кроме того, связывание B19 с интерферонами типа I также предотвращает обнаружение ИФН- α/β с помощью методов анализа на основе антител, указывая, что белок B19 также связывается с человеческим ИФН- β . В отличие от человеческой системы, B19 не связывает ИФН- β мыши. Гомологи ИФН-I-связанного белка поксвируса кодирующиеся B19R ORF присутствуют в ряде видов поксвируса, предполагая, что этот механизм для ингибирования активности ИФН-I сохраняется в поксвирусах в целом. См., например, фиг. 17.

Связывающая B19 активность ИФН типа I является не единственным механизмом ингибирования, используемым поксвирусами для подавления эффекторных функций ИФН-I или индукции. Поксвирусы кодируют ряд факторов, разрушающих систему интерферона типа I его хозяев. Интерфероны имеют важнейшее значение в противовирусной защите потому, что они индуцируют антивирусное состояние в

ИФН рецептор-продуцирующих клетках и регулируют врожденный и адаптивный иммунный ответ хозяина. Среди известных поксвирусных факторов, противодействующих системе интерферона, имеются секретлируемые рецептор-подобные белки В19 и В8, которые связывают и нейтрализуют интерфероны типа I и типа II, соответственно. Другие поксвирусные белки, такие как VACV E3, K7, С6, N1, С7, K1, K3 и Н1, ингибируют индукцию интерферона типа I или блокируют сигнальные и эффекторные пути интерферона. Тот факт, что поксвирусы кодируют такое множество белков, чтобы противодействовать системе интерферона подчеркивает важность этой системы врожденной иммунной защиты для контроля и возможного очищения от поксвирусов инфицированным организмом-хозяином. Помимо системы интерферона, ортопоксвирусы кодируют другие иммунитет-модулирующие белки, препятствуя индукции или функционированию цитокинов, таких как IL-1 β , IL-18, и хемокинов, включая VACV B16R, WR013, C2 3L/vCCI. Эти цитокины также играют важную роль в ограничении распространения патогена и защиты хозяина от тяжелого патоген-индуцированного повреждения. Поксвирусные белки, разрушающие пути распознавания паттерна, являются универсально эффективными в предотвращении индукции ИФН, а также других цитокинов и хемокинов.

Соответственно, основная цель настоящего изобретения повышение распознавания поксвирусов клеточными рецепторами дцРНК, а также повышение врожденной иммунной активации, индуцированной MVA. Описанные в данном документе рекомбинантные поксвирусы спроецированы для продуцирования дцРНК в начале инфекции с помощью вставки двух частично идентичных ДНК в два отдельных участка в геноме. Эти ДНК функционально связаны с устойчивыми ранними промоторами, ориентированными таким образом, что одна ДНК создает "смысловой" транскрипт, и другая продуцирует дополнительный "антисмысловой" транскрипт. Два частично или полностью комплементарных транскрипта затем ренатурируют для продуцирования дцРНК. Эффективная индукция ИФН- β , важный маркер врожденной иммунной активации, была отмечена с ранними дцРНК в широком диапазоне размеров, с уменьшением эффективности если комплементарные транскрипты были сокращены до 50 п.о.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному поксвирусу, содержащему гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие избыток двухцепочечной РНК (дцРНК) на раннем этапе инфекции. В одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу усиления врожденной иммунной активации, включающему введение рекомбинантного поксвируса позвоночному субъекту, отличающемуся тем, что указанное введение усиливает продукцию интерферонов типа I (ИФН тип I), цитокинов и хемокинов у субъекта.

В другом варианте осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус транскрибирует смысловую и антисмысловую РНК из обеих нитей нативной последовательности поксвируса предпочтительно раннего гена, более предпочтительно немедленно-раннего гена.

В следующем варианте осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус транскрибирует гетерологичную нуклеиновую кислоту как смысловую и антисмысловую РНК из обеих нитей гетерологичной последовательности.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу аттенуирования стандартных репликационно-компетентных штаммов вируса осповакцины и других видов полученных от *Chordorovirginae* поксвирусов позвоночных с помощью экспрессии избытка ранней дцРНК.

В различных вариантах осуществления изобретения поксвирус дополнительно содержит гетерологичные последовательности, кодирующие одну или более костимулирующих молекул.

В различных вариантах осуществления изобретения поксвирус дополнительно содержит гетерологичные последовательности, кодирующие один или более бактериальный, вирусный, грибковый, паразитарный или опухолевый антигены.

В различных вариантах осуществления изобретения поксвирус представляет собой ортопоксвирус, парапоксвирус, ятапоксвирус, авипоксвирус, лепорипоксвирус, вирус оспы свиней, вирус оспы овец, вирус оспы оленей или вирус контагиозного моллюска. Ортопоксвирус может быть выбран из группы, включающей вирус осповакцины, вирус коровьей оспы и вирус оспы обезьян. Вирус осповакцины может быть модифицирован вирусом осповакцины Анкара (MVA), например, модифицирован вирусом осповакцины Ankara Bavarian Nordic (MVA-BN).

В различных вариантах осуществления изобретения гетерологичные или эндогенные нуклеиновые кислоты, генерирующие дцРНК, содержат последовательности, кодирующие частично или полностью комплементарные транскрипты РНК, отличающиеся тем, что комплементарные части транскриптов РНК ренатурируют после транскрипции, формируя дцРНК.

В различных вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие полностью или частично комплементарные транскрипты РНК, идентичны в комплементарном участке или имеют сходство более чем 99%, более чем 95%, более чем 90%, более чем 80% или более чем 70% в комплементарном участке.

Дополнительные цели и преимущества настоящего изобретения будут изложены частично в описании, которое следует ниже, и частично будут очевидны из описания, или могут быть изучены посред-

вом осуществления на практике данного изобретения. Цели и преимущества настоящего изобретения будут реализованы и достигнуты с помощью элементов и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения.

Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают настоящего изобретения, как заявлено.

Прилагаемые чертежи, которые включены в описание и составляют часть данного описания, иллюстрируют один (несколько) вариант(ов) осуществления изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует схематическое изображение CVA мутантов, перепроизводящих раннюю дцРНК, и соответствующих мутантов контроля. Боксы представляют CVA ORF в геномном участке между ORF B14R и B20R и не нарисованы в масштабе. Бокс, представляющий версию CVA B15 ORF, показан черным цветом, в то время как версия MVA B15R обозначена ромбовидной текстурой. Заштрихованный бокс представляет B19R ORF. Все остальные ORF показаны в виде серых боксов. Бактериальные маркеры отбора (neo^r и zeo^r), заменяющие CVA ORF в различных мутантах с делецией, показаны как маленькие боксы с указанием конкретного маркера.

Фиг. 2 демонстрирует вирулентность CVA-дцнео-ΔB15 и связанных CVA мутантов у BALB/c мышей. Группы из трех-пяти самок BALB/c мышей 6-8 недельного возраста были инфицированы интраназально 50 мл инокулянта, содержащего 5×10^7 (А, В правая вставка) или 10^7 TCID₅₀ (В левая вставка, С) очищенного исходного раствора указанных мутантов CVA. А) и В) демонстрируют результаты независимых экспериментов, использующих различные наборы CVA мутантов. Животные проверялись ежедневно и взвешивались в указанные дни. Данные массы тела выражали в процентах от средней массы +/- СКО от соответствующей группы, от исходной средней массы в день 0. Крестики указывают число погибших животных в соответствующие дни. С) Легкие 6-8 недельных самок BALB/c мышей, зараженных интраназально 10^7 TCID₅₀ очищенного исходного раствора указанных вирусов, были восстановлены на шестой день после заражения. Легкие были гомогенизированы, и был определен вирусный титр с помощью стандартного анализа TCID₅₀ с использованием CV-1 клеток. Указаны средние значения общих вирусных титров в легких двух независимых экспериментов из общего числа 8 мышей на вирус. ***=p<0,001 по Т-тесту Стьюдента.

Фиг. 3 демонстрирует вирулентность CVA-дцнео-ΔB15 у INFAR^{0/0} мышей. А) Указанно число мышей C57BL/6-INFAR^{0/0} 9-18 недельного возраста обоих полов, инфицированных интраназально 50 мл инокулянта, содержащего 2×10^6 TCID₅₀ неочищенного вирусного исходного раствора или 10^7 TCID₅₀ очищенного исходного раствора CVA и CVA-дцнео-ΔB15. Животные проверялись ежедневно и взвешивались в указанные дни. Данные массы тела выражали в процентах от средней массы +/- СКО от соответствующей группы, от исходной средней массы в день 0. В) Выживаемость мышей показана на А).

Фиг. 4 демонстрирует ИФН-α и ИФН-λ индукцию в DC при помощи CVA-дцнео-ΔB15. FL-DC от дикого типа C57BL/6 мышей были инфицированы указанными вирусами в указанных МОИ на 18 ч. Супернатанты культуры DC были проанализированы на ИФН-α и ИФН-λ методом ИФА. CVA и CVA-ΔB15 не стимулируют обнаруживаемых количеств ИФН-α.

Фиг. 5 демонстрирует кинетику индукции мРНК ИФН-β с помощью CVA-дцнео-ΔB15 в клетках A31 и роль вставок кассеты нео. А) Мышиные клетки BALB/3T3 A31 были фальшиво инфицированы или инфицированы очищенным исходным раствором ВАС-производного MVA или CVA дикого типа и CVA мутантов CVA-дцнео-ΔB15 и CVA-ΔB15 при МОИ 10 за указанное время. Клетки лизировали и РНК из клеточных лизатов получали с использованием набора QIAGEN RNeasy. Загрязнение геномной ДНК было устранено с использованием ДНК удаляющих (гДНК) колонок от QIAGEN с последующей дополнительной ДНКазной обработкой Turbo-ДНКазой (Ambion) в течение 1 ч при 37°C и последующей термической инактивации Днказы при 65°C в течение 10 мин. Уровни мРНК ИФН-β были определены с использованием коммерческого анализа экспрессии генов на мышиног ИФН-β (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Продемонстрированы уровни транскриптов ИФН-β в инфицированных клетках по отношению к уровню мРНК ИФН-β в фальшиво инфицированных клетках, экспрессированных как кратное увеличение мРНК ИФН-β. В) Клетки A31 были фальшиво инфицированы или инфицированы неочищенным исходным раствором CVA и указанными CVA мутантами (см. фиг. 1 для информации) при МОИ 10 в течение 6 ч. Подготовку РНК для количественного определения мРНК ИФН-β проводили как описано в А). Продемонстрированы уровни транскриптов ИФН-β в инфицированных клетках по отношению к уровню мРНК ИФН-β в фальшиво-инфицированных клетках, экспрессированных как кратное увеличение мРНК ИФН-β. 1: CVA; 2: CVA-дцнео-ΔB15/B19; 3: CVA-дцнео-ΔB15; 4: CVA-ΔB15; 5: CVA-zeo-ΔB15; 6: CVA-Δp_{B15}-нео-ΔB15; 7: контроль.

Фиг. 6 демонстрирует схематическое описание EGFP и нео вставок дцРНК-продуцирующих MVA мутантов. Указывается направление транскрипции кодирующих последовательностей нео и EGFP (чер-

ные стрелки) контролировавшиеся с помощью pS, pHyb или pB15R промоторов. ORF и все остальные элементы изображены вне шкалы. А) Нео ORF является частью нео-IRES-EGFP выбранной кассеты внутри кассеты ВАС (Meisinger 2010). Последняя вставляется в межгенный участок (IGR) I3L/I4L (MVA064/065). Нео-IRES-EGFP кассета транскрибируется под контролем pS промотора (обозначено стрелкой), в то время как нео/tpsL кассета в B15R локусе транскрибируется в обратной ориентации под контролем промотора B15R. Нео ORF в пределах одного MVA конструирует перекрытие 792 нуклеотидов (обозначено серым боксом) с одним единственным неспаренным основанием. В MVA-дцнео-ΔB15/ΔBAC, полная ВАС кассета в IGR I3L/I4L была удалена через Cre/lox рекомбинацию. В) Все MVA-дцEGFP конструкции в В) основаны на рекомбинанте MVA от которого нео-IRES-EGFP кассета в ВАС кассете была удалена. В MVA-EGFP, нео-IRES-EGFP кассета была заменена с помощью гена нео. EGFP ORF транскрибированный в смысловой ориентации в MVA-EGFP, вставлен в IGR между ORF A25L и A26L (MVA136/137), в то время как EGFP ORF транскрибированный в антисмысловой, вставлен в IGR J2R/J3R (MVA086/087). Потенциальный фрагмент секвенирования дцРНК образуется с помощью перекрытия комплементарных EGFP транскриптов, обозначенных с помощью серого блока. Соседние ORF указаны только для MVA-EGFP и MVA-дцEGFP. Последовательность lacZα на 3' конце антисмыслового EGFP транскрипта вставляется исключительно в MVA-дцEGFP и служит в качестве некомплементарного 3' перекрытия в соответствии с конstellацией комплементарных нео транскриптов в MVA-дцнео-ΔB15. MVA-EGFP содержит дополнительную нео вставку фланкированную FRT участками под контролем бактериального промотора ниже от EGFP ORF. Этот селективный маркер был удален во всех MVA-дцEGFP конструкциях с помощью FLP/FRT рекомбинации.

Фиг. 7 демонстрирует индукцию ИФН-β мРНК и экспрессию белка в мышечных клетках A31 дцРНК-продуцирующих MVA мутантов. Мышечные клетки BALB/3T3 A31 были фальшиво-инфицированы или инфицированы препаратом неочищенных вирусов MVA-мас или указанных мутантов MVA, экспрессирующих один или перекрывающиеся транскрипты нео (А, В) или EGFP (С, D). Клетки А) и С) были инфицированы в течение 5 ч (черные столбцы) и 7 ч (серые столбцы) перед сбором ИФН-β транскриптов для анализа. Индукция ИФН-β гена с помощью CVA-дцнео-ΔB15 инфекции показана ссылкой в А). РНК из клеточных лизатов была получена с использованием набора QIAGEN RNeasy. Загрязняющая ДНК была удалена с использованием ДНК-удаляющих (гДНК) колонок от QIAGEN с последующей дополнительной обработкой Turbo-ДНКазой (Ambion) в течение 1 ч при 37°C и последующей термической инактивации.

Днказы при 65°C в течение 10 мин. Уровни ИФН-β мРНК были определены с помощью ОТ-ПЦР с использованием коммерческого анализа экспрессии генов мышечного ИФН-β (Applied Biosystems). Отсутствие загрязняющей ДНК было продемонстрировано с помощью негативного результата ОТ-ПЦР, когда фермент ОТ был изъят в ОТ-реакции ОТ. Продемонстрированы уровни транскриптов ИФН-β в инфицированных клетках по отношению к уровню мРНК ИФН-β в фальшиво инфицированных клетках. ИФН-β Ct значения нормировались с использованием Ct значения для клеточной 18S рРНК. Уровни белка ИФН-β были определены в супернатантах клеток, инфицированных в течение 18 ч (В) или 23 ч (D). Супернатанты были собраны и проанализированы для мышечного ИФН-β с использованием коммерчески доступного ИФА (PBL). Инфекции, показанные на А и С, были из одного эксперимента, в то время как эксперименты В) и D) были независимыми. А) 1: MVA мас; 2: MVA-дцнео-ΔB15; 3: MVA-дцнео-ΔB15/ΔBac; 4: MVA-ΔB15; 5: CVA-дцнео-ΔB15; 6: контроль. В) 1: MVA мас; 2: MVA-дцнео-ΔB15; 3: MVA-ΔB15; 4: контроль; 5: среднее. С) 1: MVA-EGFP; 2: MVA-дцEGFP; 3: контроль. D) 1: MVA-EGFP; 2: MVA-дцEGFP; 3: контроль.

Фиг. 8 демонстрирует индукцию экспрессии мРНК ИФН-β с помощью MVA-дцEGFP, в зависимости от времени генерации дцРНК. Продемонстрированы уровни транскриптов ИФН-β в инфицированных клетках по отношению к уровню мРНК ИФН-β в фальшиво инфицированных клетках, экспрессированных как "Кратное увеличение мРНК ИФН-β". А) Дт-MEF были фальшиво инфицированы или инфицированы очищенным исходным раствором MVA-EGFP (контрольный вирус, содержащий только одну EGFP вставку, создающую смысловой транскрипт), MVA-дцEGFP-2 как положительный контроль или MVA-ΔE3L (с отсутствующим геном, кодирующим вирусную дцРНК, связывающую белок E3) при MOI 10 в течение 5 часов. Клетки либо оставлены необработанными (черные столбцы) или обработаны цитозинарабинозидом в итоговой концентрации 40 мкг/мл (AraC, белые столбцы), который блокирует вирусную репликацию ДНК и блокирует инфекцию на ранних фазах. РНК из клеточных лизатов была получена и проанализирована с помощью ОТ-ПЦР для уровней мРНК ИФН-β как описано в легенде к фиг. 7. В) Дт-MEF были фальшиво-инфицированы или инфицированы неочищенным исходным раствором MVA-EGFP, MVA-дцEGFP или MVA-дцEGFP-поздним, которые экспрессируют антисмысловую кассету EGFP под контролем сильного и исключительно позднего промотора (SSL), разработанного Bavarian Nordic, в течение 5 ч. РНК из клеточных лизатов была получена и проанализирована с помощью ОТ-ПЦР для уровней мРНК ИФН-β как описано в легенде к фиг. 7.

Фиг. 9 демонстрирует активацию PKR с помощью MVA-дцнео-ΔB15 и MVA-дцEGFP в клетках

A31. Мышиные клетки A31 были инфицированы в 1-й день после посева с неочищенным сходным раствором указанных вирусов при MOI 10. Фосфорилирование eIF2 α (P-eIF2 α) в клеточных лизатах, полученных в назначенное время заражения, было проанализировано с помощью иммуноблота с использованием антител против фосфоэпитопа Ser51 eIF2 α (антитело № 9721, Cell Signaling Technology Inc., Данвер, Массачусетс, США) при разведении 1:1000. Как загрузочный контроль, была разработана отдельная часть мембраны иммуноблота с антителом, определяющим мышинный тубулин изотипа I β .

Фиг. 10 демонстрирует, что увеличение индукции мРНК ИФН- β с помощью MVA-дцEGFP в MEF зависит от PKR. Дт-MEF и PKR-дефицитные (PKR^{0/0}) MEF были фальшиво инфицированы или инфицированы очищенным исходным раствором MVA-EGFP или MVA-дцEGFP при MOI 10 в течение 5 ч. Один мл препарата разведения 1:100 коммерчески доступного вируса Сендай (SeV) был использован как положительный контроль для PKR-независимой, но дцRNA-зависимой индукции ИФН- β . А) РНК из клеточных лизатов была получена и проанализирована с помощью ОТ-ПЦР для уровней мРНК ИФН- β как описано в легенде к фиг. 7. Показаны уровни транскрипта ИФН- β по отношению к уровню мРНК ИФН- β в фальшиво-инфицированных клетках, экспрессированных как "Кратное увеличение мРНК ИФН- β ". 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-дцEGFP; 4: SeV; 5: контроль. В) Уровень белка ИФН- β определяли в супернатантах клеток, инфицированных в течение 24 ч. Супернатанты были собраны и проанализированы для мышинового ИФН- β с использованием коммерчески доступного ИФА (PBL). 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-дцEGFP; 4: SeV; 5: контроль.

Фиг. 11 демонстрирует требования к длине PKR-зависимой индукции ИФН- β с помощью дцРНК-продуцирующих MVA рекомбинантов. Дт-MEF и PKR^{0/0}-MEF были фальшиво-инфицированы или инфицированы неочищенным исходным раствором MVA-EGFP или указанными EGFP-дцРНК мутантами, имеющими прогрессивно укороченные EGFP ORF перекрытия (см. фиг. 6B) при MOI 10 в течение 5 ч (А, С) или 24 ч (В) при 37°C. Один мл препарата разведения 1:100 коммерчески доступного вируса Сендай (SeV) был использован как положительный контроль для дцРНК-зависимой, но PKR-независимой индукции ИФН- β . Кратная индукция мРНК ИФН- β над контролем была определена с помощью ОТ-ПЦР с использованием общей РНК, изолированной из клеток, как описано в легенде к фиг. 7. Значения Ct для мРНК ИФН- β были исправлены со значениями Ct для 18S рРНК, которая служила в качестве эндогенного контроля. В) Уровни белка ИФН- β были определены в супернатантах дт MEF и PKR^{0/0}-MEF, инфицированных в течение 24 ч указанными MVA рекомбинантами. Супернатанты были собраны и проанализированы для мышинового ИФН- β с использованием коммерчески доступного ИФА (PBL). MVA- Δ B15 был включен в качестве дополнительного контроля. А) 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-дцEGFP; 4: MVA-дцEGFP-2; 5: MVA-дцEGFP-3; 6: MVA-дцEGFP-4; 7: MVA-дцEGFP-5; 8: SeV; 9: контроль. В) 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA- Δ B15; 4: MVA-дцEGFP; 5: MVA-дцEGFP-2; 6: MVA-дцEGFP-3; 7: MVA-дцEGFP-4; 8: MVA-дцEGFP-5; 9: SeV; 10: контроль. С) 1: MVA-EGFP; MVA-дцEGFP; 3: MVA-дцEGFP-6; 4: контроль.

Фиг. 12 демонстрирует репликацию и фенотипическую стабильность MVA-дцEGFP. А) Для анализа репликационного поведения MVA-EGFP и MVA-дцEGFP, монослой из 10⁶ вторичных клеток CEF был инфицирован этими вирусами в трех кратной повторности при MOI 0,025 (мультицикл анализа). Начерчена кривая вирусного выхода в указанное время, каждая точка данных представляет результаты трех независимых лунок. В) Монослой из 10⁶ клеток HeLa и HaCaT человека, и клетки CV-1 обезьяны были инфицированы в трех кратной последовательности при MOI 0,025 с MVA-EGFP или MVA-дцEGFP. Начерчена диаграмма соотношения вирусного выхода на третий день пост-инфекции против ввода 5 \times 10⁴ TCID₅₀ на лунку. Каждая точка данных представляет результаты единого титрования трех независимых лунок. С) Монослой вторичных клеток CEF были инфицированы при MOI 10 в течение 5 часов указанными вирусами, пересеянными один раз (P1) или 10 раз (P10) в клетках DF-1 как описано в тексте. Кратная индукция мРНК ИФН- β в инфицированных клетках над имитацией была определена с помощью ОТ-ПЦР с использованием общей РНК, изолированной из клеток, как описано в легенде к фиг. 7. 1: MVA-EGFP-P1; 2: MVA-EGFP-P10; 3: MVA-дцEGFP P1; 4: MVA-дцEGFP P10; 5: имитация.

Фиг. 13 демонстрирует индукцию экспрессии цитокина мутантом MVA-дцEGFP в C57BL/6 дт, IPS-1^{0/0} и PKR^{0/0} мышей. Группы из 5 мышей указанных штаммов (B6=C57BL/6 дт) в возрасте 8-12 недель были инфицированы внутривенно указанными вирусами в дозе 10⁸ TCID₅₀ на мыш. У животных брали кровь через 6 ч после инфицирования и сыворотку анализировали на концентрации выбранных цитокинов как указано, используя капельную проточную цитометрию фирмы Bender Medsystems. А) ИФН- α . В) ИФН- γ . С) IL-6. D) IL-18. E) CXCL1. F) CCL2. G) CCL5.

Фиг. 14 демонстрирует индукцию MVA-специфических Т-клеток CD8 с помощью MVA-EGFP и мутанта MVA-дцEGFP у мышей. А) Группы 3-5 C57BL/6 мышей в возрасте 8 недель были инфицированы однократно внутривенно (А) указанными вирусами в дозе 10⁸ TCID₅₀/мыш. Селезенки были собраны на 7 день п.и. и суспензии одиночных клеток спленоцитов были использованы для количественной оценки MVA-специфических Т-клеток CD8 с помощью окраски декстрамеров ГКГС класса I с использованием V8₂₀₋₂₇ эпитоп-специфических декстрамеров. Показаны объединенные результаты двух независимых

экспериментов. Звездочка указывает р-значение $< 0,05$ в двухстороннем непарном Т-тесте Стьюдента.

Фиг. 15 демонстрирует индукцию экспрессии мРНК ИФН- β в клетках MRC-5 человека MVA-дцEGFP мутантами. Клетки MRC-5 (диплоидные фибробласты легких человека) в 6-луночных планшетах были фальшиво-инфицированы или инфицированы неочищенным исходным раствором MVA-EGFP, что соответствует MVA дт и указанным MVA-дцEGFP рекомбинантам с прогрессивно укороченными EGFP ORF перекрытиями. MVA-дцнео- $\Delta B15$ и MVA- $\Delta B15$ использовались дополнительно и кратная индукция мРНК ИФН- β над имитацией была определена с помощью ОТ-ПЦР с использованием общей РНК, изолированной из клеток через 5 ч постинфекции, как описано в легенде к фиг. 7. Ст значения ИФН- β нормировались с использованием Ст значений для клеточной 18S рРНК, который служил в качестве эндогенного контроля. Продемонстрированы уровни транскриптов ИФН- β в инфицированных клетках по отношению к уровню мРНК ИФН- β в фальшиво инфицированных клетках, экспрессированных как "Кратная индукция мРНК ИФН- β ". 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-дцнео- $\Delta B15$; 4: MVA- $\Delta B15$; 5: MVA-дцEGFP; 6: MVA-дцEGFP-2; 7: MVA-дцEGFP-3; 8: MVA-дцEGFP-4; 9: MVA-дцEGFP-5; 10: имитация.

Фиг. 16 демонстрирует схематическое изображение индукции гена MVA-дцE3L и ИФН- β с помощью MVA-дцE3L А) Схематическое изображение мутантных MVA-дцE3L. Указано направление транскрипции кодирующей последовательности E3L (черные стрелки) с помощью природного рE3L и вставленного рH5m промотора. Сигналы ранней терминации транскрипции (ЕТТС) указаны с помощью перпендикулярных серых полос. Серые стрелки указывают направление транскрипции, для которого ЕТТС является потенциально активным. Антисмысловый ЕТТС в E3L ORF был инактивирован путем сайт-направленного мутагенеза из неустойчивой позиции в кодон без изменения аминокислотной последовательности E3. Потенциальный фрагмент секвенирования дцРНК, сформированный с помощью двух комплементарных транскриптов E3L, обозначен серым блоком. В) MEF в 6-луночных планшетах был фальшиво-инфицирован или инфицирован неочищенным исходным раствором указанных вирусов при MOI 10. MVA-EGFP соответствует MVA дт. Кратная индукция мРНК ИФН- β над имитацией была определена с помощью ОТ-ПЦР с использованием общей РНК, изолированной из клеток после 5 ч п.и. Значения Ст для мРНК ИФН- β были исправлены со значениями Ст для 18S рРНК, которая служила в качестве эндогенного контроля. 1: MVA-EGFP; MVA-дцEGFP; 3: MVA-дцEGFP-5; 4: MVA-дцEGFP-позднего; 5: MVA-дцE3L.

Фиг. 17 демонстрирует, что аминокислотная последовательность гена B19R сохраняется через ряд поксвирусов. А), В), С) и D) аминокислотную последовательность выравнивания генов B19R и/или их гомологов, кодируемых вирусом оспы обезьян (SEQ ID NO:1), вирусом осповакцины-Western Reserve ("Vaccinia-WR") (SEQ ID NO:2), вирусом осповакцины-Копенгаген (SEQ ID NO:3), хориоаллантоисным вирусом осповакцины Анкара ("CVA") (SEQ ID NO:4), вирус экстремелии (SEQ ID NO:5), вирус коровьей оспы (SEQ ID NO:6), вирус оспа верблюдов (SEQ ID NO:7), вирус оспы свиней (SEQ ID NO:8), и вирус танапокс (SEQ ID NO:9) созданный с помощью ClustalO, в. 1.2.0 с настройками по умолчанию. Е) Таблица, демонстрирует по парные аминокислотные последовательности идентифицированные как последовательности B19R и/или их гомологи, выровненные по частям А), В), С) и D).

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:1 [№ доступа. Q51XK2: ИФН-альфа/бета-рецептор-подобный секретируемый гликопротеин; Вирус оспы обезьян]:

```
MMKMKMMVRIYFVLSLFFFHSHYAIIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPVCMFGGT
MNDMAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKYDVVVKWERLEKNRRRQVSNKRVKHGDWLIANYTSKF
SNRRYLCTVTTKNGDCVQGVVRSVHWKPPSSCIPKTYELGTYDKYGIDLYCGILYAKHYNNITWY
KDNKEINIDDFKYSQAGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTIVIPSQDH
RFKLIIDPKINVTIGEPANITCSAVSTSLFVDDVLI EWKNPSGWIIGLDFGVYSILTSRGGITE
ATLYFENVTEEYIGNTYTCRGNHYFDKTLTTTVVLE
```

SEQ ID NO:2 [№ доступа. P25213: Растворимый интерферон альфа/бета рецептора B19; Вирус осповакцины, штамм Western Reserve]:

```
MTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPACMFGGTMNDIAA
LGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKYDVVVKWERLEKNRRRQVSNKRVKHGDWLIANYTSKFSNRRYL
CTVTTKNGDCVQGVVRSVHWKPPSSCIPKTYELGTHDKYGIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEI
NIDDIKYSQTGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTIVIPSQDHRFKLIL
DPKINVTIGEPANITCTAVSTSLIIDDVLI EWENPSGWLIGFDFVYSVLTLSRGGITEATLYFE
NVTEEYIGNTYKCRGNHYFEKTLTTTVVLE
```

SEQ ID NO:3 [№ доступа. Q5CAD5: ИФН-альфа/бета-рецептор-подобный секретируемый гликопротеин; Вирус осповакцины, штамм Копенгаген]:

MTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTLPAKDSKWLNPACMFGGTMNDIAA
 LGPEPFSACPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRVKHGDWLWIANYSKFSNRRL
 CTVTTKNGDCVQGIIVRSHIKKPPSCIPKTYELGTHDKYGIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEI
 NIDDIKYSQTGKKLI IHNPELEDSGRYNCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLIL
 DPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLDVLI EWENPSGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLYFE
 NVTEEYIGNTYKCRGHNYFEKTLTTTVVLE

SEQ ID NO:4 [№ доступа. A9J168: Растворимый и поверхностный клеточный интерферон-
 альфа/бета-рецептор; Вирус осповакцины, штамм Анкара (CVA)]:

MKMTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTLPAKDSKWLNPACMFGGTMNDI
 AALGPEPFSACPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRVKHGDWLWIANYSKFSNRRL
 YLCTVTTKNGDCVQGIIVRSHIKKPPSCIPKTYELGTHDKYGIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNK
 EINIDDIKYSQTGKKLI IHNPELEDSGRYNCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKL
 ILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLDVLI EWENPSGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLY
 FENVTEEYIGNTYKCRGHNYFEKTLTTTVVLE

SEQ ID NO:5 [№ доступа. Q9JFS5: ИФН-альфа/бета-связывающий белок; вирус экстремелии]:

MMKMTMKMMVRIYFVSLSLSLSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTLPAKDSKWLNPSCMFGG
 TMNDMAALGPEPFSACPPIEDSLLSHRYNDKDNVVNWEKIGKTRRPLNRRVKNGDLWIANYSN
 DSHRRYLCTVTTKNGDCVQGIIVRSHIRKPPSCIPETIYELGTHDKYGIDLYCGILYAKHYNNITW
 YKNNQELIIDGTKYSQSGQNLI IHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQD
 HRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLDVLI EWENPSGWIIGLDFGVYSILTSSGGIT
 EATLYFENVTEEYIGNTYTCRGHNYFDKTLTTTVVLE

SEQ ID NO:6 [№ доступа. Q5CAC3: Растворимый интерферон-альфа/бета рецептор; вирус коровьей
 оспы]:

MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMKDTLPAKDSKWLNPACMFGGT
 MNDMAAIGPEPFSACPPIEDSLLSHRYKDKDNVVNWEKIGKTRRPLNRRVKNGDLWIANYSND
 SRRRYLCTVITKNGDCIQGIIVRSHVRKPPSCIPETIYELGTHDKYGIDLYCGI IYAKHYNNITWY
 KDNKEINIDDIKYSQTGKELI IHNPALEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDH
 RFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLDVLI EWENPSGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITE
 ATLYFENVTEEYIGNTYKCRGHNYFEKTLTTTVVLE

SEQ ID NO:7 [№ доступа. Q5CA87: Растворимый интерферон-альфа/бета рецептор; вирус оспы
 верблюда]:

MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLSLLLLLFHSYAIDIENEITDFFNKMKDILPTKDSKWLNPACMFGGTTN
 DMAAIGPEPFSACPPIEDSLLSHRYKNKDNVVNWEKIGKTKRPLNRRVKNGDLWIANYSNDSR
 RRYLCTAITKNGDCIQGIIRSHVRKPPSCIPETIYELGTHDKYGIDLYCGI IYAKHYNNITWYKD
 NKEINIDDIKYSQTGKELI IHNPALEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVTPSQDHRF
 KLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLDVLI EWENPSGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEAT
 LYFENVTEEYIGNTYKCRGHNYFEKTLTTTVVLE

SEQ ID NO:8 [№ доступа. Q8V3G4: ИФН-альфа/бета-подобный связывающий белок; Вирус оспы
 свиней, штамм Swine/Nebraska/17077-99/1999]:

MISIKYNIILLFIISFIYCSADNDIDSLYEGYKEFLDPKPKQFLNDNCTYRGYRDFFLYNEEPA
 NIKCPLLNDILLRQKYHNYTILWKKLGERSSRLLNTHGSI FLDFFPYKSELRGSVYECMIILNN
 TCDQFILKLNDIRSNPVCYHNDYKVHTNIEIFCNVINLQYDYITWYKNNSEI IIDGYKYSNQSR
 RLLVYNTTYNDSGIYYCNAYTTHGKNTYISRRCSSVSIHSHSYDFYIEHINNITYIDPDSNT
 QIYCKAISYSNSSYILYWEDEYGGYIYDNGIYQYDNITLIGNEKVYMSILVLEKSAYRYVNN
 TFTCLATSVYVEKKT TTTTLVIKKT

SEQ ID NO:9 [№ доступа. A7XCS4: Рецептор ИФН типа I; вирус Танапокс]:

MKITYI ILLICKEI ICDNSGDDMYDIANGNIDYLKTI DNDI INLVNKNCS FREIKTTLAKENE
 VLMLKCPQLDNYILPWKYMNRSEYTVTWKNI SNSTEYNNTRIENNMLMFFPFYNLQAGSKYLCT
 VSTNKSCDQSVVIVKKS FYSNNCMLSEAKENDNFEI YCGILHAKYNTIKWFKEEKEITNNYKY
 TKLGGYVKGINNVITYSDSGKYVCEGYIDVLKNITYTAKRCVNLTVIPNTYYDFFI VDI PNVTY
 AKNNKKLEVNCTSFVDINSYDYILTSWLYNGLYLPLGVRIYQLYSTDIFFENFIYRTSTLVFEN
 VDISDDNKTFECEALSVTLKKIKYTTIKVEK

Описание некоторых вариантов осуществления изобретения

Далее будет приведено подробное описание на примере вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах.

Определения

Если не указано иное, технические термины в настоящем документе используются согласно обычному использованию специалистом в данной области молекулярной биологии. Для общих терминов в молекулярной биологии обычное использование может быть найдено в стандартных учебниках, таких как, например, Genes V Benjamin Lewin, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.); The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference edited by Robert A. Meyers, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

В контексте данного документа определения в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "эпитоп" включает ссылку на один или более эпитопов и ссылка на "способ" включает в себя ссылку на эквивалентные шаги и способы, известные специалистам в этой области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, представленными в данном документе.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере" предшествующий серии элементов следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области техники узнают или будут способны установить с использованием не более чем рутинных экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в данном документе. Такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

В описании и формуле изобретения, которые следуют ниже, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", означают "включает в себя", и, следовательно, включают в себя указанное целое или стадию, или группу целых или стадий, и не исключает любое другое целое, или стадию, или группу целых или стадий. При использовании в данном документе термин "включающий в себя" может быть заменен термином "содержащий", "включающий" или "имеющий". Любой из указанных выше терминов (включающий в себя, содержащий, включающий, имеющий), всякий раз, когда используется в данном документе в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения может быть заменен термином "состоящий из".

При использовании в данном документе, термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в формуле изобретения. При использовании в данном документе, термин "состоящий в основном из" исключает любые материалы или стадии, "которые будут влиять на основные и новые характеристики" продукта или способа, определенные в остальной формуле изобретения. Water Techs. Corp. v. Calco Ltd., 7 U.S.P.Q.2d 1097, 1102 (Fed. Cir. 1988).

Как используется в данном документе, соединительное "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимается как охватывающее как индивидуальные, так 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. Как используется в данном документе, любой из этих вариантов понимается попавшим в пределы значения, и поэтому удовлетворяет требованию термина "и/или". Одновременная применимость более чем одного из вариантов также понимается как подпадание в пределы значения, и поэтому, удовлетворяет требованию термина "и/или".

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые здесь, включены в качестве ссылки во всей их полноте. В случае конфликта настоящее описание изобретения, включая все определения, будет контролироваться.

Адьювант. Средство применяют для усиления антигенности. Адьюванты могут включать: (1) суспензии минералов (квасцы, гидроксид алюминия или фосфат), на которых адсорбируется антиген; (2) эмульсии вода-в-масле, в которых раствор антигена эмульгирован в минеральном масле (неполный адьювант Фрейнда), иногда с включением убитых микобактерий (полный адьювант Фрейнда) для дальнейшего повышения антигенности путем ингибирования деградации антигена, и/или вызова притока макрофагов, и/или активации иммунных клеток; (3) иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как, например, те, которые содержат CpG мотив также могут быть использованы в качестве адьювантов (на-

пример, см. Патент США № 6194388; и Патент США № 6207646); и (4) очищенные или рекомбинантные белки, такие как костимулирующие молекулы. Примеры адъювантов включают, но не ограничиваются ими B7-1, ICAM-1, LFA-3, и GM-CSF.

Антигена; антигенная детерминанта; эпитоп.

Соединения, композиции или вещества, которые могут стимулировать выработку антител или CD4+ или CD8+ Т-клеточный ответ у животных, включают композиции, которые вводят или всасываются животным. Антиген реагирует с иммунной системой для получения антиген-специфического гуморального или клеточного иммунного ответа. Термин "антиген" включает в себя все связанные с этим эпитопы конкретного соединения, композиции или вещества. Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене, на который В- и/или Т-клетки реагируют, либо самостоятельно, либо в сочетании с другим белком, таким как, например, белок главного комплекса гистосовместимости ("ГКГС") или Т-клеточным рецептором. Т-клеточные эпитопы формируются из смежных фрагментов секвенирования от 8 до ~20 аминокислот. Эпитопы В-клетки могут быть сформированы как из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, помещенных рядом вторичным и/или третичным сворачиванием белка. Эпитопы В-клетки, сформированные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные третичной складчатостью, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп В-клетки обычно включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот, но, как правило, меньше, чем 20 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерного ядерный магнитный резонанс. См., например, "Epitope Mapping Protocols" в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Антиген может быть ткане-специфическим (или ткане-ассоциированным) антигеном или специфичным к заболеванию (или ассоциированным с заболеванием) антигеном. Эти термины не являются взаимоисключающими, потому что ткане-специфический антиген также может быть болезнь-специфическим антигеном. Ткане-специфический антиген экспрессируется в ограниченном числе тканей. Ткане-специфические антигены включают, например, простатический специфический антиген (ПСА). Болезнь-специфический антиген экспрессируется, совпадая с процессом болезни, когда экспрессия антигена коррелирует с или предсказывает развитие конкретного заболевания. Болезнь-специфические антигены включают, например, HER-2 с которым связаны определенные типы рака молочной железы, или ПСА, который связан с раком простаты. Болезнь-специфический антиген может быть антигеном, распознаваемым Т-клетками или В-клетками. Ткань-и/или болезнь-специфические антигены могут включать, но не ограничиваться ими, бактериальные антигены, грибковые антигены, антигены паразита, или опухоль-ассоциированные антигены, или вирусные антигены.

Бактериальные антигены. Антигены, полученные из одного вида бактерий или их штаммов таких как, например, *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, энтеротоксигенная *Escherichia coli*, энтеропатогенная *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, и *Yersinia pestis*.

Грибковые антигены. Антигены, полученные из одного вида грибов или их штаммов таких как, например, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium canis*, *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Stachybotrys chartarum*, *Tinea barbae*, *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea faciei*, *Tinea incognita*, *Tinea nigra*, *Tinea versicolor*, *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton tonsurans*.

Антигены паразита. Антигены, полученные из одного или более вида паразита или их штаммов таких как, например, *Anisakis spp.*, *Babesia spp.*, *Baylisascaris procyonis*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayentanensis*, *Diphyllobothrium spp.*, *Dracunculus medinensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Taenia spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, и *Trypanosoma cruzi*.

Опухоль-ассоциированные антигены. Антигены, сверхэкспрессированные или преимущественно экспрессированные на определенных видах опухолей, таких как, например, 5- α редуктаза, α -фетопротеин

("АФП"), AM-1, АПК, April, ген антигена меланомы В ("BAGE"), β -катенин, Bcl12, bcr-abl, Brachyury, CA-125, каспаза-8 ("CASP-8", также известная как "FLICE"), Cathepsins, CD19, CD20, CD21/комплементарный рецептор 2 ("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/F_сRII, CD33, CD35/комплементарный рецептор 1 ("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/общий антиген лейкоцитов ("LCA"), CD46/мембранный кофактор белка ("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/фактор ускорения распада ("DAF"), CD59/протектин, CDC27, CDK4, карциноэмбриональный антиген ("CEA"), с-мус, циклооксигеназа-2 ("cox-22"), удаленный при колоректальном раке ген ("DCC"), Dcr3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, фарнезилтрансфераза, фактор роста фибробластов-8а ("FGF8a"), фактор роста фибробластов-8b ("FGF8b"), FLK-1/KDR, рецептор фолиевой кислоты, G250, антиген семейства генов меланомы G ("GAGE-семейство"), гастрин 17, гастрин-высвобождающий гормон, ганглиозид 2 ("GD2")/ганглиозид 3 ("GD3")/ганглиозид-моносиаловая кислота-2 ("GM2"), гонадотропин-высвобождающий гормон ("GnRH"), UDP-GlcNAc:R₁Man(α 1-6)R₂ [GlcNAc to Man(α 1-6)] β 1,6-N-ацетилглюкозаминтрансфераза V ("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/тирозин-связанный белок-1 ("gp75/TRP-1"), хорионический гонадотропин человека ("ХГ"), гепарины, Her2/neu, вирус опухоли молочной железы человека ("HMTV"), белок теплового шока 70 килодальтон ("HSP70"), обратная транскриптаза теломеразы человека ("hTERT"), рецептор-1 инсулиноподобного фактора роста ("IGFR-1"), рецептор интерлейкина-13 ("IL-13R"), индуцибельная синтаза окиси азота ("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, антиген-кодирующий ген меланомы 1 ("MAGE-1"), антиген-кодирующий ген меланомы 2 ("MAGE-2"), антиген-кодирующий ген меланомы 3 ("MAGE-3"), антиген-кодирующий ген меланомы 4 ("MAGE-4"), маммаглобин, MAP17, Мелан-А/антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками-1 ("MART-1"), мезотелин, MIC A/B, MT-MMPs, муцин, семенник-специфический антиген NY-ESO-1, остеоонектин, p15, P170/MDR1, p53, p97/меланотрансферрин, PAI-1, тромбоцитарный фактор роста ("ТРФ"), μ РА, PRAME, пробасин, прогенопозтин, простат-специфический антиген ("PSA"), простат-специфический антиген мембраны ("PSMA"), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-семейство, STAT3, STn, TAG-72, трансформирующий фактор роста-альфа ("TGF- α "), трансформирующий фактор роста-бета ("TGF- β "), Тимозин-бета-15, фактор некроза опухоли-альфа ("ФНО- α "), TP1, TRP-2, тирозиназа, фактор роста эндотелия сосудов ("VEGF"), ZAG, p16INK4, и глутатион-s-трансфераза ("GST").

Вирусные антигены. Антигены, полученные из одного или более типов вируса или их изолятов, таких как, например, аденовирус, вирус Коксаки, Конго-Крымской вирус геморрагической лихорадки, цитомегаловирус ("ЦМВ"), вирус денге, вирус Эбола, вирус Эпштейна-Барр ("EBV"), вирус Гуанарито, вирус простого герпеса-тип 1 ("HSV-1"), вирус простого герпеса-тип 2 ("HSV-2"), герпесвирус человека-тип 8 ("HHV-8"), вирус гепатита А ("HAV"), вирус гепатита В ("HBV"), вирус гепатита С ("HCV"), вирус гепатита D ("HDV"), вирус гепатита Е ("HEV"), вирус иммунодефицита человека ("ВИЧ"), вирус гриппа, вирус Хунин, Ласса вирус, вирус Мачупо, вирус Марбург, вирус кори, человеческий метапневмовирус, вирус паротита, вирус Норуолк, вирус папилломы человека ("ВПЧ"), вирус парагриппа, парвовирус, вирус полиомиелита, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус ("РСВ"), риновирус, ротавирус, вирус краснухи, вирус Сабиа, вирус тяжелого острого респираторного синдрома ("атипичная пневмония"), Коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома ("MERS-CoV"), вируса ветряной оспы, вируса натуральной оспы, вирус Западного Нила и вирус желтой лихорадки.

кДНК (комплементарная ДНК). В части ДНК отсутствуют внутренние некодирующие сегменты (интроны) и регуляторные последовательности, которые определяют время и место инициации транскрипции и терминации. кДНК может быть синтезирована в лаборатории с помощью обратной транскрипции матричной РНК ("мРНК"), извлеченной из клеток.

Консервативный вариант. "Консервативный" вариант представляет собой вариант белка или полипептида, имеющий одну или более аминокислотных замен, которые не оказывают существенного влияния, или уменьшения активности, или антигенности белка, или их антигенного эпитопа. Как правило, консервативными заменами являются те, в которых определенная аминокислота заменена другой аминокислотой, имеющей одинаковые или сходные химические характеристики. Например, замена основной аминокислоты, такой как лизин, другой основной аминокислотой, такой как аргинин или глутамин, представляет собой консервативную замену. Термин "консервативный вариант" также включает в себя использование замещенной аминокислоты вместо незамещенной родительской аминокислоты, при условии, что антитела, индуцированные к замещенному полипептиду также иммунореагируют с незамещенным полипептидом, и/или, что замещенный полипептид сохраняет функцию незамещенного полипептида. Неконсервативные замены представляют собой те, которые заменяют определенную аминокислоту одной, имеющей различные химические характеристики, и, как правило, снижают активность, или антигенность белка, или их антигенный эпитоп.

Конкретные, не ограничивающие примеры консервативных замен включают следующие примеры:

Оригинальные Остатки	Консервативные Замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

CD4. Кластер фактора дифференцировки 4, белок поверхности Т-клетки, который опосредует взаимодействие с молекулой ГКГС класса II. Клетки, экспрессирующие CD4, упоминаемые как "CD4+" клетки, часто представляют собой вспомогательные Т-клетки (например, "T_H", "T_H1" или "T_H2").

CD8. Кластер фактора дифференцировки 8, белок поверхности Т-клетки, который опосредует взаимодействие с молекулой ГКГС класса I. Клетки, экспрессирующие CD8, упоминаемые как "CD8+" клетки, часто представляют собой цитотоксические Т-клетки ("CTL").

Костимулирующая молекула. Т-клеточная активация, как правило, требует связывания Т-клеточного рецептора ("TCR") с комплексом белок-ГКГС, а в качестве второго сигнала - подаваемый через взаимодействие костимулирующей молекулы с ее лигандом. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы, которые, когда они связаны с их лигандом, подают второй сигнал, необходимый для активации Т-клеток. Наиболее известная костимулирующая молекула на Т-клетке представляет собой CD28, которая связывается либо с B7-1, либо с B7-2. Другие костимулирующие молекулы, которые также могут обеспечить второй сигнал необходимый для активации Т-клеток, содержат молекулу межклеточной адгезии-1 ("ICAM-1"), молекулу межклеточной адгезии-2 ("ICAM-2"), связанный антиген лейкоцитарной функции-1 ("LFA-1"), связанный антиген лейкоцитарной функции-2 ("LFA-2"), и связанный антиген лейкоцитарной функции-3 ("LFA-3"). Комбинация B7-1, ICAM-1, и LFA-3 упоминается как "TRICOM", для "Триады Костимулирующих Молекул".

Дендритные клетки (DC). Дендритные клетки являются главными антигенпредставляющими клетками ("АПК"), участвующими в первичных иммунных ответах. Дендритные клетки содержат плазмоцитонидные дендритные клетки и миелоидные дендритные клетки. Их основной функцией является получение антигена в тканях, миграция в лимфоидные органы и представление антигена для активации Т-клеток. Незрелые дендритные клетки зарождаются в костном мозге и находятся на периферии как незрелые клетки.

Двухцепочечные РНК (дцРНК). Рекombинантный поксвирус включает в себя гетерологичные или природные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие повышенное число или количество дцРНК (например, экспрессирующие избыточную дцРНК) согласно любому варианту осуществления данного изобретения, запускает высвобождение цитокининов, хемокинов, эффекторных молекул, и/или увеличивает экспрессию костимулирующих молекул, или активирует один или более рецептор(ов) узнавания паттерна (PRR), и/или активирует клетки (например, дендритные клетки, макрофаги, В-клетки или другие типы иммунных клеток), и таким образом предпочтительно запускает или индуцирует усиленный врожденный иммунный ответ. Избыток дцРНК может быть определен любым подходящим способом, предпочтительно с использованием способа определения повышенного врожденного иммунного ответа или любым способом, как описано в примерах предпочтительно способом, соответствующим примеру 16. Желательно, чтобы избыток дцРНК мог определяться как сумма дцРНК в начале инфекции, что создает усиление врожденного иммунного ответа при использовании вектора рекомбинантного поксвируса настоящего изобретения. Более предпочтительно, чтобы избыток дцРНК можно было определить как сумму дцРНК, транскрибированную в течение ранней фазы вирусной инфекции с рекомбинантным поксвирусом, со-

держащим гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие или генерирующие дцРНК по сравнению с контролем. Избыточная дцРНК может быть сгенерирована при запуске транскрипции смысловой или антисмысловой РНК с идентичными или перекрывающимися последовательностями фрагментов секвенирования, предпочтительно по меньшей мере 100 п.о. в длину, с использованием поксвирусных промоторов с ранней активацией (например, немедленно ранние, ранние, или ранние/поздние поксвирусные промоторы). Другой способ определения избытка дцРНК представляет собой определение усиления активации одного или более PRR, например, PKR, как определено увеличением фосфорилирования PKR подложки (например, eIF2 α в позиции Серин-51) как показано в примере 7. Предпочтительно, повышенное фосфорилирование субстрата PKR (например, eIF2 α в позиции Серин-51) усиливается по меньшей мере в 2-раза, по меньшей мере в 4-раза, по меньшей мере в 6-раз, по меньшей мере в 8-раз, по меньшей мере в 10-раз, по меньшей мере в 15-раз, по меньшей мере в 20-раз, по меньшей мере в 30-раз, по меньшей мере в 40-раз, по меньшей мере в 50-раз, по меньшей мере в 100-раз или более по сравнению с контролем.

Начало инфекции. Каскадный тип регуляции экспрессии генов поксвирусов. Ранняя транскрипция вирусных генов обусловлена вирусным транскрипционным аппаратом, принесенным с вирусной частицей во вновь инфицированную клетку, и находится под контролем ранних вирусных промоторов, распознаваемых комплексом ранней вирусной транскрипции. Хорошо известно, что, как только вирион и мембрана хозяина слились и кор вируса был выпущен в цитоплазму, эндогенная РНК-полимераза и инкапсулирующие факторы транскрипции, которые включают экспрессию вирусного гена, начинают первый каскад ранней экспрессии вирусного гена, который синтезирует вирусную мРНК под контролем ранних промоторов. Обычно начало инфекции, например, ранняя фаза длится около от 1 до 2 часов до репликации генома. Предпочтительно, чтобы начало инфекции представляло собой промежуток времени между связыванием вирусной частицы (например, рекомбинантного поксвируса) в клетке-хозяине и началом репликации вирусного генома (например, репликации генома рекомбинантного поксвируса). Среди ранних белков есть факторы транскрипции для репликации вирусного дцДНК генома и на следующий этап транскрипции называют промежуточным, который может начаться только после того, как начала репликации вирусного генома. Предпочтительно, начало инфекции находится в пределах 30 минут, одного часа или двух часов после заражения или после инокуляции, желателно после того, как кор вируса был выпущен в цитоплазму клетки.

Последовательности контроля экспрессии.

Последовательности нуклеиновых кислот, которые регулируют экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, с которой они функционально связаны.

Последовательности, контролирующие экспрессию, функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, когда последовательности, контролирующие экспрессию, контролируют и регулируют транскрипцию и/или трансляцию последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин "последовательности, контролирующие экспрессию" включает промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, старт кодоны, сигналы сплайсинга для интронов, и стоп-кодона. Термин "контролирующие последовательности" включает, как минимум, компоненты, присутствие которых может влиять на транскрипцию и/или трансляцию последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых полезно, таких как, например, лидерных последовательностей и последовательностей партнеров слияния.

Термин "последовательности, контролирующие экспрессию" охватывает промоторные последовательности. Промотор - это минимальная последовательность, достаточная для направления транскрипции гомологичных или гетерологичных генов. Также включены те промоторные элементы, которые достаточны для визуализации промотор-зависимой экспрессии генов специфического клеточного типа, тканеспецифических, или индуцируемых внешними сигналами или агентами; такие элементы могут быть расположены в 5' или 3' участках гена. Термин "промотор" включает оба конститутивных и индуцибельных промотора. См., например, Bitter и др., *Methods in Enzymology* 153:516-544 (1987). Примеры последовательностей промотора, включают, но не ограничиваются ими, длинный концевой повтор ретровируса ("LTR"), основной поздний промотор аденовируса, промотор вируса осповакцины 7,5K ("Pr7,5"), синтетический ранний/поздний промотор вируса осповакцины ("sE/L"), промотор PrSynIIIm, промотор PrLE1, промотор PrH5m, промотор PrS, гибридный ранний/поздний промотор, или промотор АТI вируса коровьей оспы. Другие подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, ранний промотор SV40, основной поздний промотор аденовируса, немедленный ранний промотор I человеческого ЦМВ, а также различные поксвирусные промоторы, включая, но не ограничиваясь следующим вирусом осповакцины, или MVA-производными промоторов: промотор 30K, промотор I3, промотор sE/L, промотор Pr7,5K, промотор 40K, промотор C1, промотор PrSynIIIm, промотор PrLE1, промотор PrH5m, промотор PrS, а гибридный ранний/поздний промотор PrHyb, промотор PrS5E, промотор PrA5E, Pr13,5-длинный промотор, и промотор Pr4LS5E; промотор АТI вируса коровьей оспы, или следующим промотором, полученным из вируса птичьей оспы: промотор Pr7,5K, промотор I3, промотор 30K, или промотор 40K.

Гетерологичные. Возникающие из отдельных генетических источников или видов. Полипептид, ко-

торый является гетерологичным по отношению к модифицированному вирусу осповакцины Анкара ("MVA"), возник из нуклеиновой кислоты, не включенной в геном MVA, такой как, например, бактериальный антиген, грибковый антигена, антиген паразита, опухоль-ассоциированный антиген или вирусный антиген. Термин трактуется в широком смысле, чтобы охватить любую не-нативную нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК или белок, который обычно не кодируется геномом MVA, или любой не-нативный белок, кодирующийся такой не-нативной нуклеиновой кислотой.

Гомолог; вариант. Термин "гомолог" или "вариант", когда речь идет о последовательности гена или белка, охватывает нативную аминокислотную последовательность гена или белка, о котором идет речь, фрагменты белка по-прежнему способные вызывать иммунный ответ у хозяина, а также гомологи или варианты белков и фрагментов белков, включая, например, гликозилированные белки или полипептиды. Таким образом, белки и полипептиды не ограничены конкретными последовательностями нативных аминокислот, но охватывают последовательности, идентичные нативной последовательности, а также модификации нативной последовательности, такие как делеции, добавки, вставки и замещения. Предпочтительно, такие гомологи или варианты имеют по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, или 89%, по меньшей мере около 90, 91, 92, 93 или 94%, по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99%, или около 100% идентичности аминокислотной последовательности с контрольным белком или полипептидом. Термин "гомолог" или "вариант" также охватывает укороченные, удаленные или иным образом модифицированные последовательности нуклеотида или белка.

Термин "гомолог" или "вариант" также охватывает вырожденные варианты нативных последовательностей. Вырожденный вариант представляет собой полинуклеотид, кодирующий белок или его фрагмент, который включает в себя последовательность, содержащую кодоны, отличные от последовательности нативного или гена дикого типа, но по-прежнему указывает на ту же аминокислотную последовательность. Генетический код определяет 20 природных аминокислот, большинство из которых кодируется более чем одним кодоном. Таким образом, представляет собой избыточный или вырожденный код. Все вырожденные нуклеотидные последовательности, охватываемые в данном описании, при условии, что последовательность аминокислот белка, кодируемого вырожденного полинуклеотидом, остается неизменной.

Способы определения идентичности последовательности между аминокислотными последовательностями известны в данной области техники. Две или несколько последовательностей можно сравнить путем определения их "процента идентичности". Процент идентичности двух последовательностей, является количеством точных совпадений между двумя выровненными последовательностями, деленным на длину более короткой последовательности и умноженное на 100.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении белков, полипептидов, антигенных фрагментов белков, антигенов и эпитопов, описанных в данном документе, определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в контрольной последовательности (то есть, белок, полипептид, антигенный фрагмент белка, антиген или эпитоп, из которого он получен), после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентифицированной последовательности. Выравнивания с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно добиться различными способами, которые находятся в пределах уровня рядового специалиста в данной области техники, например, используя публично доступные компьютерное программное обеспечение, такое как BLAST, ALIGN, или Megalign (DNASTAR) программное обеспечение. Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Клетки-хозяева. Клетки, в которых вектор может быть размножен и его ДНК экспрессируется. Клетки могут быть прокариотические (например, бактериальные) или эукариотические (например, млекопитающих или человека). Термин также охватывает потомство исходной клетки-хозяина, хотя все потомство может не быть идентичным родительской клетке, так как могут возникать мутации, которые происходят во время репликации.

Иммунный ответ. Адаптивный ответ иммунной системы клетки, такой как В-клетка, Т-клетки, или моноцит, на стимул. Адаптивный ответ представляет собой ответ на конкретный антиген, и, таким образом, описывается как "антиген-специфический". Адаптивный иммунный ответ может включать в себя выработку антител к определенному антигену В-клеткой, помощь Т-клетки путем CD4⁺ хелперной Т-клетки, расширение популяции антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток (цитотоксические Т-лимфоциты, "CTL"), цитотоксическая активность CD8⁺ Т-клеток, направленная против клеток, экспрессирующих конкретный антиген, или еще один тип антиген-специфического иммунного ответа.

Иммуногенные композиции. Как используется в настоящем документе, термин "иммуногенная композиция" относится к композиции, содержащей рекомбинантный поксвирус, включающий гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие раннюю двухпочечную РНК (дцРНК). Термин также охватывает рекомбинантные поксвирусы, включающие гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрес-

сирующие раннюю дцРНК и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гетерологичный, ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием, или опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой антиген инфекционного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген инфекционного заболевания представляет собой вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген или антиген паразита. Рекомбинантный поксвирус может дополнительно включать дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие, например, одну или более костимулирующих молекул, как описано в другом месте данного документа. Такие композиции могут включать рекомбинантный поксвирус, дополнительно разработанный с одним или более фармацевтически приемлемым носителем.

"Нуждающиеся в этом". При применении в отношении к способам усиления иммунного ответа и использования рекомбинантных поксвирусов иммуногенных композиций и фармацевтических композиций, представленных в данном документе, субъектом "нуждающимся в этом" может быть человек, которому был поставлен диагноз или которого ранее лечили по медицинским показаниям в результате, например, вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекции, или неопластического состояния (т.е., рака). Что касается профилактики, то субъект, нуждающийся в этом, также может быть субъектом подверженным риску развития медицинского заболевания (например, имеющие в семейной истории состояния, факторы образа жизни, указывающие на риск для состояния и т.д.).

Лимфоциты. Тип белых кровяных клеток, участвующих в иммунной защите организма. Существует два основных вида лимфоцитов: В-клетки и Т-клетки.

Главного Комплекса Гистосовместимости ("ГКГС"). Общее определение предназначено для охвата систем антигена гистосовместимости, описанные у разных видов, включая человеческие лейкоцитарные антигены ("HLA").

Млекопитающее. Этот термин включает в себя как человека, так и нечеловеческих млекопитающих. Аналогичным образом, термин "субъект" включает в себя как человеческие, так и ветеринарные субъекты.

Открытая рамка считывания ("ORF"). Серия нуклеотидных кодонов после эукариотического стартового кодона (ATG), определяющая ряд аминокислот без каких-либо внутренних кодонов терминации, которые могут быть транслированы для получения полипептида, или серии нуклеотидов без каких-либо внутренних кодонов терминации, способные к транскрипции для получения молекулы РНК, такой как, например, рибосомальная РНК (рРНК) или транспортная РНК (тРНК).

Функционально связаны. Первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор находится в положении, когда он может направлять транскрипцию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, в случае необходимости, для объединения двух белок-кодирующих участков, в той же рамке считывания.

Фармацевтически приемлемые носители. Термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически подходящий носитель" и тому подобное, как используется в данном документе, относятся к фармацевтическим наполнителям, например, фармацевтическим, физиологическим, приемлемым органическим или неорганическим веществам-носителям, пригодным для энтерального или парентерального применения, которые не реагируют вредным образом с экстрактом. Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), описывает композиции и составы с использованием обычных фармацевтически приемлемых носителей, пригодных для введения векторов и композиций, раскрытых в данном документе. Как правило, природа используемого носителя зависит от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное, в качестве несущей среды. Для твердых композиций (например, порошков, пилюль, таблеток или капсул), обычные нетоксичные твердые носители содержат, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, или стеарата магния.

Фармацевтические композиции могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, рН-буферные вещества и тому подобные, такие как, например, ацетат натрия или сорбитанмонолаурат.

"Фармацевтически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество", "эффективное количество". Используемые в данном документе термины (и родственные им) относятся к количеству, которое приводит к желаемому фармакологическому и/или физиологическому эффекту для заданного условия (например, медицинское состояние, болезнь, инфекция, или расстройство), или к одному или более его симптомов, и/или полностью или частично предотвращает возникновение состояния или его симптома, и/или может быть терапевтическим в условиях частичного или полного излечения для

состояния и/или неблагоприятного воздействия, обусловленного состоянием. "Фармацевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" будет варьировать в зависимости от вводимой композиции, вылеченного/предотвращенного состояния, тяжести состояния, подлежащего лечению или предотвращению, возраста и относительного здоровья личности, пути и формы введения, суждения лечащего врача или ветеринара, а также других факторов оцененных специалистом в данной области с учетом принципов, предусмотренных в данном документе.

Полинуклеотид; нуклеиновая кислота. Термин "полинуклеотид" относится к полимеру нуклеиновой кислоты по меньшей мере 300 оснований в длину, состоящей из рибонуклеотидов (т.е., РНК) или дезоксирибонуклеотидов (т.е., ДНК или кДНК) и способной или не способной к кодированию полипептида или белка. Термин включает в себя одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Полипептид или белок. Термин "полипептид" или "белок" относится к полимеру по меньшей мере 100 аминокислот длиной, как правило, больше, чем 30 аминокислот в длину.

Поксвирус. Термин "поксвирус" относится к любому из двух подсемейств семейства *Poxviridae*: *Chordoroxvirinae* и *Entomoroxvirinae*. Члены подсемейства *Chordoroxvirinae* инфицируют позвоночных. Члены подсемейства *Entomoroxvirinae* инфицируют насекомых (т.е., беспозвоночных). Термин "поксвирус" также относится к членам любого рода *Chordoroxvirinae* (например, авипоксвирусы, вирусы оспы овец, лепорипоксвирусы, вирусы контагиозного моллюска, ортопоксвирусы, парапоксвирус, вирус оспы свиней, и ятапоксвирусы), включая четыре из тех, которые могут инфицировать человека (ортопоксвирусы, парапоксвирусы, ятапоксвирусы и вирусы контагиозного моллюска), продуктивно или нет, но предпочтительно ортопоксвирус и/или авипоксвирусы. Термин "поксвирус" также относится к членам любого из рода *Entomoroxvirinae* (например, альфа-энтомопоксвирусы, бета-энтомопоксвирусы, и гамма-энтомопоксвирусы).

Авипоксвирусы оспы кур включают вирус канареек, вирус птичьей оспы, вирус оспы майна, вирус оспы голубей, и вирус оспы перепелки. Вирусы оспы овец включают вирусы оспы овец, вирусы оспы коз, и вирус нодулярного дерматоза. Лепорипоксвирусы включают вирус миксомы, вирус фибромы Шопе (также известный как вирус фибромы кроликов), вирус фибромы зайца, и вирус фибромы белки. Вирус контагиозного моллюска включает вирус *Molluscum contagiosum*. Ортопоксвирусы включают вирус оспы буйвола, вирус оспы верблюдов, вирус коровьей оспы, вирус экстремелии, вирус оспы обезьян, вирус оспы енота, вирус натуральной оспы (также известна, как вирус натуральной оспы), и вирус осповакцины. Термин "осповакцина" относится как к дикому типу вируса осповакцины, так и к любым различным аттенуированным штаммам или изолятам, изолированным впоследствии, включая, например, вирус осповакцины-Western Reserve, вирус осповакцины-Копенгаген, *Dryvax* (также известный как вирус осповакцины-Wyeth), ACAM2000, хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара (CVA), модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), и модифицированный вирус осповакцины Ankara-Bavarian Nordic ("MVA-BN"). Вирусы орфа включают вирус папулезного стоматита крупного рогатого скота, вирус ORF, вирус орфа новозеландского красного оленя, и вирус паравакцины. Вирусы оспы свиней включают вирус оспы свиней. Ятапоксвирусы включают танапокс вирус и вирус опухоли обезьяны яба.

Термин "Модифицированный Вирус Осповакцины Анкара" или "MVA" относится к вирусу, генерируемому с помощью более 570 серийных пассажей дермальной осповакцины штамма Анкара [Хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара (CVA); для обзора см. Maug и др., (1975), *Infection* 3:6-14] на фибробластах куриного эмбриона. CVA поддерживался в Институте вакцинации, Анкара, Турция, на протяжении многих лет и используется в качестве основы для вакцинации людей. Однако из-за частых тяжелых поствакцинальных осложнений, связанных с вирусами осповакцины, было предпринято несколько попыток создания более ослабленных, безопасных вакцин против оспы.

В период с 1960 по 1974, проф. Антон Майр преуспел в аттенуировании CVA с помощью более чем 570 непрерывных пассажей в CEF клетках [Maug et al. (1975)]. Было показано на различных моделях животных, что в результате MVA был авирулентен [Maug, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41:225-234]. В рамках ранней разработки MVA в качестве предварительной вакцины против оспы, были проведены клинические испытания с использованием MVA-517 в сочетании с *Lister Elstree* [Stickl (1974), *Prev. Med.* 3:97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munich Med. Wochenschr.* 113:1149-1153] у пациентов с высоким риском побочных реакций от вакцин. В 1976, MVA, полученный от посевного материала MVA-571 (что соответствует 571^{my} пассажи), был зарегистрирован в Германии в качестве праймера вакцины в двухступенчатой программе парентеральной вакцинации против оспы. В последствии MVA-572 использовался у примерно 120000 европейских индивидуумов, большинство дети от 1 до 3 лет, без каких-либо зарегистрированных серьезных побочных эффектов, хотя многие из субъектов среди населения были с высоким риском развития осложнений, связанных с вирусом осповакцины (Maug et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572 был сдан на хранение в Европейскую коллекцию клеточных культур животных как ECACC V94012707.

В результате пассирования, использованного для аттенуирования MVA, существует целый ряд различных штаммов или изолятов, в зависимости от количества пассажей в клетках CEF. Например, MVA-572 был использован в Германии во время программы ликвидации оспы, а MVA-575 был широко использован в качестве ветеринарной вакцины. MVA-575 был сдан на хранение 7 декабря 2000 года в Ев-

ропейскую коллекцию клеточных культур животных (ECACC) с депозитарным номером V00120707. Атенуированный CVA-вирус MVA (модифицированный вирус осповакцины Анкара) был получен путем последовательного размножения (более чем 570 пассажей) CVA на первичных фибробластах куриных эмбриональных.

Хотя Майер и его коллеги продемонстрировали в течение 1970-х, что MVA сильно аттенуирован и авирулентен в организме человека и млекопитающих, некоторые исследователи сообщали, что MVA не полностью аттенуирован в клеточных линиях млекопитающих и человека, так как в этих клетках может происходить остаточная репликация [Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211; U.S. Patent No. 5185146; Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569]. Считается что результаты, представленные в этих публикациях, были получены с использованием различных известных штаммов MVA, поскольку используемые вирусы в основном отличаются своими свойствами, особенно в их ростовом поведении в различных клеточных линиях. Такая остаточная репликация является нежелательной по разным причинам, в том числе проблемам безопасности в связи с использованием в организме человека.

Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности для разработки безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были разработаны Bavarian Nordic: MVA был дополнительно пассирован Bavarian Nordic и обозначен MVA-BN. MVA, а также MVA-BN не хватает примерно 13% (26,6 kb в основном из шести регионов) генома по сравнению с родственным CVA вирусом. Делеции влияют на ряд вирулентности и спектр генов хозяина, а также гены, необходимые для формирования тела включения типа А. Образец MVA-BN, соответствующий пассажи 583 был сдан на хранение 30 августа, 2000 года в Европейскую коллекцию клеточных культур (ECACC) под номером V00083008.

MVA-BN можно прикрепить и ввести в человеческие клетки, где вирусно-кодируемые гены экспрессируются очень эффективно. Тем не менее, сборка и высвобождение потомства вируса не происходит. MVA-BN сильно адаптирован к клеткам фибробластов первичного куриного эмбриона (CEF) и не размножается в клетках человека. В клетках человека, вирусные гены экспрессируются, и образуется не инфекционный вирус. MVA-BN классифицируется как организм уровня биологической безопасности 1 по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний в Соединенных Штатах. Препараты MVA-BN и производные были введены многим типам животных, а также более 4000 человеческих субъектов, в том числе иммунодефицитным лицам. Все прививки оказались в целом безопасны и хорошо переносились. Несмотря на высокое аттенуирование и снижение вирулентности в доклинических исследованиях было показано, что MVA-BN вызывает как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы 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, проявляющим по существу те же самые репликационные характеристики как MVA, описанный в данном документе, но проявляющие различия в одной или нескольких частях их геномов. MVA-BN, а также производное, или вариант MVA-BN не может репродуктивно реплицироваться в естественных условиях в организме человека и мышей. Более конкретно, MVA-BN, или производное, или вариант MVA-BN имеют также, преимущественно, способность к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не имеют возможности репродуктивной репликации в клеточной линии HaCat кератиноцитов человека [Boukamp et al (1988), *J. Cell. Biol.* 106: 761-771], клеточной линии 143В остеосаркомы костей человека (ECACC № 91112502), клеточной линии 293 почки эмбриона человека (ECACC № 85120602), и клеточной линии HeLa аденокарциномы шейки матки человека (ATCC № CCL-2). Кроме того, производное или вариант MVA-BN имеют коэффициент амплификации вируса по меньшей мере, в два раза меньше, более преимущественно, в три раза меньше, чем MVA-575 в линиях клеток HeLa и клеток HaCaT. Испытания и анализ этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 (США 2003/0206926) и WO 03/048184 (США 2006/0159699), оба включены в данный документ посредством ссылки.

Амплификация и репликация вируса, как правило, выраженные как отношение вируса, полученного из инфицированной клетки (выход) к количеству первоначально использованного для инфицирования клетки, в первую очередь (вход) упоминается как "коэффициент амплификации". Коэффициент амплификации "1" определяет состояние амплификации, где количество вируса, полученного из инфицированных клеток, является таким же, как количество, первоначально использованного для инфицирования клеток, а это означает, что инфицированные клетки допускают инфицирование вирусом и размножение. В отличие от этого, коэффициент амплификации меньше чем 1, т.е., снижение выхода по сравнению с уровнем входа, указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, аттенуирование вируса.

Преимущества вакцины на основе MVA включает их профиль безопасности, а также пригодность для крупномасштабного производства вакцины. Доклинические испытания показали, что MVA-BN демонстрирует превосходное аттенуирование и эффективность по сравнению с другими штаммами MVA

(WO 02/42480). Дополнительным свойством штаммов MVA-BN является способность индуцировать в значительной степени один и тот же уровень иммунитета в режимах прайм вируса осповакцины/буст вируса осповакцины, когда сравнивают с режимами прайм ДНК/буст вируса осповакцины.

Рекомбинантные вирусы MVA-BN наиболее предпочтительного варианта осуществления изобретения, описанного в данном документе, считаются безопасными из-за их отчетливого дефекта репликации в клетках млекопитающих и их устойчивой авирулентности. Кроме того, в дополнение к своей эффективности, целесообразность производства в промышленном масштабе может быть выгодной. Кроме того, вакцины на основе MVA могут доставить несколько гетерологичных антигенов и обеспечивают одновременно индукцию гуморального и клеточного иммунитета.

В другом аспекте, вирусным штаммом MVA, подходящим для генерирования рекомбинантного вируса может быть штамм MVA-572, MVA-575 или любой подобный аттенуированный штамм MVA. Также подходящим может быть MVA мутант, такой как удаленный хориоаллантаоисный вирус осповакцины Анкара (dCVA). DCVA включает в себя шесть делеции участков генома MVA, упоминающиеся как делеция I (del I), делеция II (del II), делеция III (del III), делеция IV (del IV), делеция V (del V), и делеция VI (del VI). Сайты делеции особенно полезны для вставки нескольких гетерологичных последовательностей. DCVA может репродуктивно реплицироваться (с коэффициентом амплификации более 10) в клеточной линии человека (таких как клеточные линии человека 293, 143B, и MRC-5), которая затем запускает оптимизацию с помощью дальнейшей мутации или ослабления полезной для основанной на вирусе стратегии вакцинации (см., например, WO 2011/092029).

"Прайм-буст вакцинация". Термин "Прайм-буст вакцинация" относится к стратегии вакцинации, использующей первую примированную инъекцию вакцины, нацеленную на специфический антиген, следующую с интервалами одну или более бустерную инъекцию того же самого вакцинационного антигена. Прайм-буст вакцинация может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к модальности вакцины (РНК, ДНК, белок, вектор, вирусоподобные частицы), доставляющей вакцинный антиген. В гомологичной прайм-буст вакцинации используется вакцина, содержащая те же иммуноген и вектор для как для примированной инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций. В гетерологичной прайм-буст вакцинации используется вакцина, содержащая тот же иммуноген как для примированной инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций, но разные векторы для примированной инъекции и для одной или более бустерных инъекций. Например, в гомологичной прайм-буст вакцинации может использоваться вектор MVA, содержащий нуклеиновые кислоты, экспрессирующие иммуноген и TRICOM как для примированной инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций. Напротив, в гетерологичной прайм-буст вакцинации может использоваться вектор MVA, содержащий нуклеиновые кислоты, экспрессирующие иммуноген и TRICOM для примированной инъекции и вектор вируса оспы кур, содержащий нуклеиновые кислоты, экспрессирующие иммуноген и TRICOM для одной или более бустерных инъекций. Гетерологичная прайм-буст вакцинация также охватывает различные комбинации, такие как, например, использование плазмиды, кодирующей иммуноген в примированной инъекции, и использование вектора поксвируса, кодирующего тот же иммуноген в одной или более бустерных инъекциях, или использование рекомбинантного белка иммуногена в примированной инъекции и использование плазмиды или вектора поксвируса, кодирующих тот же белок иммуногена в одной или более бустерных инъекциях.

Рекомбинанты; рекомбинантная нуклеиновая кислота; рекомбинантный вектор; рекомбинантный поксвирус. Термин "рекомбинантный", применяется к нуклеиновой кислоте, вектору, поксвирусу и тому подобному, относящемуся к нуклеиновой кислоте, вектору или поксвирусу, сделанным с помощью искусственной комбинации двух или более противоположных гетерологичных сегментов последовательности нуклеиновой кислоты, или нуклеиновой кислоты, вектора или поксвируса, содержащих такую искусственную комбинацию двух или более противоположных гетерологичных сегментов последовательности нуклеиновой кислоты. Искусственная комбинация наиболее часто выполняется с помощью искусственной манипуляции изолированных сегментов нуклеиновых кислот, с использованием устоявшихся методов генной инженерии.

Идентичность последовательности. Термин "идентичность последовательности" означает степень идентичности между последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислоты. Идентичность последовательностей часто измеряется в терминах процента идентичности (часто описывается как "сходство" или "гомология" последовательности). Чем выше процент идентичности последовательности, тем больше похожи две последовательности. Гомологи или варианты белка иммуногена будут иметь относительно высокую степень идентичности последовательности при выравнивании с помощью стандартных способов.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в технике. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith и Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Higgins и Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins и Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet и др., Nucl. Acids Res. 16:10881, 1988; и Pearson и Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444, 1988. Кроме того, Altschul и др., Nature Genet. 6:119, 1994, представляют собой детальное рассмотрение способов выравнивания последовательностей и вычисления гомологий. Средство поиска ос-

новного локального выравнивания NCBI (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990) можно получить из нескольких источников, в том числе от Национального центра биотехнологической информации (NCBI, Бетесда, Мэриленд; см. также <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), для использования в связи с программами для анализа последовательностей blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx.

Гомологи и варианты белка иммуногена как правило, имеют по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности при выравнивании в полную длину с аминокислотной последовательностью иммуногена дикого типа, подготовленного с NCBI Blast v2.0, с использованием blastp с установленными значениями параметров по умолчанию. Для сравнения аминокислотных последовательностей из более чем около 30 аминокислот, использовалась функция последовательностей Blast 2, с использованием матрицы BLOSUM62 по умолчанию, с установленными значениями параметров по умолчанию (наличие зазора стоит 11, и на остаток зазора стоит 1).

Субъект. Живые многоклеточные позвоночные организмы включая, например, человека, нечеловеческих млекопитающих и птиц. Термин "субъект" может использоваться взаимозаменяемо с терминами "млекопитающее" или "животное" в данном документе.

Т-клетка. Лимфоцит или белая кровяная клетка, необходимая для адаптивного иммунного ответа. Т-клетки включают, но не ограничиваются ими, CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки. CD4⁺ Т-клетка представляет собой иммунную клетку, которая несет маркер на своей поверхности, известный как "кластер дифференцировки 4" ("CD4"). Эти клетки, известные как Т-хелперы, помогают организовать иммунный ответ, включая ответы антитела и CTL. CD8⁺ Т-клетки несут маркер "кластера дифференцировки 8" ("CD8"). CD8⁺ Т-клетки включают в себя как CTL, CTL памяти, и супрессорные Т-клетки.

Терапевтически активный полипептид. Агент, состоящий из аминокислот, таких как белок, который индуцирует биологический эффект и/или адаптивный иммунный ответ, измеряемый с помощью клинического ответа (например, увеличение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, или В-клеток, увеличение уровня экспрессии белка, значительное сокращение размера опухоли или уменьшение количества метастазов). Терапевтически активные молекулы могут быть изготовлены также из нуклеиновых кислот, таких как, например, вектор поксвируса, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или белок иммуногена функционально связанный с последовательностью, контролирующей экспрессию.

Терапевтически эффективное количество.

"Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество композиции или клетки, достаточное для достижения желаемого терапевтического или клинического эффекта у субъекта, подлежащего лечению. Например, терапевтически эффективное количество вектора поксвируса, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или белок иммуногена, функционально связанную с последовательностью, контролирующей экспрессию, будет количеством, достаточным для вызова биологического ответа или антиген-специфического иммунного ответа или, для уменьшения или устранения клинических признаков или симптомов инфекции или другого заболевания у пациента или популяции пациентов, имеющих заболевание или расстройство. Терапевтически эффективное количество векторов поксвируса и композиции, содержащие векторы поксвируса, представленные в данном документе, представляют собой количество, достаточное, чтобы поднять иммунный ответ на клетки, экспрессирующие антиген-мишень. Иммунный ответ должен быть достаточной величины, чтобы уменьшить или устранить клинические признаки или симптомы заболевания у пациента или популяции пациентов, имеющих целевое расстройство.

Трансдуцированный или трансформированный. Термин "трансдуцированный" или "трансформированный" относится к клетке, в которую рекомбинантная нуклеиновая кислота была введена с помощью стандартных способов молекулярной биологии. Как используется в данном документе, термин "трансдукция" охватывает все техники, с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в такие клетки, включающие инфекции с вирусными векторами, трансформацию с векторами плазмиды и введение "голой" ДНК электропорацией, липофекцией, или запуском генной пушкой.

TRICOM. Триада Костимулирующих Молекул состоит из B7-1 (также известна как CD80), внутриклеточные молекулы адгезии-1 (ICAM-1, также известна как CD54) и лимфоцита функционально-ассоциированного антигена-3 (LFA-3, также известна как CD58), обычно включаемые в рекомбинантные вирусные векторы (например, поксвирусные векторы), экспрессирующие специфический антиген с целью повышения антиген-специфического иммунного ответа. Отдельные компоненты TRICOM могут находиться под контролем одного или разных промоторов и могут быть представлены на том же векторе со специфическим антигеном или на отдельном векторе. Иллюстративные векторы раскрыты, например, в Hodge и др., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation", Cancer Res. 59:5800-5807 (1999) и Патенте США № 7211432 B2, оба из которых включены в данный документ путем ссылки.

Вектор. Носитель, вводят молекулу интересующей нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в результате чего получают трансдуцированную или трансформированную клетку-хозяина.

Векторы, как правило, содержат последовательности нуклеиновых кислот, позволяющие им реплицироваться в клетке-хозяине, такие как сайт инициации репликации, а также один или несколько селективных маркерных генов, контролирующих экспрессию последовательностей, последовательность узна-

вания эндонуклеазы рестрикции, последовательности праймера и различных других генетических элементов, известных в данной области. Обычно используемые типы векторов включают плазмиды для экспрессии в бактериях (например, *E. coli*) или дрожжах (например, *S. cerevisiae*), челночные векторы для конструирования рекомбинантных поксвирусов, космиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, и вирусные векторы. Вирусные векторы включают векторы поксвируса, векторы ретровируса, векторы аденовируса, векторы вируса герпеса, векторы бакуловируса, векторы вируса Синдбис, и векторы полиовируса, среди других.

Векторы поксвируса включают, но не ограничиваются ими ортопоксвирусы, авипоксвирусы, парапоксвирусы, ятапоксвирусы и вирусы контагиозного моллюска, но предпочтительно ортопоксвирусы и/или авипоксвирусы, как определено выше более подробно. Ортопоксвирусы включают вирус натуральной оспы (также известный как вирус натуральной оспы), вирус осповакцины, вирус коровьей оспы и вирус оспы обезьян. Авипоксвирусы оспы кур включают вирус канареек и вирус птичьей оспы. Термин "вирус осповакцины" относится как к дикому типу вируса осповакцины, так и к любому из различных аттенуированных штаммов или изолятов, выделенных позднее, включая, например, вирус осповакцины-Western Reserve, вирус осповакцины-Копенгаген, Дрyвах (также известный как вирус осповакцины-Wyeth), ACAM2000, модифицированный вирус осповакцины Анкара ("MVA"), и модифицированный вирус осповакцины Ankara-Bavarian Nordic ("MVA-BN").

Рекомбинантные поксвирусы

В одном аспекте, представленные в данном документе рекомбинантные поксвирусы содержат гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие ранние двухцепочечные РНК (дцРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные поксвирусы содержат гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие избыток дцРНК в течение 1 или 2 часов постинфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленные в данном документе рекомбинантные поксвирусы, содержат гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие раннюю или избыточную дцРНК до начала репликации генома указанного рекомбинантного поксвируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантные поксвирусы, содержат гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие раннюю дцРНК в течение 1 или 2 ч постинфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантные поксвирусы могут состоять из одной гетерологичной нуклеиновой кислоты, от которой обе нити транскрибируются для генерации ранней дцРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные поксвирусы могут состоять из дополнительных промоторов, направляющих раннюю антисмысловую транскрипцию ранних транскрибируемых природных генов поксвируса, тем самым экспрессируя раннюю дцРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные поксвирусы генерируют раннюю дцРНК дополнительно содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный ассоциированный с болезнью антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более костимулирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или более костимулирующих молекул представляют собой TRICOM (т.е., B7-1, ICAM-1 и LFA-3). В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием или опухоли-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой антиген инфекционного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген инфекционного заболевания представляет собой вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген или антиген паразита.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген инфекционного заболевания представляет собой вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный антиген является полученным от вирусов, выбранных из группы, состоящей из аденовируса, вируса Коксаки, Конго-Крымского вируса геморрагической лихорадки, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса денге, вируса Эбола, вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса Гуанарито, вируса простого герпеса-типа 1 (HSV-1), вируса простого герпеса-типа 2 (HSV-2), герпесвируса человека-типа 8 (HHV-8), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV), вируса гепатита Е (HEV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гриппа, вируса Хунина, Ласса вируса, вируса Мачупо, вируса Марбург, вируса кори, человеческого метапневмовируса, вируса паротита, вируса Норуолк, вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса парагриппа, парвовируса, вируса полиомиелита, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса (РСВ), риновируса, ротавируса, вируса краснухи, вируса Сабиа, вируса тяжелого острого респираторного синдрома (атипичная пневмония), вируса ветряной оспы, вируса натуральной оспы, вируса Западного Нила и вируса желтой лихорадки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген инфекционного заболевания представляет собой бактериальный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, бактериальный антиген представляет собой полученный из бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomytila psittaci*, *Clostrid-*

ium botulinum, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, энтеротоксигенной *Escherichia coli*, энтеропатогенной *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 157:H7, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenza*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, и *Yersinia pestis*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген инфекционного заболевания представляет собой грибковый антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения грибковый антиген представляет собой полученный из грибов, выбранных из группы, состоящей из *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium canis*, *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Stachbotrys chartarum*, *Tinea barbae*, *Tinea captitis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea faciei*, *Tinea incognito*, *Tinea nigra*, *Tinea versicolor*, *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton tonsurans*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген инфекционного заболевания представляет собой паразитарный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген паразита представляет собой полученный из паразита, выбранный из группы, состоящей из *Anisakis spp.*, *Babesia spp.*, *Baylisascaris procyonis*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayentanensis*, *Diphyllobothrium spp.*, *Dracunculus medinensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Taenia spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, и *Trypanosoma cruzi*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль-ассоциированный антиген представляет собой выбранный из группы, состоящей из 5- α -редуктазы, α -фетопротейна (АФП), AM-1, АПК, April, гена антигена меланомы В (BAGE), β -катенина, Bcl12, bcr-abl, Brachyury, CA-125, каспазы-8 (CASP-8, также известная как FLICE), Cathepsins, CD19, CD20, CD21/комплементарного рецептора 2 (CR2), CD22/BL-CAM, CD23/F_cRII, CD33, CD35/комплементарного рецептора 1 (CR1), CD44/PGP-1, CD45/общего антигена лейкоцитов (LCA), CD46/мембранного кофактора белка (MCP), CD52/CAMPATH-1, CD55/фактора ускорения распада (DAF), CD59/протектина, CDC27, CDK4, карциноэмбрионального антигена (CEA), с-мус, циклооксигеназы-2 (cox-2), удаленного при колоректальном раке гена (DCC), DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, фарнезилтрансферазы, фактора роста фибробластов-8a (FGF8a), фактора роста фибробластов-8b (FGF8b), FLK-1/KDR, рецептора фолиевой кислоты, G250, антигена семейства генов меланомы G (GAGE-семейство), гастрин 17, гастрин-высвобождающего гормона, ганглиозида 2 (GD2)/ганглиозида 3 (GD3)/ганглиозид-моносиаловой кислоты-2 (GM2), гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH), UDP-GlcNAc:R₁Man(α 1-6)R₂ [GlcNAc to Man(α 1-6)]; β 1,6-N-ацетилглюкозаминтрансферазы V (GnT V), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/тирозин-связанного белка-1 (gp75/TRP-1), хорионического гонадотропина человека (ХГ), гепариназы, Her2/neu, вируса опухоли молочной железы человека (HMTV), белка теплового шока 70 килодальтон (HSP70), обратной транскриптазы теломеры человека (hTERT), рецептора-1 инсулино-подобного фактора роста (IGFR-1), рецептора интерлейкина-13 (IL-13R), индуцибельной синтазы окиси азота (iNOS), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, антиген-кодирующего гена меланомы 1 (MAGE-1), антиген-кодирующего гена меланомы 2 (MAGE-2), антиген-кодирующего гена меланомы 3 (MAGE-3), антиген-кодирующ его гена меланомы 4 (MAGE-4), маммаглобина, MAP17, Мелан-А/антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками-1 (MART-1), мезотелина, MIC A/B, MT-MMPs, муцина, семенник-специфического антигена NY-ESO-1, остеонектина, p15, P170/MDR1, p53, p97/меланотрансферрина, PAI-1, тромбоцитарного фактора роста (ТРФ), μ РА, PRAME, пробасина, прогенопоэтина, простат-специфического антигена (PSA), простат-специфического антигена мембраны (PSMA), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSSX-семейства, STAT3, STn, TAG-72, трансформирующего фактора роста-альфа (TGF- α), трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β), Тимозин-бета-15, фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α), TP1, TRP-2, тирозиназы, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ZAG, p16INK4, и глутатион-s-трансферазы (GST).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус является членом подсемейства Chordoroxvirinae или подсемейства Entomoroxvirinae. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус является членом подсемейства Chordoroxvirinae. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус является членом рода Chordoroxvirinae, выбранным из группы, состоящей из вируса оспы кур, вируса оспы овец, вируса миксомы, вируса контактиозного моллюска, ортопоксвирус, вируса орфа, вируса оспы свиней, и вируса оспы Тана и Яба. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой

вирус оспы кур. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус оспы кур является выбранным из группы, состоящей из вируса оспы канареек, вируса птичьей оспы, вируса оспы майна, вируса оспы голубей, и вируса оспы перепелки. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус оспы овец. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус оспы овец является выбранным из группы, состоящей из вируса оспы овец, вируса оспы коз и вируса нодулярного дерматоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус миксомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус миксомы является выбранным из группы, состоящей из вируса миксомы, вируса фибромы Shope (также известного как вирус фибромы кроликов), вируса фибромы зайца, и вируса фибромы белки. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус контагиозного моллюска. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус контагиозного моллюска является вирусом *Molluscum contagiosum*. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой ортопоксвирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения ортопоксвирус является выбранным из группы, состоящей из вируса оспы буйволов, вируса оспы верблюдов, вируса оспы коров, вируса экстремелии, вируса оспы обезьян, вируса оспы енота, вируса натуральной оспы (также известной как вирус натуральной оспы), и вируса осповакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения ортопоксвирус представляет собой вирус осповакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус осповакцины является выбранным из группы, состоящей из вируса осповакцины-Western Reserve, вируса осповакцины-Копенгаген, Dryvax (также известного как вирус осповакцины-Wyeth), ACAM2000, хориоаллантаоисного вируса осповакцины Анкара ("CVA"), модифицированного вируса осповакцины Анкара ("MVA"), и модифицированного вируса осповакцины Анкара-Bavarian Nordic ("MVA-BN"). В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус орфа. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус орфа является выбранным из группы, состоящей из вируса папулезного стоматита крупного рогатого скота, вируса ORF, вируса орфа новозеландского красного оленя, и вируса паровакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус оспы свиней. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус оспы свиней представляет собой вирус оспы свиней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный поксвирус представляет собой вирус оспы Тана и Яба. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусы оспы Тана и Яба являются выбранным из группы, состоящей из танапоксвируса и вируса опухоли обезьяны яба.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие раннюю дцРНК, содержат последовательности, кодирующие транскрипты комплементарной РНК, причем транскрипты комплементарной РНК отжигаются после транскрипции для получения дцРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, транскрипты комплементарной РНК содержат белок-кодирующие открытые рамки считывания (ORF) или небелок-кодирующие гены. В некоторых вариантах осуществления изобретения, транскрипты комплементарной РНК или транскрипты участков комплементарной РНК перекрываются 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, или 1000 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, транскрипты комплементарной РНК перекрываются более чем 50, более чем 100, более чем 150, более чем 200, более чем 250, более чем 300, более чем 350, более чем 400, более чем 450, более чем 500, более чем 550, более чем 600, более чем 650, более чем 700, более чем 750, более чем 800, более чем 850, более чем 900, более чем 950, или более чем 1000 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, транскрипты комплементарной РНК перекрываются между 100 и 1000, между 200 и 1000, между 300 и 1000, между 400 и 1000, между 500 и 1000, между 600 и 1000, между 700 и 1000, между 800 и 1000, между 900 и 1000, между 200 и 900, между 300 и 800, между 400 и 700, между 300 и 750, между 300 и 730 или между 500 и 600 нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеиновые кислоты транскрибированы в РНК с комплементарной нуклеиновой кислотой или комплементарной последовательностью, преимущественно на 50, 60, 70, 80, 90, 100% комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие транскрипты комплементарной РНК, содержат две комплементарные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарные последовательности разделены с помощью одного или более дополнительных вирусных генов или некомплементарной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения идентичные или очень похожие последовательности, кодирующие частично или полностью комплементарные транскрипты отделены с помощью необходимых вирусных генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие транскрипты комплементарной РНК, содержат две комплементарные последовательности на отдельных транскриптах или нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая матричная РНК (мРНК) является транскрибированной от одной комплементарной последовательности и антисмысловая мРНК является транскрибированной от другой комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая матричная РНК (мРНК) является транскрибированной от одной из двух идентичных или очень похожих последовательностей и анти-

смысловая мРНК является транскрибированной от другой идентичной или очень похожей последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия последовательностей, кодирующих перекрывающиеся транскрипты комплементарной РНК, направляется на один или более поксвирусных промоторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более поксвирусных промоторов представляет собой ранний промотор или немедленно-ранний промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипт комплементарной РНК или участок транскрипта РНК состоит из нуклеотидов на разных молекулах нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарные участки транскриптов РНК состоят из нуклеиновых кислот отличных от миРНК или коротких фрагментов секвенирования комплементарных транскриптов РНК, таких как, например, от 21 до 23 пар оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поксвирусный промотор представляет собой ранний промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения ранний промотор является выбранным из группы, состоящей из Pr7,5 промотор, и PrS промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения поксвирусный промотор представляет собой немедленно-ранний промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения немедленно-ранний промотор является выбранным из группы, состоящей из промотора I3L, промотора 30K, промотора 40K, PrHyb промотора, PrS5E промотора, Pr4LS5E промотора, и Pr13,5-длинного промотора.

Композиции

В другом аспекте представленные в данном документе иммуногенные композиции содержат любые рекомбинантный поксвирусы, содержащие гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие двухцепочечные РНК (дцРНК), представленные в данном документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуногенные композиции содержат любые рекомбинантные поксвирусы, содержащие гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие дцРНК, представленные в данном документе, и дополнительно содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей любые гетерологичные ассоциированные с заболеванием антигены, представленные в данном документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В другом аспекте представленными в данном документе являются фармацевтические композиции, содержащие любой из рекомбинантных поксвирусов, содержащий гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие раннюю двухцепочечную РНК (дцРНК), представленную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, содержащие любой из рекомбинантных поксвирусов, содержащий гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие дцРНК, представленные в данном документе, и, дополнительно содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любые гетерологичные ассоциированные с заболеванием антигены, представленные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Рекомбинантные поксвирусы, используемые для подготовки иммуногенных композиций и фармацевтических композиций, представленных в данном документе, содержат суспензию или раствор рекомбинантных поксвирусных частиц с концентрацией в диапазоне от 10^4 до 10^9 TCID₅₀/мл, от 10^5 до 5×10^8 TCID₅₀/мл, от 10^6 до 10^8 TCID₅₀/мл, или от 10^7 до 10^8 TCID₅₀/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции изготовлены в виде единичных доз, содержащих от 10^6 до 10^9 TCID₅₀, или содержащих 10^6 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀, 10^8 TCID₅₀ или 5×10^8 TCID₅₀. Рекомбинантные поксвирусы, раскрытые в данном документе, представлены в физиологически приемлемой форме основанной, например, на опыте в подготовке поксвирусных вакцин, используемых для вакцинации против натуральной оспы, как описано Н. Stickl и др., Dtsch. med. Wschr. 99:2386-2392 (1974). Например, очищенные поксвирусы могут храниться при -80°C в титре 5×10^8 TCID₅₀/мл, приготовленном в около 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, при pH 7,7. В некоторых вариантах осуществления изобретения, поксвирусные препараты, например, 10^2 - 10^8 или 10^2 - 10^9 поксвирусных частиц, могут быть лиофилизированы в 100 мл раствора фосфатного буфера (PBS) в присутствии 2% (м/о) пептона и 1% (м/о) человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и сохранены в ампуле, сделанной из стекла или другого подходящего материала.

Кроме того, лиофилизированные препараты поксвирусных частиц могут быть получены путем ступенчатой сублимационной сушки суспензии поксвирусных частичек, приготовленных в растворе таком как, например, 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, при pH 7,7, или PBS плюс 2% (м/о) пептон и 1% (м/о) ЧСА. В некоторых вариантах осуществления изобретения раствор содержит одну или более дополнительных добавок, таких как маннит, декстран, сахар, глицин, лактозу или поливинилпирролидон. В некоторых вариантах осуществления изобретения раствор содержит другие добавки, такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, человеческий сывороточный альбумин, или ЧСА) пригодные для введения *in vivo*. Растворы потом аликвотируют в соответствующих резервуарах для хранения, таких как, например, стеклянные ампулы, и герметизированные сосуды для хранения. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуногенные и/или фармацевтические композиции хранятся при температуре от 4°C до комнатной температуры несколько месяцев. В некото-

рых вариантах осуществления изобретения сосуда для хранения хранятся при температуре ниже -20°C , ниже -40°C , ниже -60°C или ниже -80°C .

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель состоит из одной или более добавок, антибиотиков, консервантов, адъювантов, разбавителей и/или стабилизаторов. Такими вспомогательными веществами могут быть вода, физиологический раствор, глицерин, этиловый спирт, смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные вещества и т.п. Как правило, природа используемого носителя зависит от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное, в качестве несущей среды. Подходящими носителями обычно являются крупные, медленно метаболизирующиеся молекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимерные аминокислоты, липидные агрегаты или т.п.

Способы и применения

В другом аспекте представленные в данном документе способы, повышающие активацию врожденного иммунитета, включающий введение любой из фармацевтических композиций или рекомбинантного поксвируса, представленного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом, где фармацевтическая композиция или рекомбинантный поксвирус повышают активацию врожденного иммунитета, при введении субъекту. В другом аспекте, представленном в данном документе, используются любые из фармацевтических композиций или рекомбинантный поксвирус, представленные в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики состояния опосредованного поксвирусом или опосредованного гетерологичным ассоциированным с заболеванием антигеном. В другом аспекте, представленном в данном документе, поксвирус или любая из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, применяются в качестве лекарственного средства. В другом аспекте, представленном в данном документе, есть поксвирусы любой из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, для использования в повышении врожденной иммунной активации или для лечения или предотвращения состояния, опосредованного поксвирусом или опосредованного гетерологичным ассоциированным с заболеванием антигеном. В другом аспекте, представленном в данном документе, является использование любой из фармацевтических композиций, представленные в данном документе, для лечения или предотвращения состояния опосредованного поксвирусом или опосредованного гетерологичным ассоциированным с заболеванием антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой позвоночное. В некоторых вариантах осуществления изобретения позвоночное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения млекопитающее представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения любые фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантный поксвирус, дополнительно содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген, представленный в данном документе, повышают врожденную иммунную активацию по сравнению с идентичной фармацевтической композицией, содержащей рекомбинантный поксвирус, с отсутствующей гетерологичной нуклеиновой кислотой, экспрессирующей избыточную раннюю дцРНК, при введении субъекту (будь то рекомбинантный поксвирус, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный ассоциированный с заболеванием антиген, или нет). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой позвоночное. В некоторых вариантах осуществления изобретения позвоночное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения млекопитающее представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения любые из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, вводят субъекту с помощью любого подходящего пути введения, известным или общепринятым специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции предоставлены в виде лиофилизата. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лиофилизат растворяют в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный раствор представляет собой физиологический раствор, раствор фосфатного буфера, или Трис буфер при физиологическом рН. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции вводят системно. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции вводят локально. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в данном документе, вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, интраназально, орально, наружно, парентерально или любым другим путем ведения, известным квалифицированному специалисту. Способ введения, дозы и протокол лечения может быть оптимизирован специалистами в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения любые из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, вводят субъекту в виде одной дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения любые из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, вводят субъекту в нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления изобретения любые из фар-

мацевтических композиций вводят субъекту в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более дозах. В некоторых вариантах осуществления изобретения любые из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, вводят в первой примирующей дозе с последующим введением одной или более дополнительных бустерных дозах (т.е., введенные с помощью протокола "прайм-буст" вакцинации). В некоторых вариантах осуществления изобретения протокол "прайм-буст" вакцинации представляет собой гомологичной протокол прайм-буст. В некоторых вариантах осуществления изобретения протокол "прайм-буст" представляет собой гомологичной протокол прайм-буст. В некоторых вариантах осуществления изобретения первая или примирующая доза включает фармацевтические композиции, представленные в данном документе, содержащие от 10^7 до 10^8 TCID₅₀ любых рекомбинантных поксвирусов, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая и последующие бустерирующие дозы, включает дозы любых из фармацевтических композиций, представленных в данном документе, содержащих от 10^7 до 10^8 TCID₅₀ любых рекомбинантных поксвирусов, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторую или бустерирующую дозу вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней после первой или примирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторую или бустерирующую дозу вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель после первой или примирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторую или бустерирующую дозу вводят 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после первой или примирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения последующие бустерирующие дозы вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней после первой бустерирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения последующие бустерирующие дозы вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель после первой бустерирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения последующие бустерирующие дозы вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более месяцев после первой бустерирующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения последующие бустерирующие дозы вводят 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после первой бустерирующей дозы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленный врожденный иммунный ответ включает в себя усиленную продукцию интерферонов типа I (ИФН тип I), цитокинов и хемокинов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленный врожденный иммунный ответ включает в себя усиленную продукцию ИФН типа I. В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленная продукция ИФН типа I включает в себя усиленную транскрипцию интерферона-бета (ИФН-β), кодирующегося матричной РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипция ИФН-β-кодирующей мРНК увеличивается по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленная продукция ИФН типа I включает в себя усиленную секрецию ИФН-β-белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения секреция ИФН-β-белка увеличивается по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция ИФН типа I включает усиленную транскрипцию интерферона-альфа (ИФН-α)-кодируемого мРНК, и увеличение транскрипции ИФН-α-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция ИФН типа I включает в себя усиленную секрецию ИФН-α белка, и увеличение секрецию ИФН-α белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция ИФН типа I включает в себя усиленную транскрипцию интерферона-гамма (ИФН-γ)-кодируемого мРНК, и увеличение транскрипции ИФН-γ-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция ИФН типа I включает в себя усиленную секрецию ИФН-γ белка, и увеличение секреции ИФН-γ белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленный врожденный иммунный ответ

включает в себя усиленную продукцию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция цитокинов включает в себя усиленную транскрипцию интерлейкина-6 (IL-6), кодируемого мРНК, и увеличение транскрипции IL-6-кодирующей мРНК по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция цитокинов включает в себя усиленную секрецию IL-6 белка и увеличение секреции IL-6 белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция цитокинов включает в себя усиленную транскрипцию интерлейкина-18 (IL-18)-кодируемого мРНК и увеличение транскрипции IL-18-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция цитокинов включает в себя усиленную секрецию IL-18 белка, и увеличение секреции IL-18 белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения усиленный врожденный иммунный ответ, включает в себя усиленную продукцию хемокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную транскрипцию CXCL1 кодируемого мРНК, и увеличение транскрипции CXCL1-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную секрецию CXCL1 белка, и увеличение секреции CXCL1 белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную транскрипцию CCL2 кодируемого мРНК, и увеличение транскрипции CCL2-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную секрецию CCL2 белка, и увеличение секреции CCL2 белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную транскрипцию CCL5-кодирующей мРНК, и увеличение транскрипции CCL5-кодирующей мРНК по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повышенная продукция хемокинов включает в себя усиленную секрецию CCL5 белка, и увеличение секреции CCL5 белка по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или более.

Примеры

Пример 1. CVA мутант с отсутствующим B15 и содержащий дополнительную нео^r кассету является сильно аттенуированным.

Мы определили сильно аттенуированного CVA мутанта с использованием системы рекомбинации на основании CVA генома, клонированного в качестве бактериальной искусственной хромосомы (BAC), причем нео^r/trpSL кассета служит положительной/отрицательной целью отбора во время мутагенеза CVA-BAC (Meisinger-Henschel et al., 2010). Вирус дикого типа CVA содержит вставку BAC контрольных последовательностей и дополнительные маркеры в межгеномном регионе между ORF I3L и I4L для обеспечения распространения циркулирующего генома, как BAC в бактерии. Эти последовательности включают нео-IRES-EGFP кассеты, экспрессированные под поксвирусным промотором pS. Ранее было продемонстрировано, что этот BAC-производный CVA имеет неотличимые свойства от дикого типа, клонирован-

ного с помощью метода бляшкообразования CVA (Meisinger, 2010). ВАС-производный CVA, поэтому считается неотличим от дикого типа CVA и упоминается как CVA дт в примерах ниже.

Как ни странно, мутант CVA, скрывающий нео/tpsL кассету выбора вместо B15R ORF (CVA-дцнео-ΔB15, см. фиг. 1), был сильно аттенуирован после интраназального инфицирования BALB/c мышей, в то время как CVA-ΔB15 делеционный мутант без нео/tpsL кассеты выбора был только незначительно аттенуирован (фиг. 2A). Даже после интраназальной инокуляции мышей дозой 5×10^7 TCID₅₀, CVA-дцнео-ΔB15 не вызывал заметного похудения (фиг. 2A и 2B) и никаких других симптомов болезни (данные не представлены), в то время как CVA дикого типа в основном летальный при этой дозе (фиг. 2A и 2B). Когда CVA версии B15R был заменен MVA версии B15R, аттенуирование последующего мутанта CVA-B15_{MVA} было также умеренным (фиг. 2B), и сравнимым с аттенуированием, наблюдаемым для CVA-ΔB15 (фиг. 2B). Белок B15, экспрессированный CVA-B15_{MVA}, мигрировал немного быстрее в SDS-PAGE, чем его гомолог CVA, подтверждая, что CVA-B15_{MVA} экспрессировал правильную версию B15, производного от MVA с недостатком 6 аминокислот (данные не представлены). Эти результаты согласуются с недавно опубликованным наблюдением, что версия B15 MVA, которая имеет внутреннюю делецию фрагмента из шести аминокислот, является нефункциональной (McCoy et al. (2010), J. Gen. Virol. 91:2216-2220). Таким образом, CVA-B15_{MVA} наиболее вероятно, представляет собой B15 ноль-мутант.

В качестве контроля для аттенуирования вируса осповакцины мы удалили ген B19R, кодирующий секретируемый ИФН типа I рецептор ортопоксвирусов. CVA-ΔB19 был немного более аттенуированным, чем CVA-ΔB15, но значительно меньше, чем аттенуированный CVA-дцнео-ΔB15 (фиг. 2B).

Инфекционные вирусные титры в легких мышей анализировали после интраназального инфицирования дозой 1×10^7 TCID₅₀. Мыши, инфицированные CVA-дцнео-ΔB15, показывали очень низкие вирусные титры менее чем 1×10^4 TCID₅₀ в легких на шестой день пост-инфекции, в то время как вирусные титры в легких CVA-инфицированных мышей превысили 1×10^7 TCID₅₀ (фиг. 2C, $p < 0,001$ Т-тест Стьюдента). Вирусные титры в легких мышей, инфицированных CVA-ΔB19 и CVA-B15_{MVA}, были снижены примерно на порядок ($p < 0,001$) по сравнению с теми CVA (фиг. 2C), отражая снижение, но все еще значительную патогенность этих вирусов (фиг. 2B). Таким образом, инфекционные титры вируса в легких после интраназального инфицирования очень хорошо коррелировали с наблюдаемой картиной патогенности CVA мутантов и подтвердили сильное аттенуирование CVA-дцнео-ΔB15.

Чтобы исключить нежелательные мутации в CVA-дцнео-ΔB15 как причину его сильного аттенуирования, мы определили нуклеотидные последовательности полных кодирующих участков CVA-дцнео-ΔB15 (202615 нуклеотидов) и CVA-ΔB15 (201296 нуклеотидов). Оба вируса содержали только ожидаемые мутации, которые были намеренно введены в их кодирующие участки. Таким образом, на удивление сильное аттенуирование CVA-дцнео-ΔB15, по-видимому, зависит от присутствия нео/tpsL кассеты.

Пример 2. Вирулентность CVA-дцнео-ΔB15 в ИФН-α/β рецепторе дефицитных мышей (INFAR^{0/0}).

Для исследования способствовала ли система ИФН типа I сильному аттенуированию CVA-дцнео-ΔB15 у мышей, INFAR^{0/0} мыши с отсутствующим функциональным рецептором ИФН α/β были инфицированы возрастающими дозами CVA и CVA-дцнео-ΔB15. При высокой дозе 5×10^7 TCID₅₀, CVA-дцнео-ΔB15 был одинаково смертельным для INFAR^{0/0} мышей (данные не представлены). Подмножество INFAR^{0/0} мышей выжил после инфицирования промежуточной дозой 1×10^7 CVA-дцнео-ΔB15, а все мыши выжили после инфицирования дозой 2×10^6 TCID₅₀ (фиг. 3A и B). INFAR^{0/0} мыши, инфицированные диким типом CVA, одинаково погибали даже при самой низкой дозе 2×10^6 TCID₅₀ (фиг. 3A и B). Примечательно, что, CVA-дцнео-ΔB15 был еще высоко патогенным для INFAR^{0/0} мышей даже при самой низкой используемой дозе 2×10^6 TCID₅₀, о чем свидетельствует значительная потеря веса более чем 20% (фиг. 3A).

Таким образом, система ИФН типа I, по-видимому, является важным фактором, вовлеченным в сильное аттенуирование CVA-дцнео-ΔB15. Тот факт, что INFAR^{0/0} мыши, инфицированные дозами 2×10^6 и 1×10^7 TCID₅₀ CVA-дцнео-ΔB15 частично или полностью выжили, в то время как все INFAR^{0/0} мыши, инфицированные дт CVA, погибли, предполагает, что ИФН типа I-независимые факторы содействовали аттенуированию CVA-дцнео-ΔB15 в меньшей степени. Ранее сообщалось, что B15 является ингибитором активации NFκB в VACV инфицированных клетках (Chen et al. (2008), PLoS. Pathog. 4:e22-). Поэтому, противовирусный эффект усиленной NFκB активации из-за отсутствия B15, возможно, был ответственен за умеренное аттенуирование CVA-дцнео-ΔB15 по сравнению с CVA у INFAR^{0/0} мышей. В этой же связи, менее эффективное NFκB ингибирование также может дать объяснение умеренному аттенуированию CVA-ΔB15 у мышей дикого типа (фиг. 2) поскольку у них отсутствует B15. Однако это гораздо меньше аттенуирует, чем CVA-дцнео-ΔB15, потому что им так же не хватает нео/tpsL кассеты, которая отвечает за большую часть аттенуирования CVA-дцнео-ΔB15.

Пример 3. Индукция ИФН-α и ИФН-λ в дендритных клетках (DC) с помощью CVA-дцнео-ΔB15.

Поскольку, DC являются эффективными производителями ИФН типа I и типа III, а также других цитокинов, мы оценили способность различных конструкций CVA, представленных в данном документе,

индуцировать эти ИФН в DC, полученных из костного мозга мышей, которые были получены с использованием системы культуры лиганда FMS-типа тирозинкиназы 3 (flt3-L или FL). Мышиный ИФН- α , но не мышинный ИФН- β , связан с ортопоксвирусным белком B19. Это связывание частично или полностью предотвращает обнаружение ИФН- α в ИФН- α -специфическом ИФА (данные не представлены). Для облегчения анализа, ИФН- α индукции с помощью CVA-дцнео- Δ B15, дополнительная делеция была введена замещением гена B19R геном устойчивости к зеоцину (фиг. 1). Аттenuирование в результате CVA-дцнео- Δ B15/B19 мутанта с двойной делецией было неотличимым от такового CVA-дцнео- Δ B15 в BALB/c модели болезни, за исключением того, что вирусные титры в легких инфицированных мышей были даже ниже, чем на шестой день после заражения (данные не представлены). В то время как ИФН- α не был обнаружен в супернатантах CVA-инфицированных FL-DC, как ожидалось, CVA- Δ B19, индуцировавшие обнаруживаемые количества ИФН- α (фиг. 4), демонстрируют, что CVA дикого типа способен индуцировать умеренные уровни ИФН- α , которые скрыты от ИФА на основе обнаружения B19. Мутант CVA-дцнео- Δ B15/B19 с двойной делецией индуцирует значительно более высокие уровни ИФН- α , чем CVA- Δ B19 в FL-DC, который был сопоставим с индуцированным MVA (фиг. 4). Это свидетельствует о том, что мутации нео- Δ B15 присвоена способность более высокой индукции интерферона CVA. B15 не способствует этому эффекту, так как CVA- Δ B15, индуцированный, не обнаруживаемый ИФН- β , таким образом ведет себя как дт CVA.

Так как ортопоксвирусы не экспрессируют связывающий белок для ИФН- λ , мы смогли непосредственно проанализировать мутант CVA-дцнео- Δ B15 на его способность индуцировать секрецию ИФН- λ с помощью FL-DC. CVA-дцнео- Δ B15 индуцирует значительно более высокие уровни ИФН- λ в супернатантах FL-DC, чем CVA или CVA- Δ B15 (фиг. 4). Уровни ИФН- λ , индуцированные с помощью CVA-дцнео- Δ B15 были очень похожи на индуцированные с помощью MVA. В совокупности, представленные выше результаты, указывают на то, что CVA-дцнео- Δ B15 представляет собой мощный индуктор ИФН- α и ИФН- λ сопоставимый с MVA, у которого отсутствует ряд иммуномодуляторов (Antoine et al. (1998), *Virology* 244:365-396; Meisinger-Henschel et al. (2007), *J. Gen. Virol.* 88:3249-3259), что приводит к усилению активации DC, по сравнению с их CVA предшественниками (Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* 118:1776-1784).

Пример 4. Индукция ИФН- β в мышинной клеточной линии с помощью CVA и CVA-дцнео- Δ B15.

Для того, чтобы определить, была ли увеличенная ИФН типа I-индуцирующая способность CVA-дцнео- Δ B15 ограничена DC, BALB/3T3 мышинный клон A31 (A31) клеток фибробласта был инфицирован различными конструкциями CVA, и уровни мРНК ИФН- β были определены с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). Тогда как CVA и CVA- Δ B15 индуцировали только очень низкую экспрессию гена ИФН- β , CVA-дцнео- Δ B15 инфекция стимулировала увеличенные уровни транскриптов ИФН- β в клетках A31 (фиг. 5A). Индукция мРНК ИФН- β с помощью CVA-дцнео- Δ B15 на 4 час пост-инфекции была аналогична полученной с MVA на этот момент времени (фиг. 5A). Уровни транскриптов ИФН- β в MVA-инфицированных клетках A31 обычно снижались после 4 ч постинфекции, тогда как мРНК ИФН- β , индуцированная с помощью CVA-дцнео- Δ B15 возрастает еще больше и явно превышает индуцированную с помощью MVA на 6 часов пост-инфекции и далее (фиг. 5A). Эти данные в сочетании с почти полной отменой аттenuирования CVA-дцнео- Δ B15 в INFAR^{0/0} мышах убедительно свидетельствуют, что вирулентность этого вируса мутанта у мышей дикого типа, вероятно, вызвано сильно усиленной индукцией ИФН типа I.

Когда нео ORF в локусе B15R CVA-дцнео- Δ B15 был либо удален (CVA- Δ B15) или заменен зеоцин устойчивой кассетой (зео) (CVA-зео- Δ B15), ИФН- β стимулирующая способность полученных мутантных вирусов практически полностью отсутствует (фиг. 5B). Поскольку неомицин ORF был вставлен вместо B15R ORF, оставляя сильный ранний промотор B15R (p_{B15}) интактным, мы удалили p_{B15} из CVA-дцнео- Δ B15. Полученный мутант CVA- Δp_{B15} -нео- Δ B15 индуцирует только уровни транскриптов ИФН- β дт CVA (фиг. 5B). Таким образом, транскрипция нео ORF в CVA-дцнео- Δ B15 мутанте оказалась существенной для ИФН- β стимулирующей способности. Нео кассета транскрипции в CVA-дцнео- Δ B15-инфицированных A31 клетках была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР анализа, нацеленного на *gprSL* вставку участка нео/*gprSL* (данные не представлены). Нео и *gprSL* ORF были вставлены в обратной комплементарной ориентации относительно промотора B15 и только очень короткий ORF, как предполагается, будет транслирован от нео кассеты, если эта бессмысловая РНК будет использована для всего механизма трансляции.

После того как мутант CVA-дцнео- Δ B15 экспрессировал второй нео транскрипт в смысловой ориентации под контролем раннего/позднего промотора от EGFP/нео кассеты в остове ВАС, нео последовательности в двух частично комплементарных транскриптах могут формировать частично двухцепочечную РНК (дцРНК). Эта дцРНК скорее всего служила как дополнительный РAMP в инфицированных клетках, что ведет к повышению индукции ИФН типа I и типа III.

Пример 5. MVA векторы, экспрессирующие комплементарные РНК пары чужеродных вставок, ин-

дуцируют ИФН- β в мышинных клетках.

Для демонстрации применимости принципа дцРНК к MVA, были сконструированы две пары рекомбинантных векторов MVA, экспрессирующих два комплементарных транскрипта либо нео или EGFP гена. Это было достигнуто путем вставки двух копий нео или EGFP ORF в местах удаленных друг от друга в геноме MVA, каждый под контролем поксвирусного раннего/позднего промотора. ВАС-производные MVA дикого типа уже содержатся одна копия нео/EGFP кассета во вставке ВАС остова (фиг. 6А). Ранее было продемонстрировано, что ВАС кассета, включающая нео/EGFP кассету, не изменяет свойства MVA и поэтому эквивалентно дикому типу MVA (Meisinger-Henschel et al. (2010), J. Virol. 84:9907-9919). MVA-дцнео- Δ B15 содержит второй нео ORF в B15R локусе в обратной ориентации относительно эндогенного B15R промотора как часть нео/gpsL кассеты (фиг. 6А). MVA-дцнео- Δ B15 таким образом точно воспроизводит констелляцию нео вставок в CVA-дцнео- Δ B15 мутанте, описанном выше. Для конструирования MVA-дцEGFP, нео/EGFP кассета была сначала удалена из ВАС-вставки MVA дикого типа. Для получения рекомбинантного MVA-дцEGFP, EGFP ORF был потом вставлен дважды в MVA геном в отдаленных сайтах, находящихся под контролем ранних/поздних промоторов, направляя транскрипцию либо смыслового, либо антисмыслового EGFP РНК, обеспечивая формирование дцРНК 720 п.о. (фиг. 6В). Конструкция MVA, экспрессирующая только смысловой EGFP транскрипт от одной EGFP вставки (MVA-EGFP), служащей в качестве контроля для всех MVA-дцEGFP конструкций (фиг. 6В).

Мышечные клетки А31, инфицированные MVA, генерирующие комплементарные транскрипты двух вставленных нео антигенов (MVA-дцнео- Δ B15), показали повышенную транскрипцию гена ИФН- β (фиг. 7А), по сравнению с ВАС-производными вируса MVA дт с одной нео кассетой. Когда вся ВАС кассета, содержащая смысловую нео ORF, была удалена из MVA-дцнео- Δ B15, с использованием рекомбинации на основе FRT, в результате MVA-нео- Δ B15/ Δ ВАС индуцирует только уровни дикого типа мРНК ИФН- β (фиг. 7А). Вирус MVA с делецией гена B15R (MVA- Δ B15) и содержащий только смысловую нео кассету в остове ВАС также индуцировал уровни дикого типа мРНК ИФН- β (фиг. 7А). Это свидетельствует о том, что усиление возможности MVA-дцнео- Δ B15 индуцировать ИФН- β зависела от наличия как смысловых, так и антисмысловых нео экспрессирующих кассет, и не было вызвано делецией B15R как таковой. MVA-дцнео- Δ B15, а также CVA-дцнео- Δ B15 индуцировали высокое количество ИФН- β мРНК после 5 ч инфекции (фиг. 7А). Экспрессия мРНК ИФН- β , индуцированная MVA-дцнео- Δ B15, уменьшилась между 5 и 7 ч постинфекции, поскольку CVA-дцнео- Δ B15 индуцированные уровни мРНК ИФН- β оставались высокими на 7 ч постинфекции (фиг. 7А). Следовательно, уровень MVA-дцнео- Δ B15-индуцированного ИФН- β был определен на 5 ч пост-инфекции во всех дальнейших экспериментах. Культуры супернатантов MVA-дцнео- Δ B15 инфицированных А31 клеток содержат повышенное количество ИФН- β через 18 ч после инфицирования по сравнению с MVA дт или единственной нео кассетой MVA конструкций (фиг. 7В), подтверждающие результаты анализа мРНК ИФН- β .

Приведенные выше результаты были воспроизведены с набором MVA рекомбинантов, направляющих поколение комплементарных ранних транскриптов из двух отдельных EGFP вставок. Один EGFP ORF под контролем сильного раннего промотора направлял экспрессию смысловой EGFP-мРНК и был вставлен в IGR136/137. Соответствующая единственная вставка MVA рекомбинанта MVA-EGFP экспрессирует EGFP и индуцирует уровни мРНК ИФН- β в мышечных клетках А31 (фиг. 7С). MVA, содержащая дополнительную EGFP кассету, вставленную в IGR86/87, направляет раннюю/позднюю экспрессию антисмыслового EGFP транскрипта под контролем рS промотора (Chakrabarti 1997), индуцирует сильное увеличение количества мРНК ИФН- β (фиг. 7С). Таким образом, ранняя дцРНК, полученная из гетерологичных ДНК вставок в геном MVA, стимулировала ИФН- β зависимую секрецию последовательности вставки.

Последнее наблюдение было подтверждено анализом ИФН- β индукции на уровень белка. Аналогично MVA-дцнео- Δ B15, MVA-дцEGFP стимулировал секрецию значительно более высоких количеств ИФН- β в культуре супернатантов, чем соответствующий MVA-EGFP (фиг. 7D). Количество ИФН- β в супернатантах А31 клеток, инфицированных различными MVA рекомбинантами, значительно варьируется от эксперимента к эксперименту, предположительно из-за изменения числа пассажей, плотности клеток и состояние клеток.

Пример 6. Ранняя вирусная транскрипция является достаточной для индукции повышения уровней ИФН- β с помощью MVA дцРНК мутантов. Было предположено, что дцРНК-опосредованная индукция ИФН- β будет в основном зависеть от дцРНК, которая генерируется на ранней стадии инфекции. Лечение инфицированных MVA-дцEGFP-2 клеток фибробластов эмбрионов мыши (MEF) с AgaC, который блокирует репликацию вирусного генома и, следовательно, пострепликативную (среднюю и позднюю) экспрессию генов, не уменьшило усиленную экспрессию гена ИФН- β (фиг. 8А), демонстрируя, что ранняя транскрипция дцРНК достаточна для усиления индукции ИФН- β . Причиной умеренного увеличения ИФН- β в MVA дт с инфицированным MEF, обработанным AgaC (фиг. 8А), остается неясным. MVA мутант с отсутствующим E3L геном, который кодирует белок связывания дцРНК, маскирующий дцРНК от

узнавания, усиливает индукцию ИФН- β в MEF до некоторой степени, как ожидалось от ранее опубликованных наблюдений в CEF и (Hornemann et al. (2003), J. Virol. 77:8394-8407). Обработка MVA- Δ E3L-инфицированных клеток с AgaC явно снизило индукцию ИФН- β (фиг. 8A). Это было ожидаемо, поскольку значительные количества вирусных дцРНК, естественно, генерируются только в пострепликативной стадии жизненного цикла поксвируса на \sim 2 ч дальнейшей постинфекции. В соответствии с этим понятием, AgaC-обработанные MVA-E3L не вызывали большей индукции мРНК ИФН- β чем дт MVA когда поздняя экспрессия гена была блокирована обработкой AgaC (фиг. 8A).

MVA мутант, экспрессирующий антисмысловой транскрипт EGFP под контролем позднего промотора pSSL (MVA-дцEGFP-поздний) индуцировал уровни мРНК ИФН- β также как MVA дт (фиг. 8B). Это обеспечило еще одно доказательство, что формирование дцРНК в раннее время инфекции до начала репликации ДНК является необходимым условием для индуктора фенотипа ИФН MVA-дцEGFP и, весьма вероятно, также для MVA-дцнео- Δ B15. Таким образом, ранняя экспрессия дцРНК с помощью MVA является необходимой и достаточной, чтобы индуцировать ИФН- β в инфицированных клетках. Весьма вероятно, что тот же принцип лежит в основе повышенной врожденной стимулирующей способности CVA-дцнео- Δ B15.

Пример 7. MVA-дцнео- Δ B15 и MVA-дцEGFP активирует протеин-киназу R (PKR).

PKR конститутивно синтезируется в клетках при умеренных уровнях как не активная киназа, которая активируется путем связывания с дцРНК. Экспрессия PKR повышает регуляцию ИФН по типу I. Одним из основных субстратов активированного PKR является фактором инициации трансляции субъединицы eIF2 α , которая фосфорилируется с помощью PKR. Фосфорилирование eIF2 α (P-eIF2 α) после инфекции приводит к остановке трансляции в инфицированных клетках в качестве противовирусной контрмеры, и может также участвовать в PKR-опосредованной индукции апоптоза. α Фосфорилирование eIF2 анализировалось как индикатор для активации PKR с помощью дцРНК в мышечных клетках A31. Мутант MVA (MVA- Δ E3L) с отсутствующим геном ингибитора E3 PKR вируса осповакцины, который также связывает и секвестры дцРНК, служащие как положительный контроль. MVA-дцнео- Δ B15 и MVA-дцEGFP, активирующие PKR уже в 1 ч после инфицирования A31 клеток, в то время как MVA дт не обнаруживал активации PKR на протяжении инфекции (фиг. 9). Количество P-eIF2 α увеличивалось далее на 4 ч постинфекции в клетках, инфицированных обеими нео и основанными на EGFP ранними дцРНК продуцирующими мутантами (фиг. 9). На 6 ч постинфекции количество P-eIF2 α в MVA-дцнео- Δ B15 и MVA-дцEGFP в инфицированных клетках начало снижаться, и почти не обнаруживается на 8 ч постинфекции MVA-дцнео- Δ B15, при этом P-eIF2 α был все еще слабо обнаруживаемым в этот момент времени в MVA-дцEGFP инфицированных клетках (фиг. 9). К тому же, сигнал P-eIF2 α был стабильно сильнее за первые 6 часов инфекции в MVA-дцEGFP инфицированных клетках по сравнению с MVA-дцнео- Δ B15 инфицированных клетках (фиг. 9), предлагая несколько более сильную PKR активирующую активность MVA-дцEGFP по сравнению с MVA-дцнео- Δ B15.

В отличие от ранних дцРНК продуцирующих мутантов, сигнал P-eIF2 α , индуцированный MVA- Δ E3L не был обнаружен на 2 ч пост-инфекции и усиливался очень резко между 2 ч и 3 ч постинфекции, оставаясь высоким в остальной период наблюдения до 8 ч пост-инфекции (фиг. 9). MVA- Δ E3L индуцирует сильнейший сигнал P-eIF2 α среди всех мутантов от 4 ч дальнейшей пост-инфекции (фиг. 9). Эта кинетика согласуется с дцРНК, сформированной в конце инфекции во время MVA инфекции с помощью ренатурации частично комплементарных транскриптов из промежуточных и поздних вирусных генов. Из-за нехватки E3, PKR активация, индуцированная этими поздними дцРНК, не была заблокирована. Напротив, кинетика активации PKR с помощью MVA рекомбинантов, генерирующих нео- или EGFP-дцRNA, согласуется с очень ранним присутствием стимулирующего количества дцРНК в инфицированных клетках. Поскольку эти рекомбинанты экспрессируют E3 белок, PKR активация, по-видимому, подавляется позднее в инфекции, когда достаточное количество белка E3 накапливалось в инфицированных клетках.

Пример 8. PKR необходимо для увеличения индукции мРНК ИФН- β и накопления ИФН- β в клеточных супернатантах.

В MEF дт, MVA-EGFP, индуцированные очень похожим количеством транскрипта ИФН- β , как MVA дт, как ожидалось, в то время как MVA-дцEGFP, индуцировали усиленный синтез мРНК ИФН- β (фиг. 10A). Напротив, MVA-дцEGFP не индуцирует усиленную экспрессию гена ИФН- β в PKR-дефицитных MEF (фиг. 10A). Секретия белка ИФН- β с помощью MVA-дцEGFP инфицированных MEF также сильно зависит от функционального PKR (фиг. 10B). Вирус Сендай (SeV), вирус РНК с отрицательной цепью которая, как известно, индуцирует ИФН- β с помощью PKR-независимого пути, служащего в качестве положительного контроля для компетентного PKR-дефицитного MEF для секретирования ИФН- β . Интересно, что MEF дт, секретированный только критическим количеством ИФН- β в ответ на SeV инфекцию, если все, в то время как SeV эффективно индуцирует мРНК ИФН- β и белок в PKR^{0/0} MEF, подтверждая, что PKR^{0/0} MEF были полностью компетентны для генерации и секретирования ИФН- β

(фиг. 10А и В). Вместе взятые, PKR оказались важными клеточными рецепторами, включенными в усиленную индукцию ИФН-β с помощью MVA-дцEGFP. Индукция ИФН-β гена с помощью MVA и MVA-EGFP (соответствует дт MVA) в MEF дт была также частично зависима от PKR (фиг. 10А), включая общую роль этого рецептора дцРНК для врожденной иммунной активации с помощью MVA, по крайней мере в MEF. Взятые вместе, увеличенная индукция ИФН-β с помощью MVA-дцEGFP полностью зависела от дцРНК рецептора PKR, которая дает дополнительные свидетельства, что дцРНК, продуцирующая MVA-дцEGFP, отвечают за наблюдаемое усиление врожденной иммунной активации.

Пример 9. Требования к длине ранней дцРНК для стимулирующего эффекта.

Исходная конструкция MVA-дцEGFP была разработана, чтобы имитировать MVA-дцнео-ΔB15 конструкцию, включая некомплементарный "липкий" конец ДНК, полученный от бактериального гена β-галактозидазы (β-гал) на 3' конце антисмыслового транскрипта EGFP. Для характеристики дальнейшего требования длины дцРНК для усиления индукции ИФН-β, был сконструирован родственный набор мутантов с прогрессивно укороченными перекрытиями EGFP ORF между 720 до 50 п.о. (фиг. 6В). У MVA-дцEGFP-2 и всех остальных дцEGFP мутантов отсутствуют дополнительные 3' "липкие" концы в антисмысловом транскрипте (фиг. 6В). В дт-MEF, MVA, экспрессирующие комплементарные транскрипты EGFP с уменьшением длины перекрытия EGFP, индуцировали уменьшение количества мРНК ИФН-β и белка (фиг. 11А и В). В дт MEF, β-гал-производный 3' липкий конец не был необходимым для усиления ИФН-β эффекта (фиг. 11А). Перекрытие транскрипта EGFP 100 основаниями (MVA-дцEGFP-5), стимулировал явно меньше ИФН-β, чем MVA-дцEGFP, но еще усиливал ИФН-β ответ по сравнению с контрольным MVA-EGFP (фиг. 11А и В). Опять же, в PKR^{0/0} MEF почти нет мРНК ИФН-β и не был индуцирован ИФН-β с помощью различных рекомбинантов MVA (фиг. 11А и В). MVA рекомбинант со вставкой перекрытия 50 п. о. EGFP не обнаружил избыточной стимулирующей способности ИФН-β.

Таким образом требовалось минимальное перекрытие двух комплементарных рекомбинантных транскриптов от 50 до 100 пар оснований для увеличения индукции ИФН-β в MEF (фиг. 11С).

Пример 10. Свойства репликации MVA-дцEGFP и стабильность индуктора фенотипа.

Размножение MVA-дцEGFP во вторичных фибробластах куриного эмбриона (CEF) для получения большого количества очищенных препаратов MVA-дцEGFP показали нормальные вирусные урожаи в пределах диапазона MVA дт (данные не представлены). Многоступенчатый анализ роста показал, что MVA-дцEGFP сохранил репликации с ограничением фенотипа в человеческих и мышинных клетках (фиг. 12В), но реплицируются несколько менее эффективно в CEF, чем дт MVA (фиг. 12А). Эта слегка аттенуированная репликация также наблюдалась, когда средняя полезная продуктивность вирусного исходного раствора MVA-дцEGFP, полученного от CEF клеток, была связана с этим MVA-EGFP. Соотношение полезной продуктивности MVA-дцEGFP/MVA-EGFP было около 0,5 (табл. 1) и дальнейшее снижение при полезной продуктивности MVA-EGFP было по сравнению с теми MVA-5 и MVA-6 около 0,1 (табл. 1). Поскольку MVA-дцEGFP-5 и -6 индуцирует только немного больше всех ИФН, эффект на репликацию вируса был, вероятно, не опосредован через растворимый ИФН типа I. Когда куриные клетки DF-1 были использованы для производства вирусных исходных растворов, не было тенденции к снижению полезной продуктивности когда были экспрессированы короткие EGFP-дцRNA (табл. 1). Таким образом, клетки DF-1 представляют собой еще более подходящий тип клеток для размножения ранней дцРНК-перепроизводящих MVA мутантов, чем CEF клетки.

Для того, чтобы оценить, сохраняется ли повышенная стимулирующая способность ИФН-β MVA-дцEGFP после многократного пассирования, мы провели 10 пассажей MVA-EGFP и MVA-дцEGFP в интерферон-компетентной куриной клеточной линии DF-1 используя минимум кратность инфекции (MOI) приблизительно 0,01. MVA-дцEGFP, пассированные 10 раз на клетках DF-1, индуцирующие усиленный ИФН-β ответ сравнимый с таким у начального вируса MVA-дцEGFP, пассированного только один раз в клетках DF-1 (фиг. 12С). Основная индукция ИФН-β MVA-EGFP также была без изменений после 10 пассажей DF-1 (фиг. 12С). Таким образом, усиленная интерферон стимулирующая способность MVA-дцEGFP сохранялась после нескольких пассажей в клетках DF-1. Ни MVA, ни MVA-дцEGFP или MVA-дцнео-ΔB15, не индуцировали экспрессию гена ИФН-β в клетках DF-1 или клетках CEF (данные не представлены). Это подтверждает мнение, что никакой сильный счетчик избирательного воздействия не действует в клетках DF-1 для ограничения усиленной индукции ИФН типа I на протяжении репликации MVA-дцEGFP, предоставленный аргумент для наблюдаемой устойчивости индуктор фенотипа ИФН-β. В совокупности с нетронутой полезной продуктивностью мутантов MVA-дцEGFP, клетки DF-1 представляют собой еще более подходящий тип клеток для размножения ранних дцРНК-перепроизводящих мутантов, чем клетки CEF.

Пример 11. Повышенная индукция цитокинов *in vivo*.

Уровни системных цитокинов в ответ на инфицирование мышей C57BL/6 MVA-дцEGFP были проанализированы на 6 час постинфекции. Уровни ИФН-α в крови после MVA-дцEGFP инфекции были значительно выше, чем в контролях (фиг. 13А), аналогично *in vitro* наблюдениях (фиг. 9 и 10). Уровни ИФН-γ, воспалительных цитокинов IL-18 и IL-6, а также хемокинов CXCL1, CCL2, и CCL5 были также

значительно увеличены в MVA-дцEGFP-инфицированных мышах. Ответ был, по меньшей мере, частично зависимым от наличия сигнальной молекулы адаптера IPS-1 (фиг. 13), которая необходима для ИФН типа I и цитокиновой индукции через рецепторы узнавания дцРНК RIG-I и MDA-5. Напротив, все наблюдаемые усиления в индукции цитокинов и хемокинов, включая ИФН- α , ИФН- γ , IL-6, IL-18, CXCL1, CCL2, и CCL5 были зависимы от PKR. Тогда как основная индукция ИФН- α , CXCL1, и CCL2 MVA-EGFP не сильно повлияла на дефицит PKR, основные уровни ИФН- γ , IL-6, IL-18 и CCL5 оказались уменьшены в PKR-дефицитных мышах (фиг. 13). Эти результаты показывают, что продукция ранней дцРНК с помощью MVA, усиливает ответ ИФН типа I, а также индукцию воспалительных цитокинов не только в культивируемых клетках, но также *in vivo*, основываясь на активации похожих паттернов распознавания молекул, как в культивируемых клетках. PKR, а также рецепторы распознавания сигналов через IPS-1 были вовлечены в опосредованное усиление экспрессии ИФН типа I с помощью MVA-дцEGFP *in vivo*.

Пример 13. Усиление CD8 Т-клеточных ответов с помощью MVA-дцEGFP у мышей.

C57BL/6 мыши были иммунизированы разными путями MVA-дцEGFP, и CD8 Т-клеточные ответы против иммунодоминантных эпитопов в каждом фоновом штамме были определены с использованием окрашивания декстрамера. Количество CD8 Т-клеток в селезенке мышей C57BL/6, направленных против иммунодоминантного эпитопа B8R вируса осповакцины, было значительно увеличенным через семь дней после внутривенной иммунизации MVA-дцEGFP по сравнению с MVA-EGFP (фиг. 14) ($p=0,048$ с помощью непарного теста Стьюдента).

Пример 14. Усиленная индукция гена ИФН- β с помощью MVA-дцEGFP в клетках человека.

Чтобы продемонстрировать, что стимулирующий эффект ранней дцРНК, генерируемой рекомбинантным MVA, не ограничивается мышинными клетками, культуры линии MRC-5 диплоидных клеток фибробластов легких человека были инфицированы рекомбинантными MVA, генерированными ранними дцРНК. В то время как основная индукция гена ИФН- β с помощью MVA-EGFP иногда не обнаруживалась в клетках MRC-5 человека (фиг. 15 и данные не представлены), MVA-дцнео- Δ B15 и MVA-дцEGFP эффективно индуцировали экспрессию мРНК ИФН- β в клетках MRC-5 человека (фиг. 15). Эффективность индукции гена ИФН- β уменьшается с прогрессивным укорочением EGFP ORF перекрытий (фиг. 15), аналогично результатам, полученным с мышинными клетками. Укорочение EGFP ORF перекрытия от 300 и 100 нуклеотидов сильно снижает стимулирующую активность ИФН- β соответствующих рекомбинантов MVA-дцEGFP-4 и MVA-дцEGFP-5 (фиг. 15). Таким образом, усиление индукции ИФН- β с помощью дцРНК, генерируемой на ранней стадии инфекции MVA, не ограничена мышинными клетками, но по меньшей мере была, как видно в клетках человека и, следовательно, очень вероятно, происходит также в первичных человеческих клетках и тканях, а также человеческом субъекте, вакцинированном рекомбинантными поксвирусами, экспрессирующими транскрипты комплементарной РНК.

Пример 15. Усиление индукции ИФН- β с помощью MVA-dsE3L, генерирующего раннюю дцРНК от природного гена MVA.

Мы вставили ранний/поздний H5m промотор (Wyatt et al. (1996), Vaccine 14:1451-1458), обладающий сильным ранним компонентом по ходу транскрипции природного раннего E3L ORF MVA, для направления ранней экспрессии антисмысловой E3L РНК (фиг. 16A). E3L ORF содержит гомополимерный T₇ фрагмент секвенирования в антисмысловой цепи, содержащей T₅NT консенсусную последовательность ортопоксвирусного раннего стоп-сигнала транскрипции (ETTS). Этот антисмысловой ETTS в E3L ORF может, вероятно, ограничить длину ранних антисмысловых транскриптов до примерно 250-300 нуклеотидов вместо полных ~650 нуклеотидов полного E3L транскрипта. Поэтому мы мутировали этот ETTS (фиг. 16A) с помощью замены одного остатка Т на А не изменяя закодированную аминокислотную последовательность E3.

Соответствующая антисмысловая последовательность ETTS для терминации раннего антисмыслового транскрипта E3 полной длины естественно присутствует в E3L/E4L межгенном участке (фиг. 16A).

Полученный мутант MVA-дцE3L индуцирует высокие уровни мРНК ИФН- β в MEF (фиг. 16B), которые были сопоставимы с таковыми лучшими доступными основанными на дцРНК индукторами, трансфицированными поли (I:C), в качестве положительного контроля (данные не представлены). Оказалось, что MVA-дцE3L индуцирует явно более высокие уровни мРНК ИФН- β , чем MVA-дцEGFP (фиг. 16B). MVA-дцEGFP-5 и поздний MVA-дцEGFP служат как отрицательный контроль для мРНК ИФН- β индукции вместе с контрольным вирусом MVA-EGFP (фиг. 16B). Таким образом, поколение ранних дцРНК от векторов MVA может также быть получено путем генерации ранних экспрессированных антисмысловых транскриптов от природных генов раннего MVA вместо вставки двух частично или полностью идентичных гетерологичных последовательностей.

Пример 16. Формирование EGFP дцРНК.

Для демонстрации формирования дцРНК из смысловых и антисмысловых транскриптов гена EGFP в MVA-дцEGFP-720(o) инфицированных клеток, мы изолировали и объединили общую РНК из двух 6-луночных планшетов с обработанными вирусом AgaC (40 мкг/мл) BALB/3T3-A31 клетками, с использованием способа Trizol®. Обработанные ДНКазой образцы общей РНК расщепляли с одной одноцепочеч-

ной-специфической РНКазой А и Т1 (Ambion) или с РНКазой А/Т1 плюс дцРНК-специфической РНКазой V1 (Ambion) в общем объеме 20 мл в течение 1 ч при 37°C. Расщепленные образцы ДНК и необработанного контрольного образца (нерасщепленные), очищали с использованием набором РНК Clean & Concentrator (Zymo Research, Фрайбург, Германия) и денатурации при 95°C в течение 3 мин. Обратную транскрипцию и количественный ПЦР проводили, как описано выше, с использованием коммерчески доступного анализа EGFP TaqMan® (Mr04329676_mr, Life Technologies). Среднее кратной индукции EGFP РНК над имитацией от повторяющихся реакций ПЦР нерасщепленных образцов РНК было рассчитано и установлено на 100%. Процент оставшейся РНК EGFP был рассчитан с использованием кратной индукции значения РНК EGFP после А/Т1 и А/Т1/V1 расщепления, полученного от MVA-EGFP и MVA-дцEGFP-720(о) инфицированных клеток.

Пример 17. Клетки и вирусы.

INFA^{0/0} и IPS-1^{0/0} фибробласты эмбрионов мыши (MEF) были приготовлены из 15-дневных C57BL/6-INFA^{0/0} и 14-дневных C57BL/6-IPS-1^{0/0} эмбрионов с помощью стандартных процедур, и PKR^{0/0} MEF и соответствующих PKR-достаточных контрольных MEF. Все клеточные линии культивировали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM, Gibco/Invitrogen, Дармштадт, Германия) с добавлением 10% фетальной сыворотки телят (FCS, Pan Biotech, Айденбах, Германия). Клетки фибробластов первичного куриного эмбриона (CEF) были приготовлены из 11-дневных куриных эмбрионов и культивировали в VP-SFM (Gibco) для получения исходного раствора вирусов или DMEM с добавлением 10% FCS для анализа репликации. GM-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор макрофагов)-зависимые дендритные клетки (GM-DC) были получены из свежеприготовленного мышинного костного мозга при культивировании с рекомбинантным мышинным GM-CSF (tebu-bio, Оффенбах, Германия). MVA дикого типа (MVA) и мутанты MVA были размножены на вторичных CEF или DF-1 клетках и титрованы на CEF клетках с использованием TCID₅₀ способа, как описано (45) Meisinger-Hentschel и др., 2007. J Gen Virol.84:3249-3259. CVA дикого типа (CVA) и мутанты CVA были размножены на Vero клетках и титрованы с помощью TCID₅₀ способа на CV-1 клетках. Вирус фибромы Shope был получен из ATCC (VR-364) и был размножен и титрован на клетках SIRC рогаговы кролика. Штамм Кантелл вируса Сендай был получен из Charles River Laboratories при 2000 HA единицах/мл. Все вирусы, используемые в экспериментах на животных, были очищены два раза через 36% подушку сахарозы.

Пример 18. Рекомбинационная инженерия ВАС и реактивация инфекционного вируса.

Конструирование CVA и MVA-ВАС было описано ранее (Lee and Esteban, 1994. Virology 199:491-496). Для генерирования рекомбинантов MVA, экспрессирующих смысловую и антисмысловую мРНК EGFP и все соответствующие контроли, нео-IRES-EGFP кассета в остова ВАС этих конструкций была заменена бактериальной кассетой устойчивости к тетрациклину. Рекомбинант MVA-EGFP, содержащий бактериальную кассету устойчивости к канамицину (NPT I) по ходу транскрипции EGFP ORF, которая находится под контролем сильного раннего/позднего промотора рHyb. MVA-ΔE3L был получен путем замены нуклеотидов 42697-43269 (ORF MVA050L) кассетой NPT I устойчивости к канамицину с помощью гомологичной рекомбинации в *E. coli*.

Для реактивации инфекционного вируса, 106 ВНК-21 клетки были трансфицированы с 3 мкг ВАС ДНК с использованием Eugene® HD (Promega, Маннхей, Германия), и после 60 мин заражения вирусом фибромы Shope, чтобы обеспечить необходимые вспомогательные функции. Реактивированный вирус был изолирован, и вирус-помощник был удален, как описано выше (Meisinger (Meisinger-Hentschel et al. (2007), J. Gen. Virol. 88:3249-3259).

Пример 19. Эксперименты инфицирования мышей.

Мышей анестезировали инъекцией кетамина/ксилазина до начала интраназальной инфекции с 2×10^6 , 1×10^7 , и 5×10^7 TCID₅₀ CVA и мутантами CVA, разведенными в PBS до конечного объема 50 мкл на мыш. Животных взвешивали и осматривали ежедневно в течение двух недель, и признаки заболевания оценивались по условной шкале от 0-4. Для анализа системных уровней цитокинов, мышам вводили в.в. 200 мл соответствующих разведений вируса и спускали кровь спустя 6 ч из хвостовой вены.

Пример 20. Системный анализ уровня цитокинов методом анализа капельной проточной цитометрии.

Концентрации цитокинов в сыворотке мыши, извлеченной на 6 ч. после в.в. инфекции, определялись с помощью анализа капельной проточной цитометрии для указанных цитокинов мыши (eBioscience, Франкфурт, Германия) согласно инструкции производителя. Статистическая значимость различий между группами лечения была проанализирована с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни. Общий уровень значимости (0,05) был скорректирован поправкой Бонфони путем деления с числом групп (например, 11 цитокинов и хемокинов, протестированных у B6129SF2/J мышей), т.е. уровень общей поправки Бонфони был приравнен к $0,05/11=0,00455$ для сравнения между B6129SF2/2 терапевтическими группами.

Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны специалистам в данной области из рассмотрения спецификации и практики изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что спецификация и примеры рассматриваются только в качестве примера, с истинным объемом и сущ-

ностью изобретения, указанными в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный поксвирус для усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного, содержащий гетерологичные нуклеиновые кислоты, экспрессирующие избыток двухцепочечной РНК (дцРНК) на раннем этапе инфекции, при этом гетерологичные нуклеиновые кислоты содержат последовательности, кодирующие частично или полностью комплементарные транскрипты РНК, причем комплементарные участки транскриптов РНК перекрываются по меньшей мере 100 нуклеотидами и гибридизуются с формированием дцРНК, которая увеличивает продукцию интерферонов типа I у позвоночного, за счет чего усиливается врожденный иммунный ответ по сравнению с рекомбинантным поксвирусом, содержащим гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые не экспрессируют избыток дцРНК на раннем этапе инфекции.

2. Рекомбинантный поксвирус по п.1, дополнительно содержащий гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или более костимулирующих молекул, представляющих собой TRICOM (B7-1, ICAM-1 и LFA-3).

3. Рекомбинантный поксвирус по п.1 или 2, дополнительно содержащий гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более бактериальных, вирусных, грибковых или опухолевых антигенов.

4. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп.1-3, представляющий собой ортопоксвирус, парапоксвирус, ятапоксвирус, авипоксвирус, лепорипоксвирус, вирус оспы свиней, вирус оспы овец, вирус оспы оленей или вирус контагиозного моллюска.

5. Рекомбинантный поксвирус по п.4, отличающийся тем, что ортопоксвирус выбран из вируса осповакцины, вируса коровьей оспы и вируса обезьян.

6. Рекомбинантный поксвирус по п.5, отличающийся тем, что вирус осповакцины выбран из группы, состоящей из вируса осповакцины-Western Reserve, вируса осповакцины-Копенгаген, вируса осповакцины Dguvax, вируса осповакцины Lister, вируса осповакцины Acambis 2000 и 3000, вируса оспы кролика, вируса оспы буйволов, модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и модифицированного вируса осповакцины Ankara-Bavarian Nordic (MVA-BN).

7. Рекомбинантный поксвирус по п.6, отличающийся тем, что транскрипты РНК содержат белок-кодирующие открытые рамки считывания (ORF) или некодирующие белок участки.

8. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что комплементарные участки транскриптов РНК перекрываются 100-1000 нуклеотидами, предпочтительно 300-1000 нуклеотидами.

9. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что комплементарные участки транскриптов РНК перекрываются более чем 700 нуклеотидами.

10. Рекомбинантный поксвирус по п.7, отличающийся тем, транскрипты РНК полностью комплементарны, либо комплементарны более чем на 99%, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 80% или более чем на 70%.

11. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что нуклеиновые кислоты, кодирующие транскрипты РНК, находятся под контролем поксвирусных промоторов.

12. Рекомбинантный поксвирус по п.11, отличающийся тем, что поксвирусные промоторы представляют собой ранние промоторы или немедленно-ранние промоторы.

13. Иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный поксвирус по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

14. Способ усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного, включающий введение рекомбинантного поксвируса по любому из пп.1-12 позвоночному субъекту, в результате чего увеличивается продукция ИФН типа I, цитокинов и хемокинов по сравнению с рекомбинантным поксвирусом, содержащим гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые не экспрессируют избыток дцРНК на раннем этапе инфекции.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что продукция ИФН типа I включает транскрипцию мРНК, кодирующей ИФН- β , причем транскрипция мРНК ИФН- β увеличивается по меньшей мере в два раза.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что транскрипция мРНК ИФН- β увеличивается по меньшей мере в десять раз.

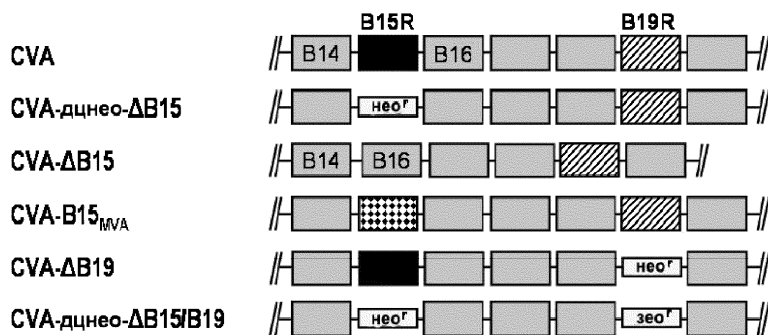
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что транскрипция мРНК ИФН- β увеличивается по меньшей мере в пятьдесят раз.

18. Способ по п.14, отличающийся тем, что продукция ИФН типа I включает секрецию белка ИФН- β , причем секреция белка ИФН- β увеличивается по меньшей мере в два раза.

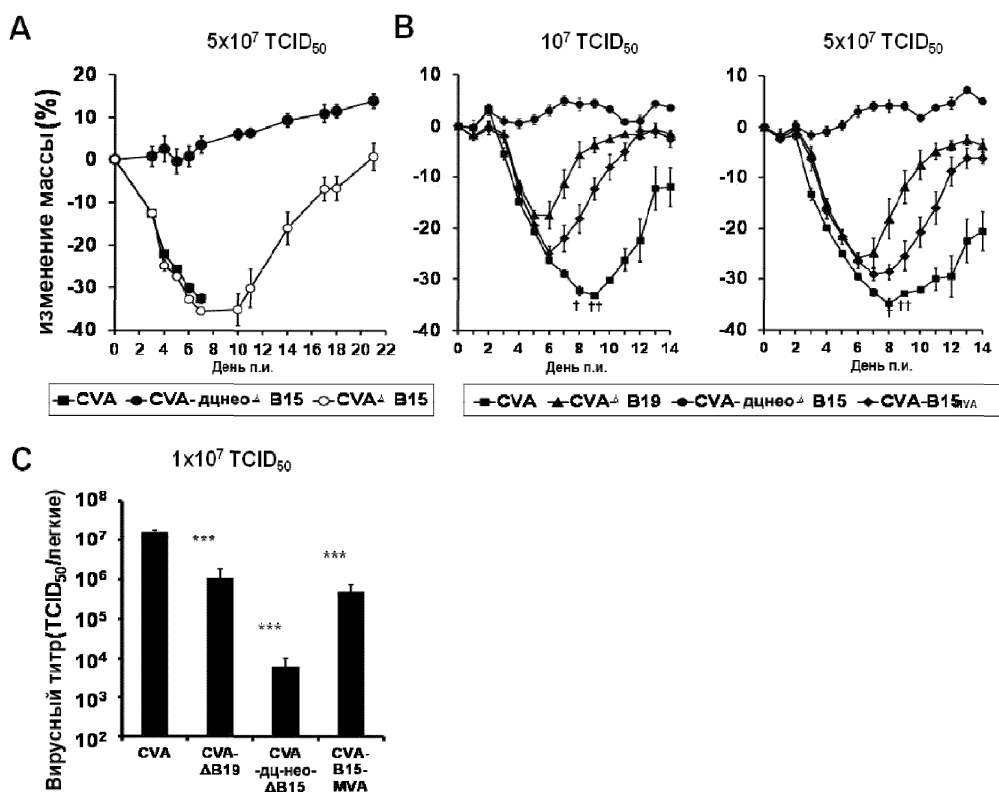
19. Способ по п.18, отличающийся тем, что секреция белка ИФН- β увеличивается по меньшей мере в четыре раза.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что секреция белка ИФН- β увеличивается по меньшей мере в десять раз.

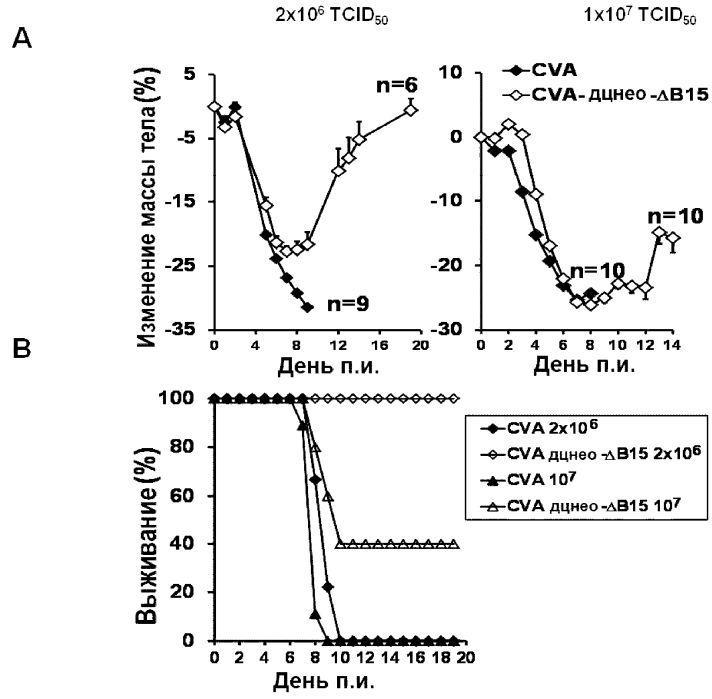
21. Способ по п.14, отличающийся тем, что увеличивается продукция ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-6 и ИЛ-18.
22. Способ по п.14, отличающийся тем, что увеличивается продукция хемокинов CXCL1, CCL2 и CCL5.
23. Применение рекомбинантного поксвируса по любому из пп.1-12 для производства фармацевтической композиции для усиления врожденного иммунного ответа у позвоночного, где усиление врожденного иммунного ответа включает усиление продукции ИФН типа I, цитокинов и хемокинов у позвоночного.
24. Применение по п.23, отличающееся тем, что продукция ИФН типа I включает транскрипцию мРНК, кодирующей ИФН- β , и транскрипция мРНК ИФН- β увеличивается по меньшей мере в 2 раза.
25. Применение по п.24, отличающееся тем, что продукция ИФН типа I включает секрецию белка ИФН- β , причем секреция белка ИФН- β увеличивается по меньшей мере в два раза.



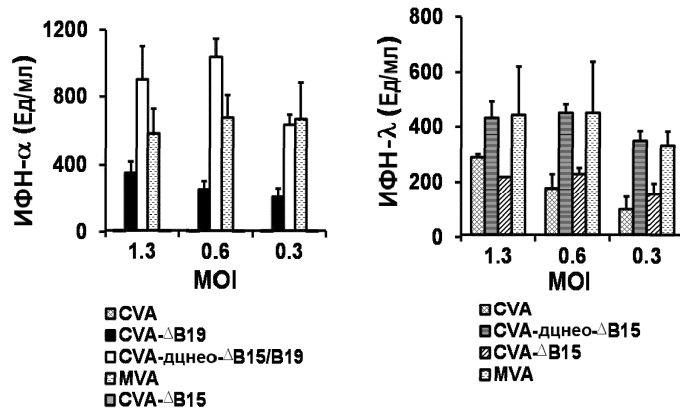
Фиг. 1



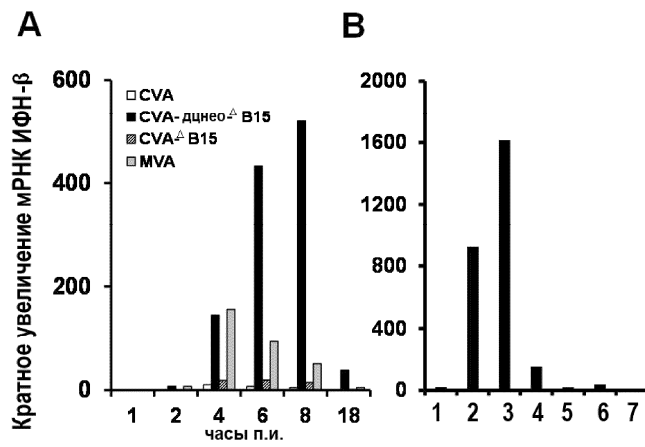
Фиг. 2



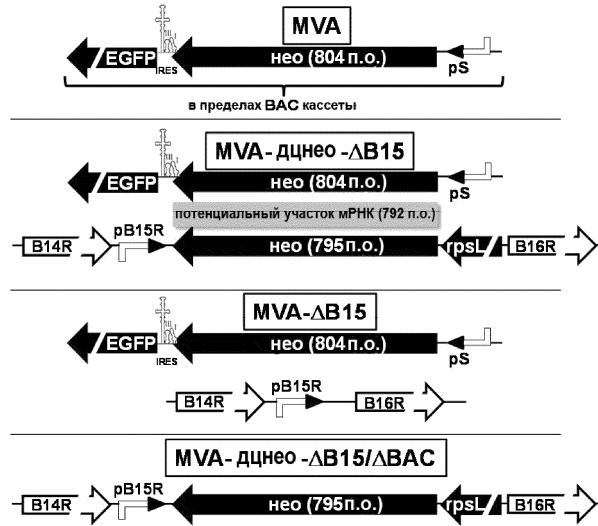
Фиг. 3



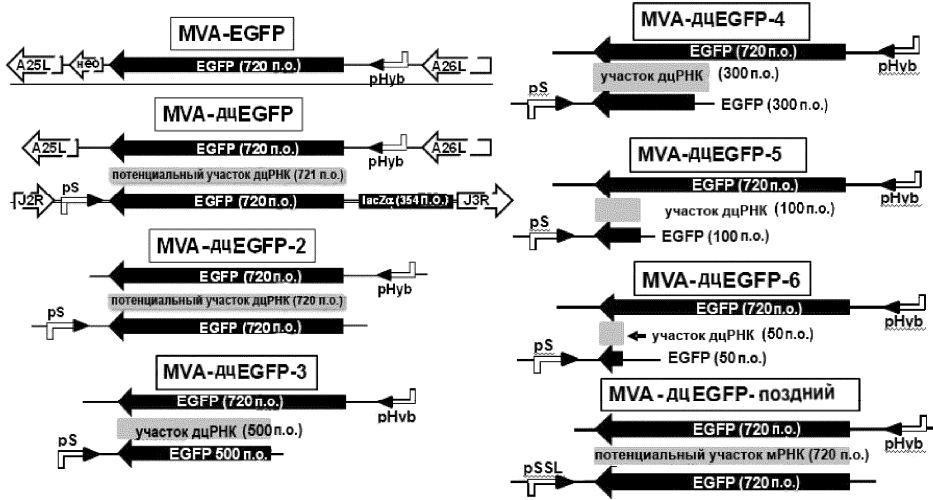
Фиг. 4



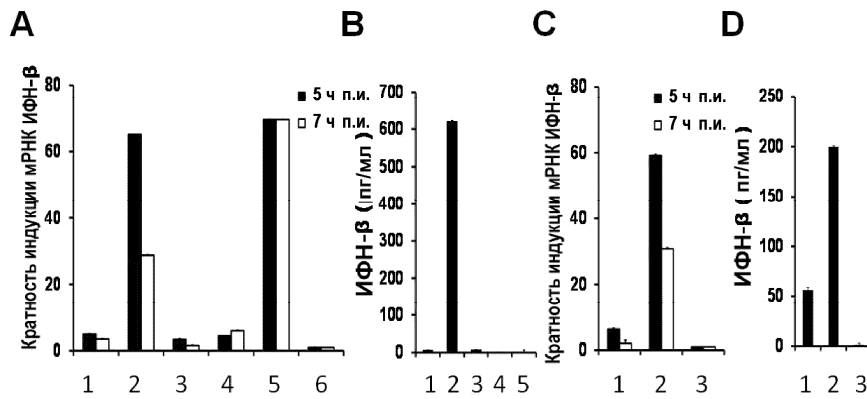
Фиг. 5



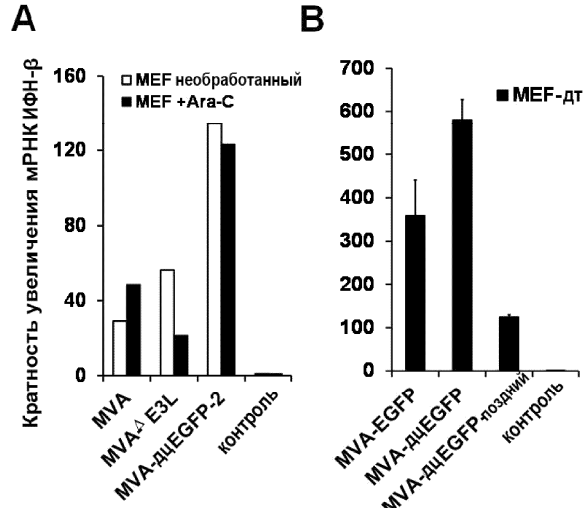
Фиг. 6А



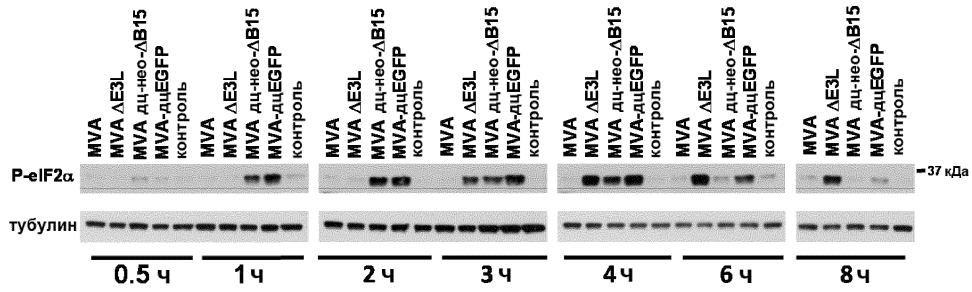
Фиг. 6В



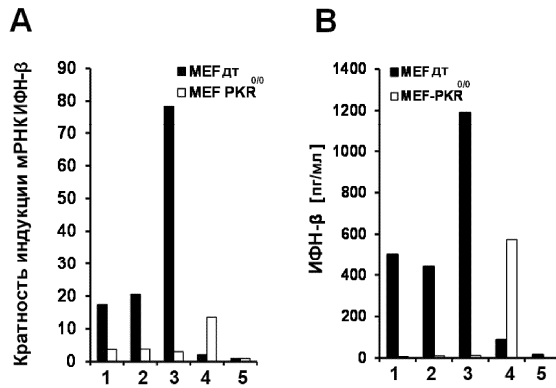
Фиг. 7



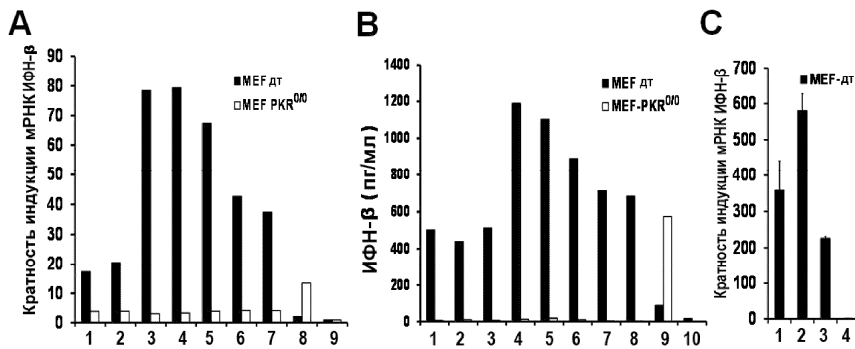
Фиг. 8



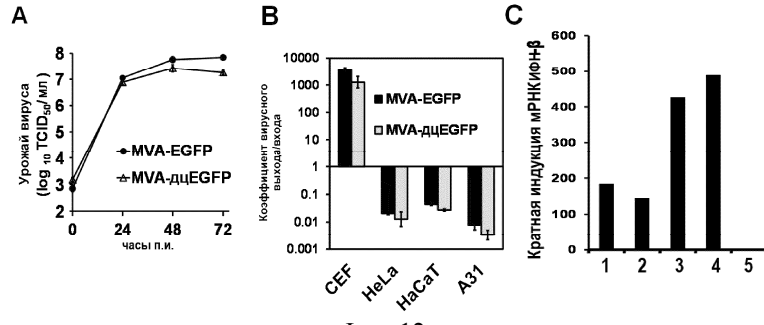
Фиг. 9



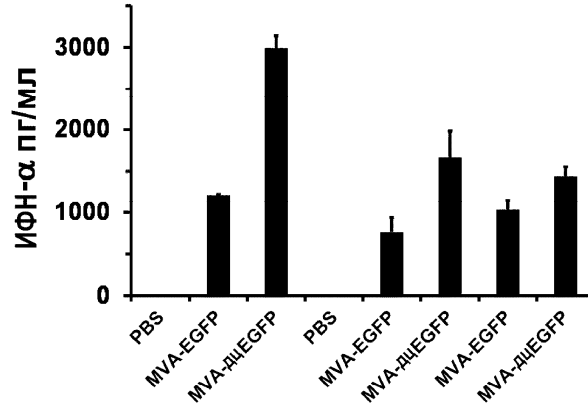
Фиг. 10



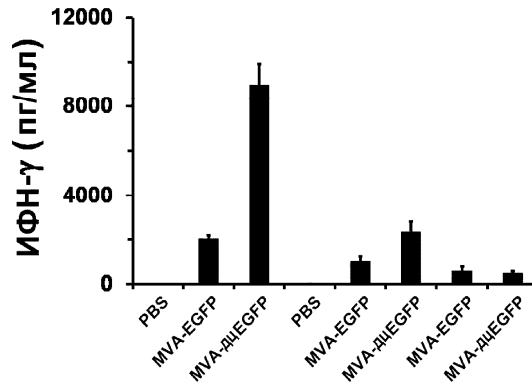
Фиг. 11



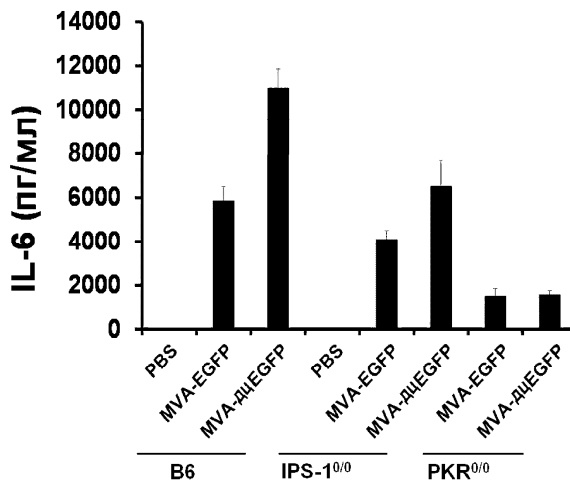
Фиг. 12



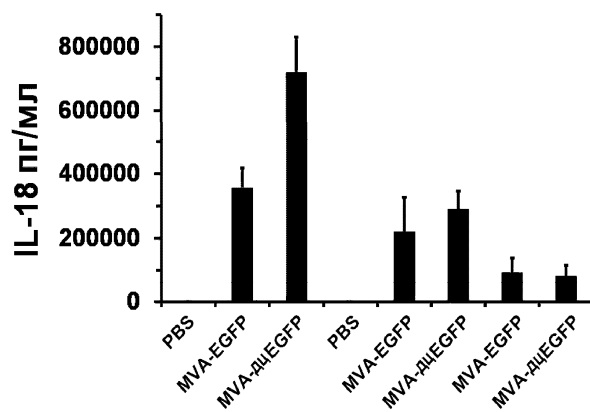
Фиг. 13А



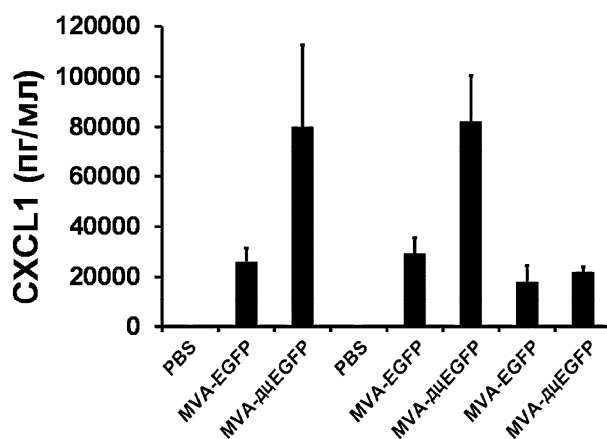
Фиг. 13В



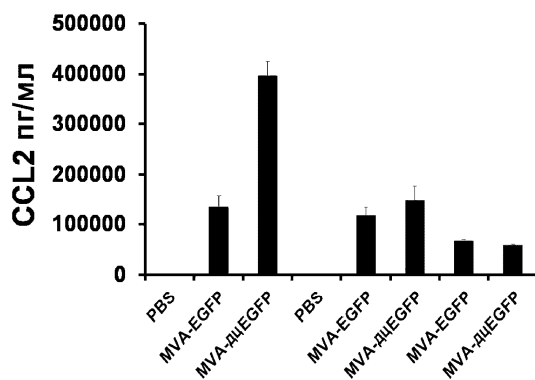
Фиг. 13С



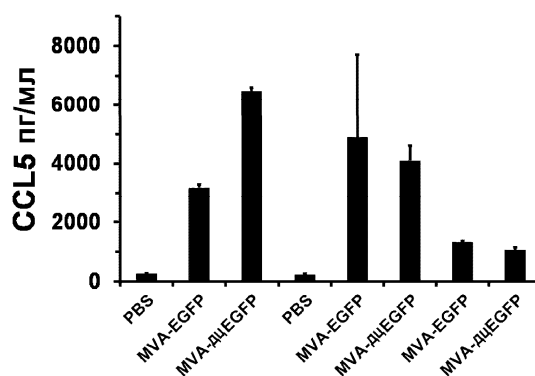
Фиг. 13D



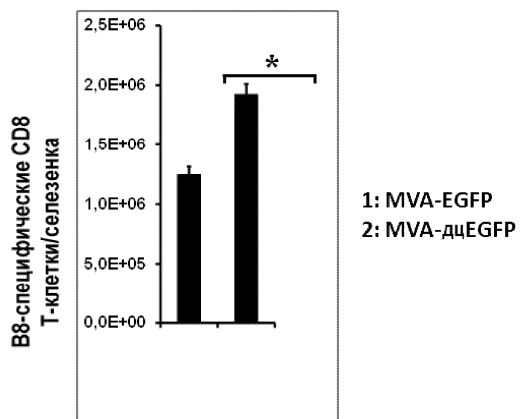
Фиг. 13E



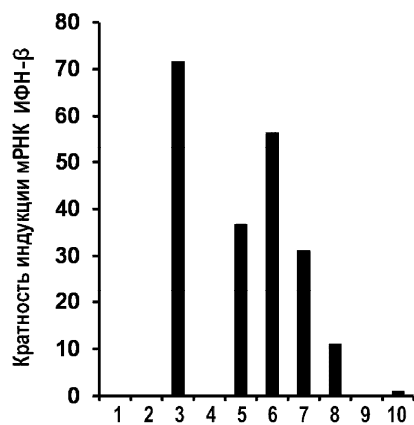
Фиг. 13F



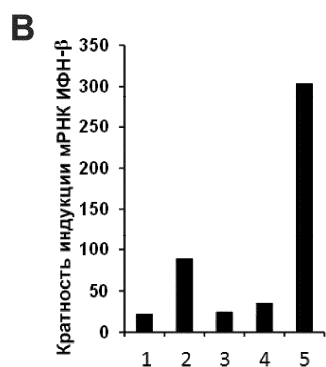
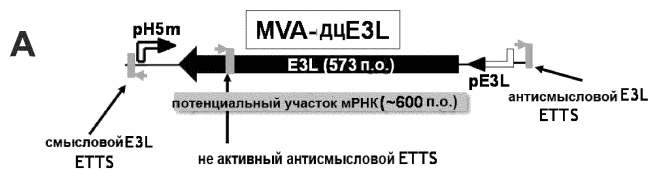
Фиг. 13G



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

Вирус оспы обезьян --MMKMMVRIYFVSL----SLLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTPAKDSK
 Вирус осповакцины-WR ---MTMKMMVHIYFVSL----LFFFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTPAKDSK
 Вирус осповакцины Копенгаген ---MTMKMMVHIYFVSL----LFFFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTPAKDSK
 CVA -MKMTMKMMVHIYFVSL----LFFFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTPAKDSK
 Вирус Эктромели MMKMTMKMMVRIYFVSLSLSLSLFFFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTPAKDSK
 Вирус оспы коров -MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLSLFFFHSYAI---DIENEITEFFN---KMKDTPAKDSK
 Вирус оспы верблюда -MKMTMKMMVHIYFVSL--LSLLLFHSYAI---DIENEITDFFN---KMKDILPTKDSK
 Вирус оспы свиней --MISIK---KYN-----ILLFIIISFIYCSADND--IDSLYE---GYKEFLDPKLLKQ
 Вирус оспы танапокс -----MK-----ITY-----ILLICKEIICDNSGDDMYDIANGNIDYLKIDNDIIN
 : * : : * : : . : : : : : . : . :

Вирус оспы обезьян WLNVPVCMFGGTMNDMAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
 Вирус осповакцины-WR WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
 Вирус осповакцины Копенгаген WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
 CVA WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
 Вирус Эктромели WLNPCSMFGGTMNDMAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYNDK-DNVVNWEKIGKTRR--PL
 Вирус оспы коров WLNPAACMFGGTMNDMAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYKDK-DNVVNWEKIGKTRR--PL
 Вирус оспы верблюда WLNPAACMFGGTTNDMAALGEPFSAKPPIEDSLLSHRYKKN-DNVVNWEKIGKTRR--PL
 Вирус оспы свиней FLNDNCTYRGYRDFFLYNEEPANIKCPLLNDILLRQKYH---NYTILWKKLGERSSR--L
 Вирус оспы танапокс LVNKNCSFREIKTFLAKENEVLMMLKCPQLDNYILPWKYMNRSEYTVTWKNI SNSTEY--N
 : * * : : * * * : : * * : : . : * : : . : . : * : : :

Фиг. 17А

Вирус оспы обезьян NKRVKHGDWLWIANYTSKFSNRRLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHVWKPSSCIPKTYELGT
 Вирус осповакцины-WR NKRVKHGDWLWIANYTSKFSNRRLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHIRKPPSCIPKTYELGTH
 Вирус осповакцины Копенгаген NKRVKHGDWLWIANYTSKFSNRRLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHIRKPPSCIPKTYELGTH
 CVA NKRVKHGDWLWIANYTSKFSNRRLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHIRKPPSCIPKTYELGTH
 Вирус Эктромели NRRVKNGDLWIANYTSNDSRRRLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHIRKPPSCIPETIYELGTH
 Вирус оспы коров NRRVKNGDLWIANYTSNDSRRRLCTVITKNGDCIQGVVR-SHVRKPPSCIPETIYELGTH
 Вирус оспы верблюда NRRVKNGDLWIANYTSNDSRRRLCTAITKNGDCIQGIR-SHVRKPPSCIPETIYELGTH
 Вирус оспы свиней LNTHGSI FLDFFPYKSELRGSVYECMIILNN-TCDFILKLNDIRSNPVCYHNDYK----
 Вирус оспы танапокс NTRIEENMLMFFPFYLNQAGSKYLCTVSTNK-SCDQSVVIVKKSFYSNMCLSEAK----
 * : : . * * : : * * : : . . * . :

Вирус оспы обезьян DKYGDIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDFKYSQAGK--ELIHNPELEDSGRYDC
 Вирус осповакцины-WR DKYGDIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTKG--ELIHNPELEDSGRYDC
 Вирус осповакцины Копенгаген DKYGDIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTKG--KLIHNPELEDSGRYDC
 CVA DKYGDIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTKG--KLIHNPELEDSGRYDC
 Вирус Эктромели DKYGDIDLYCGILYAKHYNNITWYKNNQELIIDGTYKYSQSGQ--NLIHNPELEDSGRYDC
 Вирус оспы коров DKYGDIDLYCGI IYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTKG--ELIHNPELEDSGRYDC
 Вирус оспы верблюда DKYGDIDLYCGI IYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTKG--ELIHNPELEDSGRYDC
 Вирус оспы свиней VHTNIEIFCNVNL-QYDYITWYKNNSEI IIDGYKYSNQSR--RLLVYNTTYNDSGIYYC
 Вирус оспы танапокс ENDNFELIYCGILHA-KYNTIKWFKKEKEITN-NYKYTKLGGYKGINVNTYSDSGKYVC
 . : : : * : : * : * . * : : * : * : * * : * : * * * * *

Фиг. 17В

Вирус оспы обезьян YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCSAVSTSL
 Вирус осповакцины-WR YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 Вирус осповакцины Копенгаген YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 CVA YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 Вирус Эктромели YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 Вирус оспы коров YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 Вирус оспы верблюда YVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVTPSQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
 Вирус оспы свиней NAYTTH--GKNYIISRRCSVSIHSHSYDFYIEHINNITYIDPDSENTQIYCKA-ISYS
 Вирус оспы танапокс EGYIDVLKNIYTAKRVCNLTVPINTYDFYIVDIPNVTYAKNNKLE-VNCTSFVDIN
 : . : * * : : : * : : . : : * : :

Вирус оспы обезьян FVDDVLI EWKNPS-GWIGLDFGVYSI-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTC
 Вирус осповакцины-WR LIDDVLI EWENPS-GWIGLDFDFVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
 Вирус осповакцины Копенгаген LIDDVLI EWENPS-GWIGLDFDFVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
 CVA LIDDVLI EWENPS-GWIGLDFDFVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
 Вирус Эктромели LVDDVLI DWENPS-GWIGLDFGVYSI-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTC
 Вирус оспы коров LVDDVLI EWENPS-GWIGLDFDFVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
 Вирус оспы верблюда LVDDVLI EWENPS-GWIGLDFDFVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
 Вирус оспы свиней NSSYI LTYWDEYGGYIYDNGI--YQYDNITLIGNEKVYMSILVLEKSAIYRVNNTFTC
 Вирус оспы танапокс SYDYILTSWLY--NGLYLPVGVRIYQLYSTDIFFENFIYRTSTLVFENVDISDDNKTFEC
 . : * * * * . * . : . : . : * : *

Фиг. 17С

Вирус оспы обезьян	RGHNYFDKTLTTTVVLE--
Вирус осповакцины-WR	RGHNYFEKTLTTTVVLE--
Вирус осповакцины Копенгаген	RGHNYFEKTLTTTVVLE--
CVA	RGHNYFEKTLTTTVVLE--
Вирус Эктромелии	RGHNYFDKTLTTTVVLE--
Вирус оспы коров	RGHNYFEKTLTTTVVLE--
Вирус оспы верблюда	RGHNYFEKTLTTTVVLE--
Вирус оспы свиней	LATSVYVEKKTTTTLVIKKT
Вирус оспы танапокс	EALSVTLKKIKYTTIKVEK-
 * ** : ::

Фиг. 17D

