



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.03.03

(21) Номер заявки

201790506

(22) Дата подачи заявки

2015.09.03

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

**(54) ФИЛОВИРУСНАЯ ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО
МОДИФИЦИРОВАННОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ АНКАРА (MVA)**

(31) 62/045,538; 62/055,154

(32) 2014.09.03; 2014.09.25

(33) US

(43) 2017.08.31

(86) PCT/EP2015/070161

(87) WO 2016/034678 2016.03.10

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

(72) Изобретатель:
**Фолькманн Ариане, Штайгервальд
Робин, Хохрайн Хубертус, Дирмайер
Ульрике, Лаутербах Хеннинг,
Хаусманн Юрген (DE)**

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

(56) WO-A1-2014037124
HENNING LAUTERBACH ET AL.: "Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), XP055173263, ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2013.00251 abstract page 4, right-hand column, paragraph 2

RIMMELZWAAN G. F. ET AL.: "Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara", EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 8, no. 4, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 447-454, XP009145846, ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/ERV.09.4 page 448, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 449, right-hand column, paragraph 2

MICHAEL C. KEEFER ET AL.: "A phase I trial of preventive HIV vaccination with heterologous poxviral-vectors containing matching HIV-1 inserts in healthy HIV-uninfected subjects", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 29, no. 10, 20 December 2010 (2010-12-20), pages 1948-1958, XP028147197, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.12.104 [retrieved on 2010-12-30] abstract Discussion

HODGE J. W. ET AL.: "Harnessing the unique local immunostimulatory properties of modified vaccinia Ankara (MVA) virus to generate superior tumor-specific immune responses and antitumor activity in a diversified prime and boost vaccine regimen", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, no. 33, 16 July 2009 (2009-07-16), pages 4475-4482, XP026238172, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.05.017 [retrieved on 2009-05-29] abstract Discussion

ELISA SOPRANA ET AL.: "Joint production of prime/boost pairs of Fowlpox Virus and Modified Vaccinia Ankara recombinants carrying the same transgene", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 174, no. 1, 9 March 2011 (2011-03-09), pages 22-28, XP028207572, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2011.03.013 [retrieved on 2011-03-16] abstract Discussion

CLAIRE L. HUTCHINGS ET AL.: "Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 12, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 5819-5826, XP009123837, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00828-07 abstract

K. L. WARFIELD ET AL.: "Advances in Virus-Like Particle Vaccines for Filoviruses", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, JID, vol. 20432-46, 90, 91, 92-100, no. suppl 3, 10 October 2011 (2011-10-10), pages S1053-S1059, XP055256469, CHICAGO, IL. ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1093/infdis/jir346 abstract

(57) Изобретение связано с усовершенствованной филовиральной вакциной, содержащей вакцину на основе рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA основе) против филовиральной инфекции и имеющие к ней отношения продукты, способы и применения. В частности, настоящее изобретение связано с генетически спроектированными (рекомбинантными) векторами MVA и FPV, содержащими по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту гликопротеина вируса Марбург (MARV) или вируса Эбола. В частности, изобретение связано с рекомбинантным MVA, содержащим гликопротеин вируса Эбола и белок 40 вириона. Изобретение также связано с продуктами, способами и их применениями, также как и с приммирующими/бустирующими

режимами MVA и генетически спроектированными (рекомбинантными) FPV, например, подходящими для вызова защитного иммунного ответа у субъекта.

039715 B1

039715 B1

Область техники

Изобретение связано с усовершенствованием филовиральной вакцины, содержащей вакцину на основе рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA основе) против филовиральной болезни и имеющие к ней отношения продукты, способы и применения. В частности, настоящее изобретение связано с генетически спроектированными (рекомбинантными) векторами MVA, содержащими гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального белка. Настоящее изобретение также связано со способами вакцинации, в частности, гомологичными и гетерологичными примированиями-бустированиями режимами вакцинации, с применением двух вирусных векторных композиций. Более детально, изобретение связано с рекомбинантным MVA для использования в гомологичном примирования-бустирования режиме вакцинации, и/или рекомбинантным MVA и рекомбинантным вирусом оспы кур (FPV), для использования в гетерологичном примирования-бустирования режиме вакцинации. Изобретение также связано с продуктами, способами и их применениями, например, подходящими для вызова иммунного ответа у субъекта.

Уровень техники

Филовирусы представляют собой покрытые оболочкой, несегментированные вирусы с минусцепью РНК из семейства вирусов Filoviridae. На сегодняшний день были выявлены два члена этого семейства вирусов: вирус Марбург (MARV) и вирус Эбола (EBOV). Филовирусы являются чрезвычайно вирулентными, легко передающимися от человека к человеку, и чрезвычайно смертоносными, вызывают сильную геморрагическую лихорадку у людей и низших приматов. Филовирусные инфекции имеют уровень смертности у людей, варьирующий от 23 до 90%. Несмотря на их заразности и летальности, впрочем, не существует официально одобренного лечения или профилактической вакцины.

Во время вспышек болезней, изоляции больных, и применения защитной одежды и дезинфицирующих процедур (совместно называемые изоляционными мерами предосторожности или барьерными методами защиты персонала относительно вирусной геморрагической лихорадки (ВГЛ)) было достаточно, чтобы прервать дальнейшую передачу вируса Марбург или вируса Эбола, и таким образом проконтролировать и прекратить вспышку болезни. Так как не существует никакого известного эффективного лечения геморрагических лихорадок, вызванных филовирусами, предотвращение передачи через применение ВГЛ изоляционных мер предосторожности в настоящее время является единственным доступным средством для контроля эпидемий филовирусов.

Первый филовирус был распознан в 1967 году после того, как у некоторого числа лабораторных работников в Германии и Югославии, работающих с тканями африканских зеленых мартышек, развилась тяжелая геморрагическая лихорадка. В общей сложности с этими вспышками болезней было связано семь смертей и 31 случай заражения. Вирус был назван вирусом Марбург (MARV) в соответствии с городом Марбург, Германия, месте одной из вспышек болезни. После первых вспышек болезни, вирус исчез и не появлялся вплоть до 1975 года, когда путешественник, скорее всего инфицированный в Зимбабве, заболел в Йоханнесбурге, Южная Африка; спутник путешественника и медсестра также были заражены. С того времени были идентифицированы несколько спорадических случаев геморрагической лихорадки Марбург (ГЛМ), но болезнь по-прежнему остается относительно редкой.

Второй филовирус, вирус Эбола (EBOV), был впервые выявлен в 1976 году, когда две вспышки геморрагической лихорадки Эбола (ГЛЭ) произошли в Северном Заире (ныне Демократическая Республика Конго) и Южном Судане. Во вспышке болезней были вовлечены вирусы, которые в конечном итоге оказались двумя разными видами вируса Эбола, и которые были названы в честь стран, в которых они были обнаружены. Было доказано, что оба вируса являются чрезвычайно смертельными, так как 90% случаев в Заире и 50% случаев в Судане привели к смерти зараженных. Начиная с 1976, вирус Эбола спорадически возникал в Африке, вместе с несколькими мелкими и средними вспышками болезней, подтвержденными в 1976-1979 годах, и снова в Габоне в 1994-1996 годах. Крупные эпидемии ГЛ Эболы случались в Киквите, Заир, в 1995 году, и в Гулу, Уганда, в 2000 году.

Оказывается, что филовирусы передаются человеку в процессе жизнедеятельности одного или более животных, не относящихся к человеку. Несмотря на многочисленные попытки обнаружить природный источник или источники вирусов Эбола и Марбург, их происхождение остается загадочным. Следовательно, также остается неясным, как именно вирус передается из природного(ых) источника(ов) людям. После того как человек был инфицирован, дальнейшее заражение происходит путем передачи от человека к человеку. В частности, передача предполагает тесный личный контакт между инфицированным человеком или его биологическими жидкостями и другим человеком. Во время зафиксированных вспышек геморрагической лихорадки, вызванной филовиральной инфекцией, люди, которые заботились об инфицированных (т.е., которые кормили, мыли, лечили) или очень тесно работали с инфицированными, подвергались особому риску заразиться самим. Нозокомиальная (больничная) передача через контакт с инфицированными жидкостями организма (т.е. через повторное использование нестерилизованных шприцев, игл и другого медицинского оборудования, загрязненного такими жидкостями) также является важным фактором в распространении болезни. Минимизация тесного контакта между неинфицированными и инфицированными пациентами, как правило, сокращает количество новых заражений людей во время эпидемии. Хотя филовирусы проявили некоторые способности заражения через малые частицы

аэрозолей в лаборатории, воздушно-капельное распространение среди людей не было четко продемонстрировано.

До настоящего времени было выявлено пять штаммов вируса Эбола, и они были названы в честь мест их первого появления: Bundibugyo (BEBOV), d'Ivoire Cote (EBOV-CdI, также обозначенный как Tai Forest virus или TAFV), Reston (EBOV-Reston), Sudan (SEBOV), и Zaire (ZEBOV); штаммы Zaire, Sudan и Bundibugyo, как правило, связаны с заболеваемостью и смертями людей. Ebola-Reston является единственным известным филовиром, который не вызывает тяжелого заболевания у людей, хотя он может быть смертельным для обезьян. До настоящего времени было идентифицировано несколько штаммов вируса Марбург, вместе с штаммом Musoke, имеющим самый высокий показатель смертности. См. фиг. 1.

В структурном плане, вирионы филовирусов могут встречаться в нескольких формах, в том числе длинных, иногда разветвленных волокон, а также коротких волокон, в форме цифры "6", в форме буквы "U", или в форме круга. Вирусные волокна могут достигать 14 микрометров (мкм) в длину, имеют равномерный диаметр равный 80 нанометрам (нм), и упакованы в липидную мембрану. Каждый вирион содержит одну молекулу одноцепочечной антисмысловой РНК, длина которой составляет примерно 19 тысяч пар оснований (кб), и которая содержит семь последовательно расположенных генов в таком порядке: ген нуклеопротеина (NP), ген белка 35 вириона (VP35), ген белка 40 вириона (VP40), ген гликопротеина оболочки (GP), ген белка 30 вириона (VP30), ген белка 24 вириона (VP24), и ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (L). При входе в цитоплазму клетки-хозяина, РНК транскрибируется для создания полиаденилированных, субгеномных видов мРНК, кодирующих белки. Транскрипция и трансляция приводят к синтезу семи структурных полипептидов, с предполагаемыми одинаковыми функциями для каждого из различных филовирусов. Четыре белка (NP, VP30, VP35 и L) объединены с вирусной геномной РНК в нуклеокапсидный комплекс. Три оставшихся структурных белка являются мембран-связанными; GP представляет собой трансмембранный белок I типа, а VP24 и VP40, вероятно, находятся на внутренней стороне мембраны. Гликопротеин оболочки (GP) включен в вирусную оболочку в качестве гомотримера (также называется 'пепломер'), состоящего из трех копий гетеродимера. Гетеродимер содержит два фрагмента полноразмерного предшественника GP (называется 'GP0'), известных также как 'GP1' и 'GP2', созданных путем расщепления фурином. GP1 и GP2 связаны дисульфидной связью. Неструктурный, секретлируемый гликопротеин (sGP) экспрессируется EBOV, но не MARV (H. Feldmann & M.P. Kiley, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 235:1-21 (1999)). Новые вирусные частицы создаются путем отпочкования от поверхности клеток-хозяев (см. ниже).

Жизненный цикл филовirusа начинается с прикрепления вириона к специфическим клеточным поверхностным рецепторам, после чего происходит слияние оболочки вириона с клеточной мембраной и высвобождение нуклеокапсида вируса в цитозоль. Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RNAP, также известная как белок 'L') частично раскрывает нуклеокапсид и транскрибирует гены в плюс-цепи мРНК, которые затем транслируются в структурные и неструктурные белки. См. фиг. 2 RNAP связывается с единственным промотором, который расположен на 3'-конце генома. Транскрипция либо прекращается после прохождения гена, или переходит к следующему по порядку гену, и это означает, что гены расположенные близко к 3'-концу генома транскрибируются в избытке, а те, что расположены около 5'-конца генома транскрибируются с меньшей вероятностью. Поэтому, порядок расположения генов является простой, но эффективной формой регуляции транскрипции. Нуклеопротеин (NP) является белком, который вырабатывается в наибольшем количестве, и клеточная концентрация которого определяет, когда RNAP переключается с транскрипции генов на репликацию генома. Результатом репликации являются полноразмерные, плюс-цепь анти-геномы, которые в свою очередь транскрибируются в минус-цепь вирусное потомство геномных копий. Вновь синтезированные структурные белки и геномы самостоятельно собираются и аккумулируются возле внутренней стороны клеточной мембраны. Вирусные частицы упаковываются во время того, как они отпочковываются от зараженной клетки-хозяина, порождая зрелые инфекционные вирионы.

Предшествующие разработки вакцины

Было оценено множество стратегий в ходе попыток разработать безопасную, иммуногенную вакцину, которая способна индуцировать защитный иммунитет против инфекции, вызванной одним или более видом филовирусов, с явно разнородными результатами. Обзор кратко изложен в Марци и Фельдман (A. Marzi and H. Feldmann Expert Rev. Vaccines 13(4):521-531 (2014)). Например, не смотря на то, что трехвалентная ДНК-вакцина, состоящая из трех ДНК-плазмид, одна из которых экспрессирует гликопротеин оболочки с ZEBOV, вторая экспрессирует гликопротеин оболочки с SEBOV, а третья экспрессирует нуклеопротеин с ZEBOV, была безопасна, имунногенна, и способна вызывать антигенный ответ против по меньшей мере одного из трех антигенов в организме человека ответы CD8+ Т-клеток наблюдались в менее чем 1/3 привитой популяции (J.E. Martin et al., Clin. Vaccine Immunol. 13(11):1267-1277 (2006)). Аналогично, сложная, пентавалентная "пан-филовиральная" вакцина на основе аденовируса, содержащая смесь из четырех разных рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих гликопротеины оболочки из ZEBOV, SEBOV, Marburg-Ci67 (штамм Ratayczak), Marburg-Musoke, и Marburg-Ravn, а также нуклеопротеины из ZEBOV и Marburg-Musoke, защищала низших приматов от ZEBOV или MARV заражения, и

индуцировала выработку антител на оба типа вируса, хотя остается неясным, индуцировала ли вакцина любой CD8+ Т-клеточный ответ (D.L. Swenson et al., Clin. Vaccine Immunol. 15 (3) :460-467 (2008)).

Интраназальное введение рекомбинантного вируса парамиксовирус - вирус парагриппа человека, серотипа 3 (HPIV3) экспрессирующего либо гликопротеин оболочки или как гликопротеин оболочки, так и нуклеопротеин из ZEBOV, защищал морских свинок от последующего заражения EBOV. Модели с использованием грызунов предоставляют результаты, которые плохо экстраполируются на приматов, с рядом предыдущих вакцин-кандидатов EBOV, которые были эффективны для грызунов, и совершенно неэффективны для низших приматов (A. Bukreyev et al., J. Virol. 80(5) :2267-2279 (2006)). Интраназальное введение рекомбинантного HPIV3, экспрессирующего или гликопротеин оболочки, или как гликопротеин оболочки так и нуклеопротеин из ZEBOV, макакам-резус показало, что любая конструкция, экспрессирующая гликопротеин оболочки была умеренно иммуногенной, и защищала более 80% животных от болезни после пост-вакцинирующих заражений с помощью ZEBOV (A. Bukreyev et al., J. Virol. 81(12):6379-6388 (2007)). В заключение, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (VSV), в котором гликопротеин VSV был заменен на гликопротеин оболочки ZEBOV, защищал 50% морских свинок, 100% мышей, которых лечили так поздно как 24 ч после заражения, в противном же случае наблюдалось поголовная смертельная инфекция. Четыре из восьми макак-резус (50%) были защищены, когда поддавались лечению от 20 до 30 мин после воздействия, предоставляя возможность постконтактной терапии при заражении вирусом Эбола (H. Feldmann, PLoS Pathogens 3(1):54-61 (2007)).

Геисберт и соавт. оценили эффекты стратегий вакцинаций, которые защищали мышей или морских свинок от летальной инфекции EBOV у низших приматов. Они использовали РНК частицы репликона, полученные из ослабленного штамма венесуэльского лошадиного вируса (VEEV), экспрессирующего гликопротеин и нуклеопротеин EBOV, рекомбинантный вирус осповакцины (VACV), экспрессирующий гликопротеин EBOV, липосомы, содержащие инактивированный EBOV, и концентрированные, инактивированные препараты цельных вирионов. Они обнаружили, что ни одна из этих стратегий успешно не защитила приматов от тяжелого заражения EBOV (T.H. Geisbert et al., Emerging Infectious Diseases 8(3):503-507 (2002)).

Другие использовали Вирус-Подобные Частицы (ВПЧ), экспрессированные в клетках млекопитающих, бактерий, растений или клетках насекомых, как нереплицируемые субъединичные вакцины (D.L. Swenson et al., Vaccine 23:3033-3042 (2005); K. L. Warfield et al., JID 196 (2): 430-437 (2007), N. Kushnir et al., Vaccine 31(1):58-83 (2012), K. L. Warfield ET AL., PLOS ONE 10 (3) :e0118881 (2015), K. L. Warfield and M.J. Aman JID 204:1053-1059 (2011), V.M. Wahl-Jensen et al., J Virol. 79 (16) :10442-10450 (2005), WO 2003/039477, WO 2006/046963, WO 2006/073422, WO 2004/042001, US 8900595, US 7211378) чтобы вызвать выработку антител. Однако филовиральные ВПЧ требуют дорогостоящего и сложного процесса производства, и их длительное хранение должно обеспечиваться при комнатной температуре в течение длительного периода.

Таким образом, после траты большого количества времени и усилий, на доклинических стадиях появилось лишь несколько перспективных вакцин-кандидатов, но в настоящее время нет утвержденной профилактической вакцины. С учетом заразности и летальности филовиральной инфекции, существует настоятельная необходимость в создании эффективной вакцины.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении обнаружено, что различные примирования-бустирования комбинации репликативно-неполных и репликативно-неспособных векторов порождают эффективную иммунную защиту против филовиральной инфекции.

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

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с комбинированной вакциной, содержащей:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере двух филовиральных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая компози-

ция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с набором, содержащим:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с набором, содержащим:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с рекомбинантным вектором на основе модифицированного вируса осповакцины (MVA), содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую две или более антигенные детерминанты филовирусного белка для применения в лечении и/или профилактике вызванного филовирусом заболевания. В еще одном аспекте, настоящее изобретение связано с рекомбинантным вектором MVA, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный белок филовирусного гликопротеина и кодирующую филовирусный белок 40 вириона (VP40) для применения в лечении и/или профилактике вызванного филовирусом заболевания. В другом варианте реализации изобретения, изобретение связано с рекомбинантным вектором MVA, содержащим нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из: а) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:30; б) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:30; и в) SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:33. В некоторых аспектах, изобретение связано с: фармацевтической композицией, содержащей вектор MVA; вакциной, содержащей указанный рекомбинантный вектор MVA; лекарственным препаратом, содержащим указанный рекомбинантный вектор MVA и фармацевтический носитель, растворитель и/или добавку; и клеткой, содержащей указанный рекомбинантный вектор MVA. В некоторых аспектах, изобретение связано с указанным рекомбинантным вектором MVA для применения как лекарственного средства или вакцины для лечения и/или предотвращения филовирусного заболевания у субъекта, и способ для воздействия на иммунный ответ у субъекта, содержащего введенный субъекту указанный рекомбинантный вектор MVA. В дополнительном аспекте, настоящее изобретение связано с набором, содержащим указанный рекомбинантный вектор MVA в первой ампуле или контейнере для первого введения (примирование) и во второй ампуле или контейнере для второго введения (бустирование).

Настоящее изобретение также связано с рекомбинантным вектором FPV, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирусного белка (например любого из филовирусных белков как упоминалось выше или ниже, предпочтительно филовирусного гликопротеина оболочки) под контролем промотора FPV-40K, имеющего SEQ ID NO:26. В дополнительном аспекте, настоящее изобретение связано с рекомбинантным вектором на основе вируса оспы кур (FPV), содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую одну, две или более антигенные детерминанты филовирусного белка для применения в лечении и/или профилактике вызванного филовирусом заболевания. В некоторых аспектах, изобретение связано с: фармацевтической композицией, содержащей вектор FPV; вакциной, содержащей указанный рекомбинантный вектор FPV; лекарственным препаратом, содержащим указанный рекомбинантный вектор FPV и фармацевтический носитель, растворитель и/или добавку; и клеткой, содержащей указанный рекомбинантный вектор FPV. В некоторых аспектах, изобретение связано с указанным рекомбинантным вектором FPV для применения как лекарственного средства или вакцины для лечения и/или предотвращения филовирусного заболевания у субъекта, и способ для воздействия на иммунный ответ у субъекта, содержащего введенный субъекту указанный рекомбинантный вектор FPV.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с комбинированной вакциной, содержащей:

а) иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) иммунологически эффективное количество вектора FPV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

мым носителем;

при этом один из векторов представляет собой примирующую вакцину, а другой вектор представляет собой вакцину для бустирования.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение связано с комбинированной вакциной, содержащей:

а) иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовиральных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) иммунологически эффективное количество одного или более дополнительных векторов MVA, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом один из векторов MVA представляет собой примирующую вакцину, а другие векторы MVA представляют собой вакцину для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано с комбинированной вакциной, содержащей:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; или

в) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; и

г) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора FPV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано со способом вызова иммунного ответа против филовируса у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение связано со способом вызова иммунного ответа против филовируса у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовиральных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

Изобретение также охватывает способ создания рекомбинантного вектора MVA для применения в лечении и/или профилактике вызванного филовиром заболевания, включающий этапы, в которых:

а) инфицируют клетку-хозяина вирусом MVA,

б) трансфицируют инфицированную клетку рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту какого-либо из филовиральных белков по какому-либо из вариантов реализации изобретения; указанная нуклеотидная последовательность дополнительно содержит геномную последовательность вируса MVA, способна направлять встраивание по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности в геном вируса MVA, и

в) идентифицируют, изолируют и при необходимости очищают созданный рекомбинантный вирус MVA.

В другом варианте реализации изобретения, порядок этапов а) и б) способа создания рекомбинантного вектора MVA по любому из выше указанных вариантов реализации изобретения может быть изменены таким образом, что этап б) является первым этапом, а а) - вторым.

Изобретения также охватывает способ создания рекомбинантного вектора FPV для применения в лечении и/или профилактике вызванного филовиром заболеванием, включающий этапы, в которых:

- а) инфицируют клетку-хозяина FPV вирусом,
- б) трансфицируют инфицированную клетку рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту какого-либо из филовиральных белков по какому-либо из вариантов реализации изобретения; указанная нуклеотидная последовательность дополнительно содержит геномную последовательность FPV вируса, способна направлять встраивание по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности в геном FPV вируса, и
- в) идентифицируют, изолируют и при необходимости очищают созданный рекомбинантный FPV вирус.

В другом варианте реализации изобретения порядок этапов а) и б) способа создания рекомбинантного вектора FPV по любому из выше указанных вариантов реализации изобретения может быть изменен таким образом, что этап б) является первым этапом, а а) - вторым.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение связано со способом вызова иммунного ответа против филовируса у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

- а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; и
- б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; или
- в) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка; и
- г) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора FPV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одну антигенную детерминанту филовирального белка;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано со способом обеспечения иммунного ответа или защитного иммунного ответа у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

- а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и
- б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано со способом обеспечения иммунного ответа или защитного иммунного ответа у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

- а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовиральных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и
- б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано со способом продуцирования филовиральных частиц у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

- а) иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального гликопротеина и филовирального белка 40 вириона (VP40), вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и
- б) иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур или вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом один из векторов представляет собой примирующую вакцину, а другой вектор представляет собой вакцину для бустирования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение связано со способом продуцирования филовиральных частиц у субъекта, включающим стадию, в которой субъекту вводят:

- а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, со-

держашего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере одного филовирального гликопротеина и филовирального белка 40 вириона (VP40), вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора FPV или вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В дополнительном аспекте, изобретение связано со способом вызова бустирования против филовируса у субъекта, включающего стадию, в которой продуцируют филовирус-подобные частицы в субъекте путем введения субъекту:

а) иммунологически эффективного количества вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального гликопротеина и филовирального белка 40 вириона (VP40), вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) иммунологически эффективного количества вектора на основе вируса оспы кур или вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

при этом один из векторов представляет собой примирующую вакцину, а другой вектор представляет собой вакцину для бустирования.

В дополнительном аспекте изобретение связано со способом вызова бустирования против филовируса у субъекта, включающий стадию, в которой продуцируют филовирус-подобные частицы в субъекте путем введения субъекту:

а) первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере одного филовирального гликопротеина и филовирального белка 40 вириона (VP40), вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора FPV или вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

Краткое описание графических материалов

Сопровождающие графические материалы, которые включены в и составляют часть этой спецификации, иллюстрируют несколько вариантов осуществления изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов изобретения.

Фиг. 1 иллюстрирует филогенетическое дерево, изображающие взаимосвязи между различными выявленными штаммами филовирусов. Дерево было построено с использованием кодирующих областей генов гликопротеина оболочки (GP) и способа максимальной парсимонии. Оба штамма Ravn и Ratauczak вируса Марбург имели летальность равную 23%, в то время как штаммы Musoke и Angola имели летальности в диапазоне от 50 до 88%. Штамм Sudan имел летальность равную 41-65%, а штамм Zaïre имел летальность равную 57-90%. Оба штамма Cote d'Ivoire и Reston не вызывают болезнь у человека, хотя штамм Reston вызывал заболевание у свиней.

Фиг. 2 иллюстрирует структуру и генетическую организацию филовирального генома.

Фиг. 3А иллюстрирует структуру и генетическую организацию MVA-mBN252B. Фиг. 3Б иллюстрирует структуру и генетическую организацию MVA-mBN22 6B. Фиг. 3В иллюстрирует структуру и генетическую организацию MVA-mBN2 54A, в том числе селекционный маркер. Фиг. 3Г иллюстрирует структуру и генетическую организацию MVA-mBN368A, в том числе селекционный маркер.

Фиг. 4А иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBNX186. Фланг 1 (F1 IGR 88/89) и фланг 2 (F2 IGR 88/89) представляют собой последовательности MVA-BN расположенные по сторонам IGR 88/89. F1 IGR 88/89 и F2 IGR 88/89 применяются для вставки кассеты экспрессии и селекционной кассеты (NPT II и eGFP) в MVA-BN в случае гомологичной рекомбинации. Были соединены ген селекции Неомидин Фосфотрансфераза (NPT II) и ген усиленного Зеленого Флуоресцентного Белка (eGFP) E. coli через внутренний рибосомальный сайт вхождения (IRES), и вставлены под контролем сильного синтетического поксивирусного промотора (PrS) в целях обеспечения отбора рекомбинантных вирусов. F2 и F2-последовательности повторов IGR 88/89 фланкируют селекционную кассету, делая возможным удаление селекционной кассеты с помощью гомологичной рекомбинации в отсутствие селективного давления. Фиг. 4Б иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBNX197. Фланг 1 (F1 IGR 148/149) и фланг 2 (F2 IGR 148/149) представляют собой последовательности MVA-BN расположенные по сторонам IGR 148/149. F1 IGR 148/149 и F2 IGR 148/149 применяются для вставки кассеты экспрессии и селекционной кассеты (GPT и RFP) в MVA-BN в случае гомологичной рекомбинации. Ген селекции по чувствительности к лекарственному препарату Гуанин-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) E. coli и ген Красного Флуоресцентного Белка (RFP) были вставлены

в виде слитого гена под контролем сильного синтетического поксивирусного промотора (PrS) в целях обеспечения отбора рекомбинантных вирусов. LoxP последовательности фланкируют селекционную кассету, делая возможным Cre рекомбиназо-опосредованное удаление селекционной кассеты. Фиг. 4В иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN274, которая экспрессирует Cre рекомбиназу. Фиг. 4Г иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBNX221. Фланг 1 (F1 IGR BamHI J FowlPox) и фланг 2 (F2 IGR BamHI J FowlPox) представляют собой последовательности FPV, размещенные по сторонам инсерционного сайта BamHI J. F1 IGR BamHI J FowlPox и F2 IGR BamHI J FowlPox применяются для вставки кассеты экспрессии и селекционной кассеты (GPT и RFP) в FPV в случае гомологичной рекомбинации. Ген селекции по чувствительности к лекарственному препарату Гуанин-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) *E. coli* и ген Красного Флуоресцентного Белка (RFP) были вставлены в виде слитого гена под контролем сильного синтетического поксивирусного промотора (PrS) в целях обеспечения отбора рекомбинантных вирусов. LoxP последовательности фланкируют селекционную кассету, делая возможным Cre рекомбиназо-опосредованное удаление селекционной кассеты. Фиг. 4Д иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBNX214. Фланг 1 (F1 IGR 148/149) и фланг 2 (F2 IGR 148/149) представляют собой последовательности MVA-BN расположенные по сторонам IGR 148/149. F1 IGR 148/149 и F2 IGR 148/149 применяются для вставки кассеты экспрессии и селекционной кассеты (GPT и RFP) в MVA-BN в случае гомологичной рекомбинации. pBNX214 уже включает PrS5E промотор для экспрессии трансгенов. Ген селекции по чувствительности к лекарственному препарату Гуанин-Ксантин-Фосфорибозил-Трансфераза (GPT) *E. coli* и ген Красного Флуоресцентного Белка (RFP) были вставлены в виде слитого гена под контролем сильного синтетического поксивирусного промотора (PrS) в целях обеспечения отбора рекомбинантных вирусов. LoxP последовательности фланкируют селекционную кассету, делая возможным Cre рекомбиназо-опосредованное удаление селекционной кассеты.

Фиг. 5А иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN433. GP-MARV-Musoke был вставлен под контролем промотора PrS в BspEI/NheI сайт pBX197. Кроме того, плазида также содержит ДНК последовательности MVA-BN, фланкирующие IGR 148/149 MVA-BN генома и loxP-фланкированную селекционную кассету. loxP сайты позволяют позднее выбрасывание селекционной кассетой с помощью Cre рекомбиназо-опосредованной рекомбинации. Фиг. 5Б иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN384. Гены гликопротеинов вируса Эбола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) и вируса Марбург Musoke (GP-MARV-Musoke) были вставлены под контролем промоторов Pr7.5 и PrS в MluI/NheI сайты pBNX197. Кроме того, плазида также содержит ДНК последовательности MVA-BN, фланкирующие IGR 148/149 MVA-BN генома и loxP-фланкированную селекционную кассету. loxP сайты позволяют позднее выбрасывание селекционной кассетой с помощью CRE рекомбиназо-опосредованной рекомбинации. Фиг. 5В иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN385. Ген гликопротеина вируса Эбола Sudan (GP-SEBOV) и нуклеопротеина вируса Эбола Cote d'Ivoire (NP-EBOV-CdI) были вставлены под контролем синтетических промоторов PrS и ® в MluI/NheI сайты pBNX186. Кроме того, плазида также содержит последовательности ДНК MVA-BN, фланкирующие IGR 148/149 MVA-BN генома и селекционную кассету, фланкированную сайтами F2 и F2trp, которые позволяют позднее выбрасывание селекционной кассеты с помощью гомологичной рекомбинации в отсутствие селективного давления. Фиг. 5Г иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN436. Ген гликопротеина вируса Эбола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) были вставлены в BspEI/NotI сайты pBNX214 под контролем PrS5E промотора. Кроме того, плазида также содержит ДНК последовательности MVA-BN, фланкирующие IGR 148/149 MVA-BN генома и loxP-фланкированную селекционную кассету. loxP сайты позволяют позднее выбрасывание селекционной кассетой с помощью Cre рекомбиназо-опосредованной рекомбинации. Фиг. 5Д иллюстрирует структуру и генетическую организацию плазмиды pBN555. Ген гликопротеина вируса Эбола Zaire-Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga) под контролем под контролем промотора FPV-40K был вставлен в MluI/NotI сайты pBNX221. Кроме того, плазида также содержит ДНК последовательности FPV, фланкирующие инсерционный сайт BamHI J генома FPV и loxP-фланкированную селекционную кассету. loxP сайты позволяют позднее выбрасывание селекционной кассетой с помощью Cre рекомбиназо-опосредованной рекомбинации.

Фиг. 6 иллюстрирует уровни антител против GP в яванских макаках, после вакцинации MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B), как было измерено с помощью ИФА. Животные были вакцинированы дважды в течение четырех недель MVA-BN-Filo (в День -42 и День -14), и кровь брали с интервалами для анализа с помощью ИФА: перед вакцинацией (День -42, красная кривая (1)), после первой но перед второй вакцинацией (День -14, зеленая кривая (2)), и после второй вакцинации (День -5, оранжевая кривая (3)). График слева демонстрирует специфические антитела к Marburg GP в сыворотке, график посередине демонстрирует специфические антитела к Ebola Zaire GP в сыворотке, и график справа демонстрирует специфические антитела к Ebola Sudan GP в сыворотке. Гипериммунная сыворотка из яванских макаков, иммунизированных либо Marburg Angola GP (левый график), Ebola Zaire GP (средний график), или Ebola Sudan GP (правый график) была использована в качестве положительного контроля в каждом ИФА.

Фиг. 7 иллюстрирует результаты вакцинации с помощью MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B), после

которой следовало заражение с помощью MARV-Musoke. Фиг. 7А иллюстрирует, что вакцинация с помощью MVA-BN-Filo защищала 100% животных от заражения MARV-Musoke. Фиг. 7Б иллюстрирует клинические показатели после заражения; вакцинированные животные, зараженные MARV-Musoke, не показали никаких симптомов или гистологических изменений, связанных с геморрагической лихорадкой, и не содержали вирус в печени, селезенке, надпочечниках, лимфатических узлах или легких.

Фиг. 8 иллюстрирует гуморальный и CD8 Т-клеточный ответ после гетерологичной MVA/FPV иммунизации. H-2K⁺ B6CBA F1 мыши были иммунизированы подкожно с помощью 5×10^7 ИДКТ₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN354A, см. фиг. 3В) или FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPV-mBN368A, см. фиг. 3Г) в День 0 и День 21. А) У мышей брали кровь в День 21 и 41 для анализа антител. Показана средняя концентрация ZEBOV-GP-специфических антител +/- СОС. Б) В День 41, мыши были умерщвлены и селезенки были проанализированы с помощью проточной-цитометрии после повторной стимуляции GP₅₇₇₋₅₈₄ пептидом. Показано абсолютное количество CD107a⁺, IFN- γ ⁺ и TNF- α ⁺ CD8 Т клеток на селезенку $\times 10^4$ +/- СОС. rMVA=рекомбинантный MVA-ZEBOV-GP (MVA-mBN254); rFPV=рекомбинантный FPV-ZEBOV-GP (FPV-mBN368).

Фиг. 9 иллюстрирует ZEBOV-GP специфический CD8 Т-клеточный ответ после иммунизации (подкожно) мыши с помощью MVA/FPV. Показано абсолютное количество CD107a⁺, IFN- γ ⁺ и TNF- α ⁺ CD8 Т клеток на селезенку $\times 10^4$ +/- СОС. 1: MVA-mBN254/FPV-mBN368; 2: MVA-mBN226/FPV-mBN368, 3: MVA-mBN255/FPV-mBN368.

Фиг. 10 иллюстрирует специфические антитела яванских макаков к ZEBOV-GP, которые в День 0 и 28 исследования получили примирование-бустирование прививки с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP (MVA-mBN254) в дозе 5×10^8 ИДКТ₅₀ (n=3), с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255) в дозе 5×10^8 ИДКТ₅₀ (n=3) согласно примеру 6. Результаты представлены как средняя геометрическая концентрация (нг/мл) вместе со стандартной ошибкой среднего (СОС).

Фиг. 11 иллюстрирует нейтрализующий гуморальный ответ яванский макак, которые были вакцинированы трижды в День исследования 0, 2 и 8 с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP в дозе 5×10^8 ИДКТ₅₀ (n=2), или с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (5×10^8 ИДКТ₅₀, n=2). Дополнительные животные (n=2) получили ТСБ в качестве отрицательного контроля в День исследования 0 и 56. Сыворотки были проанализированы с помощью ZEBOV-GP-специфического псевдовирального нейтрализующего анализа. Результаты представлены в качестве отдельного титра антител, нейтрализующих 80% ZEBOV-GP, экспрессирующих VSV.

Фиг. 12 А) и Б) иллюстрируют формирование филовирус-подобных частиц в клетках HeLa, зараженных MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255). А, Б) Трансмиссионный электронный микроскопический (ТЕМ) анализ MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (ВПЧ) и MVA wt зараженных клеток HeLa. HeLa клетки были инфицированы MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (А) или BAC-derived MVA-wt (Б) при MOI равным 10, и были получены и обработаны тонкие срезы для ТЕМ. Стрелка: поперечное сечение ВПЧ, продуцированных MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40. В) показан иммуноблот-анализ (ко-)экспрессии GP и VP40 в клетках HeLa. Г) показан иммуноблот-анализ иммунопреципитатов из супернатантов клеток HeLa (аликвоты тех самых супернатантов продемонстрированы в В) инфицированных с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 при MOI равным 10 в течение 2 дней. VP40 и GP могут быть только совместно преципитированы, если они присутствуют в интактных ВПЧ, но не после разрушения ВПЧ с помощью Triton-X-100 (1%). 166: MVA-mBN166, 2 54: MVA-mBN254, 2 55: MVA-mBN255.

Фиг. 13 иллюстрирует структуру некоторых рекомбинантных MVA/FPV конструкций.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что вакцина, содержащая рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту гликопротеина (GP) вируса Марбург (MARV), образует филовирусную вакцину, способную индуцировать как клеточный, так и гуморальный ответы, достаточные для выработки защитного иммунитета к вирусу Марбург, так само как и к оспе. Вставки дополнительных гетерологичных нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенную детерминанту гликопротеина (GP) Ebola virus Zaire (ZEBOV), гликопротеина (GP) Ebola virus Sudan (SEBOV), и/или нуклеопротеида (NP) EBOV в рекомбинантный MVA создает поливалентные вакцины, способные индуцировать иммунный ответ как к MARV, так и EBOV, и даже множеству штаммов MARV и/или EBOV, таких как, например, Ebola virus Sudan (SEBOV) и Ebola virus Zaire (ZEBOV), двух типов, связанных с смертельными формами лихорадки Эбола. Таким образом, рекомбинантный вектор MVA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту GP EBOV, показывает очень хороший иммунный ответ против штаммов вируса Эбола. Кроме того, превосходный профиль безопасности MVA и его производных (например, MVA-BN), а также их способность вмещать несколько гетерологичных нуклеотидных последовательностей, позволяет производить безопасную однокомпонентную поливалентную пан-филовирусную вакцину, в отличие от ряда многокомпонентных вакцин на ранних стадиях разработок (см. ниже).

Учитывая тот факт, что попытки известного уровня техники создать иммунный ответ против фило-

вирусов, особенно в низших приматах против MARV и EBOV, провалились, настоящее изобретение стало неожиданностью. Исходя из того что преподается и того что было достигнуто в известном уровне техники, не возможно было ожидать, что вакцина на основе MVA будет вызывать иммунный ответ, который дает низшим приматам защиту от филовиральной инфекции, в частности от MARV. Разумеется, исходя из данных, полученных авторами настоящего изобретения и по их наблюдениям, это более чем разумно и правдоподобно заключить, что вакцина на основе MVA также будет вызывать иммунный ответ у человека. Действительно, FDA принимает модели на основе низших приматов, как доказательство того, что вакцина, которая обеспечивает защиту для низших приматов, также подходит для людей.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что режим вакцинации, включающий рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту EBOV, например, такую как Ebola virus Sudan (SEBOV) и/или Ebola virus Zaire (ZEBOV) в сочетании с рекомбинантным модифицированным FPV, содержащим гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту EBOV, например Ebola virus Sudan (SEBOV) и/или ZEBOV, предоставляет филовиральную вакцину, способную индуцировать как клеточный и гуморальный ответы, достаточные для выработки защитного иммунитета.

В ходе исследования, лежащего в основе настоящего изобретения было также установлено, что применение вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального субтипа, в частности филовиральный гликопротеин, и вектор на основе вируса оспы кур, содержащий по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального гликопротеина в качестве гетерологического примирования-бустирования, вызывает защитный иммунный ответ против филовирального иммуногена путем индукции высокого уровня гуморального ответа, и вплоть до 5-пятикратного повышения ответа цитотоксических CD8 Т-клеток, в частности, при котором вектор MVA был использован по меньшей мере как одна примирующая композиция и вирус оспы кур как композиция для бустирования.

Рекомбинантный MVA и/или FPV может быть моновалентным, т.е. состоять только из одной гетерологичной последовательности, кодирующей антигенную детерминанту EBOV, или поливалентным, т.е. содержать по меньшей мере две гетерологичные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты EBOV.

Таким образом, в изобретении предлагаются вакцины или комбинации вакцин, применяемые для вызова иммунного ответа, что обеспечивает двойную защиту или перекрестную защиту от заражений, по крайней мере двумя субтипами филовирусов, в частности, такими субтипами, как вирус Марбург и/или вирус Эбола, и предлагаются вакцины или комбинации вакцин, которые могут быть использованы для изготовления вакцины против по меньшей мере двух субтипов филовирусов, в частности против таких субтипов, как вирус Марбург и/или вируса Эбола. Таким образом, могут быть предложены вакцины для перекрестной защиты против филовирусов, таких как Ebola Zaire-Mayinga и Zair-Kikwit и/или Marburg-Musoke и Marburg-Angola. Также, сейчас было обнаружено впервые, что иммунизация вектором MVA, экспрессирующим определенные антигены, такие как белок VP40 ZEBOV вместе с другими гетерологичными нуклеотидными последовательностями, кодирующими по меньшей мере один поверхностный гликопротеин филовируса, в частности ZEBOV, может порождать филовирус-подобные частицы, например, такие как Эбола вирус-подобные частицы, содержащие филовиральный гликопротеин на их поверхности. Это было неожиданно, поскольку сообщалось, что транспорт филовирального GP на поверхность клетки во многом подавляется MVA (Sanger et al. J. Virol. Meth. 81, 29-35 (2001)). Однако, поскольку отделение филовиральных частиц происходит на поверхности клетки (Noda et al., PLoS Pathog. 2(9):e99 (2006)) требуется эффективный GP поверхностный транспорт для формирования GP содержащих филовиральных ВПЧ. В исследовании, которое лежит в основе настоящего изобретения, рекомбинантный MVA, экспрессирующий белок 40 филовирального вириона (VP40) и гликопротеин, например, GP-ZEBOV-Mayinga способный продуцировать ВПЧ, вызвал усиленную иммунную реакцию с различными примирования-бустирования комбинациями, и защищал низших приматов от филовиральной инфекции. Проведенные исследования также показали, что гомологичный примирования-бустирования режим, основывающийся исключительно на рекомбинантном MVA, экспрессирующем гликопротеин и белок 40 (VP40) филовирального вириона, защищал низших приматов от филовиральной инфекции.

Дополнительно было установлено, что применение вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный гликопротеин по меньшей мере одного филовирального субтипа, в частности гликопротеин вируса Марбурга и/или вируса Эбола, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок белка 40 (VP40) вириона в качестве гетерологичного примирования-бустирования вместе с вектором на основе вируса оспы кур, содержащего, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального гликопротеина, порождает повышенный CD8 Т-клеточный ответ. Дополнительно было установлено, что применение вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный гликопротеин по меньшей мере одного филовирального субтипа, в частности гликопротеин вируса Эбола, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок белка 40 (VP40) вириона, индуцировало более высокий нейтрализующий гуморальный ответ в

низших приматах, например, уже после примирования, который был улучшен после усиления, и таким образом создавался иммунный ответ против одной или нескольких филовиральных инфекций, в частности заражений Zaire-Mayinga и Zaire-Kikwit. Кроме того, было показано, что иммунизация вектором MVA, экспрессирующим определенные антигены такие, как белок 40 (VP40) филовирального вириона вместе с филовиральным гликопротеином может производить ВПЧ, которые экспрессируют филовиральный гликопротеин оболочки, выстилающий всю поверхность ВПЧ, которые похожи на интактные вирионы филовирусов. Таким образом, было показано, что включение нуклеиновой кислоты, кодирующей филовиральный белок VP40, в вектор MVA усиливает иммунный ответ на вирусный вектор, экспрессирующий антигенный белок или белки, в частности вектор MVA.

Теперь будет приведено подробное описание примерных вариантов осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых графических материалах.

Рекомбинантный вирус MVA

В одном аспекте, в настоящем изобретении предложен рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина (GP), в частности гликопротеин оболочки. В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор MVA, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина, в частности гликопротеин оболочки, и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка. MVA был создан с помощью более чем 570 последовательных пассажей эпидермального штамма коровьей оспы Анкара на куриных эмбриональных фибробластах (КЭФ) (Chorioallantois вирус коровьей оспы Анкара, CVA; для обзора см. Mayr et al. (1975), *Infection* 3: 6-14) который поддерживался в Институте вакцинации, Анкара, Турция на протяжении многих лет и применялся в качестве основы для вакцинации людей. Однако, из-за частых тяжелых поствакцинальных осложнений, связанных с вирусами коровьей оспы, было несколько попыток создать щадящие, безопасные вакцины против оспы.

В период с 1960 по 1974, профессору Антон Майер удалось ослабить CVA более чем 570 непрерывными пассажами в КЭФ клетках (Mayr et al. (1975)). На различных моделях животных было показано, что окончательный MVA был авирулентным (Mayr, 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 применением MVA-517 в сочетании с Листер Элстри (Stickl (1974), *Prev. Med.* 3:97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munch. Med. Wochenschr.* 113:114 9-1153) для лиц подверженных риску возникновения побочных реакций от коровьей оспы. В 1976 году, MVA, полученный с MVA-571 стоковой культуры (соответствующей 571-му пассажу) был зарегистрирован в Германии в качестве примирующей вакцины в двухэтапной парентеральной программе вакцинации против оспы. В последствии, MVA-572 был использован для вакцинации примерно 120000 европейских индивидов, большинство из которых составляли дети от 1 до 3 лет, без каких-либо зарегистрированных серьезных побочных эффектов, хотя многие из субъектов были среди населения с высоким риском развития осложнений, связанных с коровьей оспой ((Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572 был депонирован в Европейской коллекции клеточных культур животных как ECACC V94012707.

В результате пассирования, примененного для ослабления MVA, существует целый ряд различных штаммов или изолятов, в зависимости от числа пассажей, проведенных в КЭФ клетках. Например, MVA-572 применяли в небольшой дозе в качестве предварительной вакцины в Германии во время программы ликвидации оспы, а MVA-575 широко применялся в качестве ветеринарной вакцины. MVA, как и MVA-BN, не имеет примерно 13% (26. 6 кб из шести областей) генома по сравнению с изначальным CVA вирусом. Делеции затрагивают ряд генов вирулентности и хозяйских генов, так само как гена отвечающего за образование телец включения типа А. MVA-575 был депонирован 7 декабря 2000 года, в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под номером доступа V00120707. Ослабленный CVA-вирус MVA (модифицированный вирус коровьей оспы Анкара) был получен путем последовательного размножения CVA (более чем 570 пассажей) на первичных фибробластах куриного эмбриона.

Хотя Майер и соавт. продемонстрировали в 1970-х, что MVA сильно ослаблен и авирулентен для человека и млекопитающих, некоторые следователи сообщили, что MVA не является полностью ослабленным в клеточных линиях млекопитающих и человека, поскольку в этих клетках может происходить остаточная репликация (Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211; U.S. Patent No. 5,185,146; Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569). Предполагается, что результаты представленные в этих публикациях, были получены с использованием различных известных штаммов MVA, поскольку те вирусы, которые применяются, существенно отличаются по своим свойствам, в частности, по их в ростовому поведению в различных клеточных линиях. Такая остаточная репликация является нежелательной по различным причинам, включая проблемы безопасности в связи с применением для вакцинации людей.

Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или лекарственные препараты, были разработаны Bavarian Nordic: MVA далее было пассировано Bavarian Nordic и обозначено как MVA-BN.

Типичный и предпочтительный образец MVA-BN был депонирован 3 0 августа 2000 года, в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под номером доступа V00083008. MVA-BN дополнительно описаны в WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), оба из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

MVA-BN может прикрепляться к человеческим клеткам и проникать внутрь, где гены, кодируются вирусом, экспрессируются очень эффективно. MVA-BN сильно приспособлен к первичным клеткам фибробластов куриных эмбрионов (КЭФ), и не реплицируется в клетках человека. В клетках человека, вирусные гены экспрессируются, но инфекционный вирус не производится. MVA-BN классифицируется как уровень организм первого уровня биобезопасности по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний в США. Препараты MVA-BN и его производные, были введены многим видам животных, и более чем 2000 людей, в том числе людям с иммунодефицитом. Было доказано, что все прививки в целом, как правило, безопасны и хорошо переносятся. Несмотря на свое значительное ослабление и снижение вирулентности, в доклинических исследованиях было показано, что MVA-BN вызывает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на вирус осповакцины и продукты гетерологичных генов, кодируемых генами, клонированными в геном MVA (E. Harrer et al. (2005), *Antivir. Ther.* 10 (2) :285-300; A. Cosma et al. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14 (14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10 (16) :5381-5390).

"Производные" или "варианты" MVA относятся к вирусам, проявляющим, в основном, такие же характеристики репликации, что и MVA, как описано в настоящем документе, но демонстрирующие различия в одной или нескольких частях их геномов. MVA-BN, также как и производные или варианты MVA-BN, не способны репродуктивно реплицироваться *in vivo* в организме человека и мыши, и даже в мышцах, с сильно подавленной иммунной системой. Более конкретно, MVA-BN или производное или вариант MVA-BN имеет предпочтительно также способность репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (КЭФ), но не имеет способности репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT (Boukamp et al (1988), *J. Cell Biol.* 106:761-771), в клеточной линии остеосаркомы 143B (ECACC депозитарный № 91112502), в линии клеток 293 почки человеческого эмбриона (ECACC депозитарный № 85120602), и человеческой линии клеток HeLa аденокарциномы шейки матки (ATCC депозитарный № CCL-2). Дополнительно, производное или вариант MVA-BN имеет коэффициент амплификации вируса, по меньшей мере, в два раза меньший, и более предпочтительно в три раза меньший, чем MVA-575 в клетках клеточных линиях Hela и HaCaT. Тесты и анализ этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 (US 2003/020692 6) и WO 03/048184 (US 2006/0159699).

Термин "не способен к репродуктивной репликации" или "нет возможности репродуктивной репликации" - описаны, например, в WO 02/42480, который также демонстрирует, как получить MVA, имеющий нужные свойства, как указано выше. Этот термин применяется к вирусу, который имеет коэффициент амплификации вируса менее 1 к 4 дню после заражения, применяя анализы, описанные в WO 02/42480 или патенте США № 67 618 93.

Термин "не способен репродуктивно воспроизводиться" относится к вирусу, который имеет коэффициент амплификации вируса менее 1 к 4 дню после заражения. Анализы описаны в WO 02/42480 или в патенте США № 67 618 93 применяются для определения коэффициента амплификации вируса.

Амплификация и репликация вируса обычно выражается как отношение произведенного вируса инфицированной клеткой (произведенное количество) к первоначальному количеству, примененному для того, чтобы заразить клетки изначально (вводимое количество), и это соотношение называют "коэффициентом амплификации". Коэффициент амплификации равный "1" определяет статус амплификации, при котором количество вируса, выработанное зараженными клетками является таким же, как количество, которое первоначально использовали для заражения клеток, и это означает, что инфицированные клетки толерантны к наличию вирусной инфекции и размножению вируса. В отличие от этого, коэффициент амплификации меньше 1, т.е. снижение произведенного количества по сравнению с вводимым количеством, указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, ослабление вируса.

К преимуществам MVA-основанных вакцин можно отнести их безопасность, а также доступность для крупномасштабного производства вакцины. Предклинические испытания показали, что MVA-BN демонстрирует превосходный уровень ослабления и эффективности по сравнению с другими штаммами MVA (WO 02/42480). Дополнительным свойством MVA-BN штаммов является способность вызывать существенно такой же уровень иммунитета в режимах примирования - вирус осповакцины/бустирования - вирус коровьей оспы, по сравнению с режимами примирования - ДНК/бустирования - вирус осповакцины.

Рекомбинантные MVA-BN вирусы, в наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, считаются безопасными из-за их различных репликативных недостаточностей в клетках млекопитающих, и их устоявшейся авирулентности. Кроме того, в дополнение к его эффективности, может быть выгодной возможность производства в промышленных масштабах.

Дополнительно, MVA-основанные вакцины могут доставлять несколько гетерологичных антигенов и обеспечивать одновременную индукцию гуморального и клеточного иммунитета.

В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный вектор MVA любого из

вариантов реализации изобретения, которые используются для создания рекомбинантного вируса, является MVA-BN вирусом или его производным, имеющим возможность репродуктивной репликации *in vitro* в клетках куриных эмбриональных фибробластов (КЭФ), но не имеют способности к репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCat, человеческой клеточной линии остеосаркомы 143B, в линии клеток почки человеческого эмбриона 293, и человеческой линии клеток HeLa аденокарциномы шейки матки.

В другом варианте реализации изобретения, рекомбинантный вектор MVA любого из вариантов реализации изобретения, который используется для создания рекомбинантного вируса, является MVA-BN, который депонирован в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под номером доступа V00083008.

Векторы MVA, подходящие для настоящего изобретения, могут быть приготовлены с применением способов, известных в данной области техники, таких как описанные в WO 02/042480 и WO 02/24224, оба из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В другом аспекте вирусный штамм MVA, подходящий для создания рекомбинантного вируса, может быть штаммом MVA-572, MVA-575 или любым аналогичным ослабленным штаммом MVA. Также подходящим может быть любой мутант MVA, такой вирус Chorioallantois коровьей оспы Анкара (dCVA) с делециями. dCVA содержит del I, del II, del III, del IV, del V, и del VI сайты делеции MVA генома. Сайты особенно полезны для вставки нескольких гетерологичных последовательностей. dCVA может репродуктивно реплицироваться (с коэффициентом репликации больше 10) в человеческих клеточных линиях (например, таких как человеческие 293, 143B, и MRC-5 клеточных линий), которые позволяют оптимизацию с помощью дополнительных мутаций, полезных для стратегии вакцинации на основе вируса (см. WO 2011/092029).

Рекомбинантный FPV

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный FPV, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина (GP), в частности гликопротеин оболочки. В другом аспекте, в настоящем изобретении предложен рекомбинантный FPV, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина, в частности гликопротеин оболочки, и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка.

FPV, в соответствии с данным изобретением, является прототипным видом в роде *Avipoxvirus*. Описаны и доступны многочисленные FPV штаммы, которые можно получить у таких компаний как: CEVA Laboratories, Cynamid Webster, Fort Dodge, Intercontinental Laboratories, Intervet (NOBILIS VARIOLE), Merial (DIFTOSEC CT strain), Schering-Plough, Select Laboratories, Solvay, Syntro-Zeon и Vineland Laboratories. FP1 является штаммом Duvette, модифицированным для использования в качестве вакцины для однодневных цыплят. Штамм является коммерческим вакцинным штаммом вируса оспы кур, обозначенным O DCEP 25/CEP67/2309 октября 1980 года, и выпускается Institute Merieux, Inc. FP5 является коммерческим вакцинным штаммом вируса оспы кур, источником которого были куриные эмбрионы, полученного American Scientific Laboratories (подразделение Schering Corp.) Мэдисон, Висконсин, Ветеринарная Лицензия Соединенных Штатов № 165, серийный № 30321. Различные ослабленные штаммы вируса оспы кур известны, например, как FPV M (мягкий вакцинный штамм) и FPV S (стандартный вакцинный штамм), получаемые Cyanamid Websters Pty, Ltd Австралия. Штамм, подвергнутый критической оценке Департаментом сельского хозяйства США (USDA), дополнительно был описан C.L. Afonso et al., J. Virol. 74(8):3815-3831 (2000), 74(8):3815-3831 (2000). FP9 является штаммом вируса оспы кур, применяемый в вакцинных целях, полученный в конце 1980-х Томлей, Биннс, Борснелл и Браун в IAH Houghton Laboratories (Сент-Айвс, Великобритания). Он был получен при очищении бляшек вируса, который был пассирован 438 раз в культуре куриных эмбриональных фибробластов (КЭФ) из HP1 (A. Mayr & K. Malicki (1966), Zentralbl Veterinarmed (B) 13:1-13, Skinner et al. (2005), Expert Res. Vaccines 4(1):63-76). Другие ослабленные штаммы представляют собой POXVAC-TC как таковой, что описан в S. Jenkins et al. (1991), Aids Research and Human Retroviruses 7(12):991-998. Депонированные штаммы включают, например, вирус оспы кур ATCC® BP-229 (типичные струпья вируса оспы кур с гребней кур в Нью-Джерси до 1928) и вирус оспы кур ATCC® BP-250 (курица, Кентукки, 1950).

В другом аспекте FPV вирусный штамм, подходящий для создания рекомбинантного вируса, может быть любым штаммом, которые упомянуты выше, или любым подобным штаммом FPV. В другом аспекте FPV выбран из группы, состоящей из: FP1, FP5, FP9, FPV M, FPV S, ATCC® VR-229, ATCC® VR-250, USDA штамма и POXVAC-TC. В еще одном варианте реализации изобретения, FPV любого из вариантов реализации изобретения, представляет собой ослабленный FPV.

Преимущество FPV в том, что вирус вызывает заболевание только у птиц, а также способен проникать и экспрессировать трансгены в клетках млекопитающих, оставаясь иммунологически непрекращающе-реагирующим с вирусом коровьей оспы, и тем самым избегает уже существующего иммунитета у людей, прошедших вакцинацию против оспы.

Рекомбинантные векторы FPV, подходящие для создания рекомбинантных FPV, могут быть созданы с помощью устоявшихся способов. Живые ослабленные вирусы оспы кур могут быть получены путем многократного пересева вируса в птичьих клетках. Подготовка векторов для FPV описана, например, в Michael J.P. Lawman and Patricia D. Lawman (eds.) *Cancer Vaccines: Method and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1139, Chapter 32 Paul M. Howley, Kerrilyn R. Diener and John D. Hayball p. 407-427. Создание рекомбинантных FPV, подходящие для стратегии вакцинации на основе вируса, также были описаны в EP 0 284 416 B1, WO 88/02022, WO 89/03429, WO 89/03879, WO89/07644, WO 89/12684, WO 90/02191, WO 91/02072, WO 89/03879 и WO 94/019014. Последовательность генома и организация генома были описаны в Afonso et al. and Laidlaw and Skinner (C.L. Afonso et al. (2000), *J. Virol.* 74(8):3815-3831, S.M. Laidlaw and M.A. Skinner (2004), *Journal of General Virology* 85:305-322). Примерная последовательность генома FPV может быть найден по номеру доступа ГенБанка AF198100.1.

Антигенные детерминанты

Термин "антигенная детерминанта" относится к любой молекуле, которая стимулирует иммунную систему хозяина для создания антиген-специфического иммунного ответа, будь то клеточная реакция или гуморальный ответ. Антигенные детерминанты могут включать: белки, полипептиды, фрагменты антигенных белков, антигены, и эпитопы, которые еще вызывают иммунный ответ у хозяина и являются частью антигена, гомологи или варианты белков, полипептиды, и фрагменты антигенных белков, антигены и эпитопы, в том числе, например, гликозилированные белки, полипептиды, фрагменты антигенных белков, антигены и эпитопы, и нуклеотидные последовательности, кодирующие эти молекулы. Таким образом, белки, полипептиды, фрагменты антигенных белков, антигены и эпитопы не ограничиваются определенными нативными нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, а включают последовательности, идентичные нативной последовательности, а также изменения в нативной последовательности, такие как делеции, добавления, вставки и замены.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки, или самостоятельно, или в сочетании с другим белком, таким как, например, белок главного комплекса гистосовместимости ("МНС") или Т-клеточным рецепторам. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и несмежных аминокислот, сопоставленных вторичной и/или третичной сверткой белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные третичной сверткой, теряются при воздействии денатурирующих растворителей. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот - но, как правило, менее 20 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, "Epitope Mapping Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Желательно, чтобы гомолог или вариант имел по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере около 60 или 65%, по меньшей мере около 70 или 75%, по крайней мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично по меньшей мере около 90, 91, 92, 93 или 94%, и еще более типично по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99%, наиболее типично по меньшей мере около 99% идентичности с указанным белком, полипептидом, фрагментом антигенного белка, и эпитопом антигена на уровне нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

Методы определения идентичности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, которые известны в данной области техники. Две или более последовательностей можно сравнивать путем определения их "процента идентичности". Процент идентичности двух последовательностей, будь то нуклеотидные или аминокислотные последовательности, представляет собой число точных соответствий между двумя выровненными последовательностями, деленное на длину более коротких последовательностей и умноженное на 100.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении белков, полипептидов, фрагментов антигенных белков, антигенов и эпитопов, описанных в настоящем документе, определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые являются идентичными аминокислотным остатками в эталонной последовательности (т.е. последовательности белка, полипептида, фрагмента антигенного белка, антигена или эпитопа, из которой она получена), после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание для определения процента идентичности последовательности аминокислот может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах квалификации в данной области техники, например, с помощью общедоступных компьютерных программ, таких как BLAST, ALIGN, или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

То же самое касается и "процента (%) идентичности нуклеотидных последовательностей", с соответствующими изменениями.

Например, надлежащее выравнивание аминокислотных последовательностей обеспечивается с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Ватермана, (1981), *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489. Этот алгоритм может быть применен для выравнивания аминокислотных последовательностей с использованием матрицы начисления баллов, разработанной Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, и стандартизированной Gribskov (1986), *Nucl. Acids Res.* 14 (6) :6745-6763. Типичная реализация этого алгоритма для определения процента идентичности последовательности, предложена Genetics Computer Group (Мэдисон, Иск.) в "BestFit" вспомогательном приложении. Параметры по умолчанию для этого метода описаны в *Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995)* (доступно от Genetics Computer Group, Мэдисон, Иск.). Предпочтительный способ определения процента идентичности в контексте настоящего изобретения заключается в использовании MPSRCH пакета программ, под авторским правом Эдинбургского университета, разработанного Джоном Ф. Коллинзом и С. Шейн Старрок, и распространяемого IntelliGenetics, Inc. (Маунтин-Вью, Калифорния). Из этого набора пакетов, алгоритм Смита-Ватермана может использоваться в случаях, когда в счетной таблице применяются параметры по умолчанию (например, штраф за открытие пробела - 12, штраф за продолжение пробела - 1, и штраф за пробел - 6). Из данных сгенерированных, "Match" значение отражает "идентичность последовательности". Другие подходящие программы для расчета процента идентичности или сходства между последовательностями, широко известны в данной области техники, например, другая программа для выравнивания представляет собой программу BLAST, применяемую с параметрами по умолчанию. Например, BLASTN и BLASTP могут применяться, используя следующие стандартные параметры: genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+ GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Детали этих программ можно найти в интернете по следующему адресу: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

В некоторых вариантах гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует антигенные домены или фрагменты антигенного белка, а не весь антигенный белок. Эти фрагменты могут иметь любую длину, достаточную для того, чтобы быть антигенными или иммуногенными. Фрагменты могут быть, по меньшей мере, 8 аминокислот в длину, предпочтительно 10-20 аминокислот, но могут быть и больше, например, по меньшей мере 50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000 аминокислот, или любой длины между указанными значениями.

В некоторых вариантах по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий фрагмент антигенного белка или иммуногенный полипептид, встраивают в вирусный вектор согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации изобретения, около 2-6 различных нуклеиновых кислот, кодирующих различные антигенные белки вставляются в один или более вирусных векторов. В некоторых вариантах реализации изобретения, могут быть использованы несколько иммуногенных фрагментов или субъединиц различных белков. Например, из векторов могут экспрессироваться несколько различных эпитопов с разных сайтов одного белка или разных белков из того же штамма, или из белкового ортолога из разных штаммов.

Определения

В контексте настоящего документа определения в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное. Таким образом, например, отсылка к "антигенная детерминанта" включает в себя одну или более антигенных детерминант, а отсылка к "способ" включает ссылку на равнозначные стадии и способы, известные обычным специалистам в данной области техники, которые могут быть изменены или заменены на способы, описанные в настоящем документе.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере" предшествующей серии элементов, следует понимать как такой, что ссылается на каждый элемент в серии. Специалистам в данной области техники будет понятно, или они будут в состоянии установить с использованием не более чем рутинных экспериментов, множество аналогичных конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для того, чтобы быть охвачены 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", следует понимать как таковое, что означает включение указанного целого или стадии, или группы целых или стадий, но не исключение любого другого целого или стадии или группы целых или стадий. При использовании в настоящем документе, термин "содержащий" может быть заменен термином "содержащий" или "включающий" или иногда, когда используется в данном изобретении термином "имеющий". Любой из указанных выше терминов (включающий, содержащий, включающий в себя, имеющий), всякий раз, когда используется здесь в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, может быть заменены термином "состоящий из", хотя это и менее предпочтительно.

При использовании в настоящем документе, "состоящий из" исключает любой элемент, шаг, или компонент, неуказанный в элементе формулы. При использовании в настоящем документе, термин "состоящий в основном из" не влияет существенным образом на основные и новые свойства формулы.

Как используется в настоящем документе и, связывающий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами следует понимать как таковой, что включает как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены 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. Любой из этих вариантов следует понимать как таковой, что попадает в пределы своего значения, и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", как использовано в настоящем документе. Одновременное применение более чем одного из вариантов, следует понимать как таковое, что попадает в пределы своего значения, и поэтому удовлетворяет требованию термина "и/или".

В тексте настоящей спецификации цитируются некоторые документы. Каждый из документов, указанных в настоящем изобретении (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, технические требования изготовителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В тех случаях, когда материал, включенный в настоящий документ посредством ссылки, противоречит или не согласуется с этой спецификацией, спецификация заменяет собой любой такой материал. Ничто здесь не должно быть истолковано как допущение того, что изобретение не имеет права датировать более ранним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения.

Термин "по существу сходный" в контексте филовиральных антигенных белков согласно настоящему изобретению указывает на то, что полипептид содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичной эталонной последовательности при окне сравнения 10-20 аминокислот. Процент идентичности последовательностей определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляется таким путем: определяется количество позиций, в которых идентичный нуклеотид или аминокислота представлены в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих позиций; число совпадающих позиций разделяется на общее число позиций в окне сравнения, и полученный результат умножается на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

Термин "субтип" здесь можно заменить словом "вид". Она включает в себя штаммы, изоляты, клады или варианты любого филовируса, такого как Марбург или вирус Эбола. Термины "штамм" "клада" или "изолят" технические термины, хорошо известные практикующему, относящиеся к систематике микроорганизмов. Таксономическая система классифицирует все на данный момент охарактеризованные микроорганизмы в иерархическом порядке семейства, роды, виды, штаммы Virology, ed. by Fields B. N., Lippincott-Raven Publishers, 4th edition 2001). В то время как критерием для членов семейства, является их филогенетическая связь, род содержит все члены, которые имеют общие характеристики, а вид определен как политетический класс, что составляет самовоспроизводящуюся линию потомства и занимает особую экологическую нишу. Термин "штамм" или "клада" описывает микроорганизмы, т. е. вирусы, которые имеют общие свойства, такие как морфология или структура и организация генома, но варьируют в плане биологических свойств, таких как круг хозяев, тканевый тропизм, географическое распространения, ослабление или патогенность. Например, существует пять субтипов вируса Эбола, т. е. Ebola virus Zaire, Ebola virus Sudan, Ebola virus Reston, Ebola virus Bundibugyo и Ebola virus Cote d'Ivoire. Штаммами Ebola virus Zaire, например, являются штаммы: Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon (1994), Zaire-Gabon (февраль 1996), Zaire-Gabon (октябрь 1996). Есть только один субтип или вид вируса Марбург, т. е. известный до сих пор марбургвирус озера Виктория, со штаммами, включающие Marburg-Musoke и Marburg-Angola. Дополнительные штаммы или изоляты также можно увидеть на фиг. 1.

Термин "ИДКТ₅₀" - это сокращение от "инфекционная доза культуры тканей", то количество патогенного агента, которые будет производить патологические изменения в 50% клеток инокулированной клеточной культуры, выраженное как ИДКТ₅₀/мл. Метод определения ИДКТ₅₀ хорошо известны специалисту в данной области техники. Он, например, описан, например, в примере 2 WO 03/053463.

Термин "субъект", как применяется в настоящем документе, обозначает живые многоклеточные позвоночные организмы, в том числе, например, людей, млекопитающих (не человек) и низшие приматы. Термин "субъект" может быть применен взаимозаменяемо с термином "животное" в настоящем изобретении.

Термин "филовиральный-вызванное заболевание", относящийся к любому из вариантов реализации изобретения, может обозначать любое заболевание, вызванное инфекцией любым филовиральным штаммом, изолятом или из вариантом, как указано в настоящем документе, или вызванное любой комбинацией любых филовиральных штаммов, изолятов или их вариантов (как уже упоминалось в любом месте выше или ниже и/или в любом из вариантов реализации выше или ниже).

Как используется в настоящем изобретении, термин "усиление", когда применяется по отношению к иммунному ответу против филовиральных, такому как гуморальный ответ (например, специфический антигенный нейтрализующий гуморальный ответ или ZEBOV-GP-специфический гуморальный ответ), а

цитокиновый ответ или CD8 Т-клеточный ответ (например, иммунодоминантный CD8 Т-клеточный ответ), обозначает увеличение иммунного ответа у животного, которому ввели для гомологичного примирования-бустирования комбинированную вакцину MVA, относительно соответствующего иммунного ответа, наблюдаемого у животного, которому ввели для гомологичного примирования-бустирования комбинированную вакцину векторов MVA, причем векторы MVA не экспрессируют ни один белок 40 филовирального вириона, или обозначает увеличение иммунного ответа у животного, которому ввели для гетерологичного примирования-бустирования комбинированную вакцину MVA и векторов FPV согласно настоящему изобретению, относительно соответствующего иммунного ответа, наблюдаемого у животного, которому ввели для гетерологичного примирования-бустирования комбинированную вакцину MVA и векторов FPV, согласно настоящему изобретению, при этом векторы MVA не экспрессируют ни один белок 40 филовирального вириона. Предпочтительно, "усиленный", когда применяется по отношению к иммунному ответу, такому как гуморальный ответ, например, нейтрализующий гуморальный ответ, цитокиновый ответ или CD8 Т-клеточный ответ, обозначает возрастание иммунного ответа у животного, которому ввели для гетерологичного примирования-бустирования комбинированную вакцину с вектором MVA как примиряющим вектором и вектором FPV как усиливающим иммунный ответ вектором, согласно настоящему изобретению, относительно соответствующего иммунного ответа, наблюдаемого у животного, которому ввели обратную комбинацию примирования-бустирования, при этом вектор FPV предлагается как примиряющий вектор, а вектор MVA предлагается как усиливающий иммунный ответ вектор, применяя тот же интервал примирования-бустирования.

В контексте настоящего изобретения "иммунодоминантный CD8 Т-клеточный ответ" означает масштабный CD8 Т-клеточный ответ хозяина против рекомбинантного антигена, закодированного MVA и/или вектором FPV. Таким образом, может быть создан иммунодоминантный CD8 Т-клеточный ответ против рекомбинантного антигена, закодированного с помощью гомологичного примирования-бустирования рекомбинантных MVA или гетерологичного примирования-бустирования рекомбинантных MVA и FPV, который больше, чем CD8 Т-клеточный ответ против любого из рекомбинантных антигенов рекомбинантных MVA или FPV, при этом вектор MVA не экспрессирует ни одного белка 40 филовирального вириона.

Уровень CD8 Т-клеточного ответа может быть определен способами, хорошо известными в данной области техники, таким как, но не ограниченные лишь этим: ELISPOT анализа (например, интерферона гамма (ИФН-γ) ELISPOT. Например протоколы описаны в Current Protocols in Immunology (John Wiley & Son, Inc. (1994) (see, e.g., Chapter 6, Section 19: ELISPOT Assay to Detect Cytokine-secreting Murine and Human Cells, Supplement 10) или в Schneider, et al., Nat. Med. 4:397-402 (1998)) и, например, по методикам, изложенным в примерах для конкретного вируса настоящего изобретения. Другие подходящие анализы включают в себя анализ ICS, который анализирует уровень внутриклеточных цитокинов при деятельности CD8 Т-клеток. Например, CD8 Т-клеточный ответ может включать антиген специфический CD8 Т-клеточный ответ, что составляет более чем 50%, например 51, 60, 70, 80, 90 или 100% от общего числа антиген-специфических Т-клеточных ответов в животном субъекте. Предпочтительно, CD8 Т-клеточный ответ также представляет 0,1% или больше, например 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 или больше от общего числа цитокиновых ответов в животном субъекте. В некоторых вариантах после второго или третьего "буста", рекомбинантные вирусные векторы согласно настоящему изобретению вызывают CD8 Т-клеточный ответ хозяина против закодированного антигена, что составляет по меньшей мере 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от общего числа CD8 Т-клеточных компартментов.

Уровень гуморального ответа может быть определен с помощью способов, известных в данной области техники. Для определения, индуцирует ли полипептид (или полинуклеотид, экспрессирующий такой полипептид) одно или несколько нейтрализующих антител против одного или нескольких филовиральных антигенов из одного или более филовирального субтипа, может быть применен любой подходящий анализ с помощью реакции нейтрализации бляшкообразования (РНБО). Типичный анализ с помощью реакции нейтрализации бляшкообразования для филовирусов описан в примерах. Другие РНБО способы и форматы хорошо известны специалисту в данной области техники.

Филовиральные белки

Как используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, термины "ген гликопротеина" или "GP ген" обозначает ген, или гомолог или вариант гена, кодирующего гликопротеин, в частности трансмембранный гликопротеин оболочки, в любом филовиральном штамме или изоляте, хотя точной последовательности и/или геномное расположение гена гликопротеина может отличаться у различных штаммов или изолятов. Например, в штамме Maleo SEBOV (SEBOV-Maleo), ген гликопротеина (ген GP-SEBOV-Maleo) содержит нуклеотиды 120-1004 и 1004-2149 (конечные точки включены) как пронумеровано в номере доступа ГенБанка U23069.1. Транскрипты EBOV проходят редактирование в ходе транскрипции таким образом, что некоторые нуклеотиды считываются дважды. Ген GP-SEBOV-Maleo дополнительно содержит открытую белок-кодирующую рамку считывания (ORF), охватывающую нуклеотиды 120-1004 и 1004-2149 (конечные точки включены) как пронумеровано в номере доступа ГенБанка U23069.1. Нуклеотидная последовательность гена GP-SEBOV-Maleo изложена в SEQ ID NO:1 (под номер доступа ГенБанка U23069.1).

Как используется в настоящем изобретении, "гомолог" или "вариант" имеет предпочтительно по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60 или 65%, по меньшей мере около 70 или 75%, по крайней мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично по меньшей мере около 90, 91, 92, 93 или 94% и даже более типично по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99%, наиболее типично по меньшей мере около 99% идентичности нуклеотидной последовательности с указанным геном, белком, полипептидом, фрагментом антигенного белка, антигеном и эпитопом. Термин "гомолог" или "вариант" также включает в себя удаленные, усеченные или иначе мутированные версии генов и белков, соответственно. В качестве примера включенные представляют собой, например, растворимые формы GP-EBOV или GP-MARV белков, лишенные сигнального пептида, а также трансмембранные и/или цитоплазматические домены полноразмерного GP-EBOV или GP-MARV белков.

Как используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, термин "гликопротеин" или "GP" относится к гликопротеину, в частности трансмембранному гликопротеину оболочки, или к гомологу или к варианту гликопротеина.

Аминокислотная последовательность GP-EBOV-Maleo изложена в SEQ ID NO:2 (аминокислотная последовательность под номером доступа ГенБанка U23069.1). GP-SEBOV-Maleo белок содержит сигнальный пептид, внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен (см., например, UniProtKB/Swiss-Prot номер доступа Q66798). Сигнальный пептид белка GP-SEBOV-Maleo состоит из аминокислот 1-32 SEQ ID NO:2; внеклеточный домен белка GP-SEBOV-Maleo состоит из аминокислот 33-650 SEQ ID NO:2 или аминокислот 1-650 SEQ ID NO:2; трансмембранный домен белка GP-SEBOV-Maleo состоит из аминокислот 651-671 функции SEQ ID NO:2; и цитоплазматический домен белка GP-SEBOV-Maleo состоит из аминокислот 672-676 SEQ ID NO:2.

Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность GP-ZEBOV-Mayinga изложена в SEQ ID NO:19. GP-ZEBOV-Mayinga содержит белок изложенный в SEQ ID NO:20 (номер доступа ГенБанка ABX75367.1).

Кроме того, также термины "ген нуклеопротеина" или "NP ген", как используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, обозначает ген, или гомолог или вариант гена, кодирующего нуклеопротеин в любом филовиральном штамме или изоляте, хотя точная последовательность и/или геномное расположение гена нуклеопротеина также могут различаться между штаммами или изолятами. Например, в штамме Boniface SEBOV (SEBOV-Boniface), ген нуклеопротеина (ген NP-SEBOV-Boniface) содержит нуклеотиды 383-2599 (конечные точки включены), как пронумеровано в номере доступа ГенБанка AF173836.1. Ген NP-SEBOV-Boniface дополнительно содержит открытую белок-кодирующую рамку считывания (ORF), охватывающую нуклеотиды 383-2599 (конечные точки включены), как пронумеровано в номере доступа ГенБанка AF1738 36.1. Нуклеотидная последовательность гена NP-SEBOV-Boniface изложена в SEQ ID NO:3 (номер доступа ГенБанка AF173836.1).

Аминокислотная последовательность NP-EBOV-Boniface изложена в SEQ ID NO:4 (номер доступа аминокислотной последовательности ГенБанка AF173836.1). NP-SEBOV-Boniface белок содержит суперспиральный домен (см., например, номер доступа UniProtKB/Swiss-Prot Q9QP77). Суперспиральный домен белка NP-SEBOV-Bonif ace состоит из аминокислот 334-363 SEQ ID NO:4.

В некоторых вариантах реализации изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая антигенную детерминанту, предпочтительно антигенный белок, более предпочтительно любой из белков, упомянутый выше или ниже представляет собой полноразмерный белок.

Рекомбинантные MVA и FPV

В настоящем изобретении предложены рекомбинантные поксвирусы (например, MVA или MVA-BN или FPV), содержащие гетерологичные или чужеродные последовательности нуклеиновых кислот, полученные из EBOV и/или MARV, вставленные в различные сайты встраивания в поксивирусный геном (например, MVA или MVA-BN или FPV). Гетерологичные нуклеиновые кислоты могут кодировать один или более чужеродных белков и/или чужеродных антигенов, в том числе, например, вирусные антигены.

Как правило, такой "рекомбинантный" MVA или FPV, как описано в настоящем документе, относится к MVA/FPV, которые производятся стандартными генно-инженерными способами, т.е. MVA/FPV настоящего изобретения, таким образом, представляют собой генетически спроектированные или генетически модифицированные MVA/FPV. Термин "рекомбинантный MVA или FPV", таким образом, включает в себя MVA/FPV которые имеют стабильно интегрированную в их геном рекомбинантную нуклеиновую кислоту, предпочтительно в форме транскрипционной единицы. Транскрипционная единица могут содержать промотор, энхансер, терминатор и/или сайленсер. Рекомбинантные MVA/FPV настоящего изобретения могут экспрессировать гетерологичные антигенные детерминанты, полипептиды или белки (антигены) после воздействия на регуляторные элементы. Термин "MVA/FPV" в контексте любого из вариантов осуществления изобретения включает как индивидуальные, так и комбинированные варианты MVA, FPV или MVA и FPV.

Как используется здесь, "гетерологический" ген, нуклеиновая кислота, антиген или белок считается нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, которая не представлена в поксивирусном геноме дикого типа (например, MVA или MVA-BN или FPV). Опытный специалист понимает, что "гетерологичный ген", присутствующий в поксивирусе, таком как MVA или MVA-BN или FPV, должен быть

включен в поксивирусный геном таким образом, что, после введения рекомбинантного поксивируса в клетку-хозяина, он экспрессируется как соответствующий гетерологичный генный продукт, т.е. как "гетерологичный антиген" и/или "гетерологичный белок." Экспрессия обычно достигается путем оперативного связывания гетерологичного гена с регуляторными элементами, которые допускают экспрессию в поксивирус-инфицированных клетках. Предпочтительно, чтобы регуляторные элементы содержали природные или синтетические поксивирусные промоторы.

В одном аспекте рекомбинантный MVA/FPV вектор, согласно настоящему изобретению, содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из вируса Эбола (EBOV) и/или вируса Марбург (MARV). В другом варианте осуществления рекомбинантный MVA/FPV вектор, согласно настоящему изобретению, гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту одной или более антигенных детерминант филовирального белка (например, белка EBOV), который выбирается из одного или более субтипов EBOV, выбранного из группы, состоящей из Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus d'Ivoire Cote (Ebola-Cdi), который также называется Tai Forest virus или TAFV), Ebola virus Reston (REBOV) и Ebola virus Bundibugyo (BEBOV).

Согласно другому варианту реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор, согласно настоящему изобретению, содержит одну или более антигенную детерминанту филовирального белка, предпочтительно белок EBOV, белок MARV или полноразмерный белок, выбранный из группы, состоящей из: Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola.

Предпочтительно, чтобы антигенная детерминанта филовирального белка (например, выбранного из группы, состоящей из Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Ivory Coast, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola) была выбрана из группы, состоящей из: гликопротеина оболочки (GP), нуклеопротеина (NP), белка 35 (VP35) вириона, белка 40 (VP40) вириона, белок 30 (VP30) вириона, белок 24 (VP24) вириона, и белка РНК-зависимой РНК-полимеразы (L).

В другом варианте реализации настоящего изобретения антигенная детерминанта филовирального белка представляет собой гликопротеин оболочки (GP), предпочтительно по меньшей мере гликопротеин оболочки (GP) и белок 40 вириона (VP40).

В другом варианте реализации настоящего изобретения антигенная детерминанта филовирального белка представляет собой гликопротеин оболочки (GP), выбранный из группы ZEBOV и SEBOV, предпочтительно по меньшей мере гликопротеин оболочки (GP) и белок 40 вириона (VP40), при этом GP и VP40 представляют собой производные из одного и того же штамма, предпочтительно при этом тот же штамм выбран из группы ZEBOV и SEBOV.

В другом варианте реализации настоящего изобретения антигенная детерминанта филовирального белка представляет собой по меньшей мере гликопротеин оболочки (GP) и белок 40 вириона (VP40), при этом GP и VP40 получают из различных изолятов или тех же изолятов, предпочтительно при этом различные или те же изоляты выбраны из группы, состоящей из Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke и Marburg-Angola, предпочтительно, при этом изолят выбирается из группы Zaire-Mayinga, Sudan-Gulu, Marburg-Musoke и Marburg-Angola, наиболее предпочтительно, при этом изолят выбирается из группы Zaire-Mayinga, Sudan-Gulu и Marburg-Musoke.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор, согласно настоящему изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенные детерминанты двух, трех, четырех или больше субтипов Эбола и Марбург.

Другой предпочтительный вариант реализации изобретения охватывает рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения, который содержит антигенные детерминанты двух, трех, четырех или более филовиральных белков, выбранных из группы, состоящей из гликопротеина оболочки (GP), нуклеопротеина (NP), белка 35 (VP35) вириона, белка 40 (VP40) вириона, белка 30 (VP30) вириона, белка 24 (VP24) вириона, и белка РНК-зависимой РНК-полимеразы (L).

В предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенные детерминанты одного, двух, трех, четырех или более филовиральных белков, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В другом варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка состоящего из SEQ ID NO: 20.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вари-

антов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 34.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:31 и SEQ ID NO:34.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31 и SEQ ID NO:34.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор по любому из вариантов осуществления изобретения содержит антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В другом варианте реализации изобретения вектор MVA согласно любому из вариантов осуществления изобретения содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального белка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:29 и/или SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:31.

В другом варианте реализации изобретения вектор MVA согласно любому из вариантов осуществления изобретения содержит нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO:28 и/или SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:30.

В другом варианте реализации изобретения вектор MVA согласно любому из вариантов осуществления изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный филовиральный белок 40 вириона (VP40), содержащего SEQ ID NO:33 или нуклеотидную последовательность, кодирующую белковую последовательность, содержащую SEQ ID NO:34.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный вектор MVA согласно любому из вариантов осуществления изобретения, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: а) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:30; б) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:30; и в) SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:33.

В другом аспекте настоящее изобретение включает рекомбинантный вектор MVA или вектор FPV, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина, в частности филовирального гликопротеина оболочки.

Филовиральный гликопротеин может кодироваться GP-MARV или GP-EBOV.

Для описанных здесь вариантов осуществления изобретения гликопротеин из MARV может быть получен из MARV-Musoke, предпочтительно полноразмерный MARV-Musoke, который, в свою очередь, может быть получен из штамма озера Виктория или изолята MARV-Musoke. GP-MARV также может быть получен из MARV-Ravn, MARV-Ozolin, MARV-Ratayczak или из MARV-Angola. Нуклеотидная последовательность, кодирующая GP-MARV-Musoke приведена в SEQ ID NO:5, кодирующая аминокислоты 1-681 или 19-681 SEQ ID NO:6. В предпочтительном варианте реализации изобретения, GP-MARV-Musoke содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5, предпочтительно кодирующую белок SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации изобретения, GP-MARV-Musoke является усеченным, при этом усеченный GP-MARV-Musoke, может содержать только внеклеточный домен гликопротеина оболочки, содержащего аминокислоты 1-648 или аминокислоты 19-648 SEQ ID NO:6 (номер доступа Генобанка ABA87127.1). В других вариантах реализации изобретения, как описано в настоящем изобретении, гликопротеин MARV может быть получен из MARV-Angola, предпочтительно полноразмерный GP-MARV-Angola. В предпочтительном варианте реализации изобретения, GP-MARV-Angola содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:36, кодирующую SEQ ID NO:37.

Гликопротеин EBOV может представлять собой GP-SEBOV или могут быть получен из GP-ZEBOV, в частности, из штамма Mayinga GP-ZEBOV (GP-ZEBOV-Mayinga). Полноразмерный GP-ZEBOV-Mayinga содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:19, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20. В предпочтительном варианте GP-ZEBOV-Mayinga содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:19, предпочтительно кодирующую белок SEQ ID NO:20. GP-EBOV могут также представлять собой GP-BEBOV, GP-Ebola-Cdi или GP-EBOV-Reston. GP-ZEBOV может быть усеченным и может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:19, измененную для кодирования аминокислот 1-636 функции SEQ ID NO:20, или измененную, чтобы удалить домен муцина, охватывающий аминокислоты 314-464 SEQ ID NO:20.

GP-SEBOV может быть получен из штамма Gulu GP-SEBOV (GP-SEBOV-Gulu). В некоторых вариантах реализации изобретения, GP-SEBOV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:30, предпочтительно, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

Рекомбинантный MVA/FPV, согласно настоящему изобретению, также может дополнительно содержать последовательность фрагмента С столбнячного анатоксина. В предпочтительном варианте реализации изобретения GP-MARV-Musoke, в частности, полноразмерный GP MARV-Musoke дополнительно содержит фрагмент С столбнячного анатоксина. Фрагмент С столбнячного анатоксина может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7, кодирующую аминокислотную последовательность

тельность SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации изобретения GP-MARV-Musoke дополнительно содержит фрагмент С столбнячного анатоксина (САС), который может содержать нуклеотиды 2281-3642 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7, кодирующие аминокислоты 760-1213 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

Рекомбинантный MVA/FPV вектор, согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать иммуностимулирующие или костимуляторующие молекулы. В предпочтительном варианте реализации изобретения, гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту GP-MARV-Musoke, дополнительно содержит одну или более иммуностимулирующих молекул. В некоторых вариантах реализации изобретения, одна или больше иммуностимулирующих молекул представляет собой человеческий CD40 лиганд, (hCD40L), который может содержать SEQ ID NO:9, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах реализации изобретения, одна или более иммуностимулирующих молекул представляет собой слитый белок, содержащий суши-домен рецептора человеческого интерлейкин-15 (hIL15R-Sushi), который может содержать SEQ ID NO:11, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

Одна или более иммуностимулирующих молекул также могут представлять собой лимфоцитарный функционально-связанный антиген 3 (LFA-3, или CD58), молекулу внутриклеточной адгезии 1 (ICAM-1, или CD54) и B7.1 (CD80), в совокупности известные как триады ко стимулирующих молекул (т.е. "ТРИКОМ"). "ТРИКОМ", как используется в настоящем изобретении, представляет собой аббревиатуру от Триада Костимулирующих Молекул, состоящая из B7-1 (также известная как CD80), внутриклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM-1, также известная как CD54), и лимфоцитарного функционально-связанного антигена-3 (LFA-3, также известная как CD58), входящие в состав рекомбинантных вирусных векторов (например, поксивирусных векторов), экспрессирующих специфический антиген с целью повышения антиген-специфического иммунного ответа. Отдельные компоненты ТРИКОМ могут быть под контролем одного и того же или разных промоторов, и могут быть предоставлены в том же векторе со специфическим антигеном или в отдельном векторе. Типичные векторы описаны, например, в Hodge et al., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation," *Cancer Res.* 59:5800-5807 (1999) и патент США № 7211432 B2, оба источника включены в настоящий документ посредством ссылки. LFA-3 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:13, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, ICAM-1 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:15, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, и B7.1 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:17, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

Рекомбинантный MVA/FPV, согласно настоящему изобретению, может дополнительно содержать последовательность мембранного якоря, такую как ген B5m вируса коровьей оспы, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:21, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22. В частности, антигенная детерминанта, как описано в настоящем документе, предпочтительно, может быть функционально связана с мембранным якорем, например, таким как B5t. Таким образом, как применяется в настоящем документе, то, что рекомбинантный MVA/FPV содержит последовательность мембранного якоря, это означает, что антигенная детерминанта содержащейся в рекомбинантном MVA/FPV, предпочтительно функционально связана с мембранным якорем. Мембранный якорь обозначает любой полипептид, способный заякоривать гетерологичные полипептиды на внешней поверхности клеточной мембраны. Предпочтительно, мембранный якорь содержит цитоплазматический и трансмембранный домены белка B5R вируса коровьей оспы, обозначенного в настоящем документе как "B5R якорь" или "B5t". В соответствии с определением, B5R якорь обозначает 42-аминокислотный С-концевой сегмент B5R белка из любого типа вируса коровьей оспы, например, WR штамма (Katz et al. *J Virol.* 71 (4):3178-87 (1997)) или более предпочтительно MVA. Кроме того, в настоящее изобретения включены варианты B5R якоря, имеющие по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности по отношению к эталонной B5R якорной последовательности. Предпочтительная последовательность якоря показана в SEQ ID NO: 21, ее трансляционный продукт также показан в SEQ ID NO: 22.

В предпочтительном варианте реализации изобретения, полноразмерный и/или усеченный GP-ZEBOV дополнительно содержит ген B5m вируса коровьей оспы.

В другом аспекте, настоящее изобретение включает рекомбинантный MVA/FPV вектор, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина, как описано выше, и дополнительно содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую дополнительные филовирусные белки, необходимые для формирования вирусоподобных частиц (ВПЧ). В одном варианте реализации изобретения, дополнительная гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая филовирусные белки, необходимая для формирования ВПЧ, может представлять собой VP40. В некоторых вариантах реализации изобретения, дополнительные филовирусные белки, необходимые для формирования вирусоподобных частиц или усиленного образования вирусоподобных частиц, представляют собой NP-EBOV и VP40-EBOV, при этом

белки могут быть получены из штаммов, как указано выше. Предпочтительно, филовиральный нуклеопротеин (например, NP-EBOV) и филовиральный белок 40 вириона (например, VP40-EBOV) получают из того же филовирального штамма. Вакцинируя низших приматов рекомбинантным MVA, экспрессирующим GP и VP40 (либо в дополнение или без экспрессии NP), который способен производить GP-содержащие EBOV-вирусоподобные частицы из инфицированных клеток, изобретатели смогли достичь защиты от вируса низших приматов при проверочном филовиральном заражении. Производство вирусоподобных частиц в животных, которые были вакцинированы, создает дополнительную модальность вакцины, близко имитируя вирусные частицы, присутствующие при настоящей филовиральной инфекции. Такая рекомбинантная вакцинация MVA фило ВПЧ, стимулирует и гуморальный и клеточный иммунный ответы, и таким образом защищает от филовиральной инфекции. Дополнительным преимуществом вакцинации ослабленным вирусом MVA, производящим филовиральные ВПЧ, является избежание необходимости очистки вирусоподобных частиц перед инокуляцией и дополнительная MVA-опосредованная иммуностимуляция. Применение филовирального нуклеопротеина (например, NP-EBOV) и филовирального белка 40 вириона (например, VP40-EBOV), полученных от того же штамма, является полезным для повышения образования вирусоподобных частиц, предпочтительно для производства однородных GP шпикеров, которые декорируют вирусоподобные частицы с однородным диаметром, близко имитируя вирусные частицы и улучшая защиту от филовиральной инфекции.

Настоящее изобретение также связано с рекомбинантным MVA/вектором FPV, содержащим гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина, и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка. Гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка, может кодировать один или более филовиральных белков, выбранных из группы, состоящей из: нуклеопротеина (NP), белка 35 (VP35) вириона, белка 40 (VP40) вириона, белка 30 (VP30) вириона, белка 24 (VP24) вириона, и белка РНК-зависимой РНК-полимеразы (L). Перечисленные гены и белки, соответственно, могут быть получены из одного или более описанных выше филовиральных штаммов. NP-Ebola-Cdi некоторых вариантов реализации изобретения содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:28, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

В некоторых вариантах реализации, VP40 выбирается из MARV или EBOV, предпочтительно VP40 выбран из одного или более субтипов EBOV, который выбран из группы, состоящей из: Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), Ebola virus Ivory Coast (EBOV-Cdi, который также называется вирус Тай-лес или ТАЛБ), вирус Эбола Рестон (EBOV-Reston) и Ebola virus Bundibugyo (BEBOV). В предпочтительном варианте реализации изобретения, VP40 выбран из одного или более ZEBOV, SEBOV и MARV. В некоторых вариантах реализации изобретения, филовиральный гликопротеин и филовиральный VP40 выбираются из того же филовирального штамма. В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения, VP40 и/или филовиральный гликопротеин, выбираются из одного или более: Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke и Marburg-Angola; и более предпочтительно, выбираются из одного или более Zaire-Mayinga (VP40-ZEBOV-Mayinga), Sudan-Gulu (VP40-SEBOV-Gulu), Marburg-Musoke (VP40-MARV-Musoke) и Marburg-Angola (VP40-MARV-Angola). В дополнительном варианте реализации изобретения, вектор MVA в любом из вариантов осуществления изобретения дополнительно содержит филовиральный нуклеопротеин (NP), предпочтительно, при этом филовиральный нуклеопротеин и филовиральный VP40 получают из того же филовирального штамма. В дополнительном варианте реализации изобретения, VP40 содержит нуклеиновую последовательность, кодирующую VP40-ZEBOV-Mayinga или VP40-MARV-Musoke. В других вариантах реализации изобретения, филовиральный VP40 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:33. В дополнительном варианте реализации изобретения, VP40 содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белковую последовательность SEQ ID NO:34. В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения, VP40 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:33, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, и по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка. В некоторых вариантах реализации изобретения, первая гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, кодирует GP-MARV, а вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, кодирует GP-EBOV. Рекомбинантный MVA/FPV вектор содержит, согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, три гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, и по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту дополнительного филовирального

ного белка. Предпочтительно, первая гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, кодирует GP-MARV, вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, кодирует GP-EBOV, и третья гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, кодирует GP-EBOV, полученная из штамма или изолята EBOV, в котором GP-EBOV отличается от такового, что закодировано во второй гетерологичной нуклеотидной последовательности. Соответственно, одна гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, может кодировать GP-SEBOV-Gulu, а другая - GP-ZEBOV-Mayinga.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вектор содержит две гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенную детерминанту GP-EBOV из EBOV штамма или изолята, и две гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенную детерминанту GP-MARV из MARV штамма или изолята, и предпочтительно MARV штамм представляет собой MARV-Angola и MARV-Musoke, а EBOV штамм представляет собой ZEBOV и/или SEBOV, предпочтительно ZEBOV-Mayinga и SEBOV-Gulu. Разумеется, дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту дополнительного филовирального белка, может кодировать также филовиральные белки, выбранные из группы, состоящей из: нуклеопротеина (NP), белка 35 (VP35) вириона, белка 40 (VP40) вириона, белка 30 (VP30) вириона, белка 24 (VP24) вириона, и белка РНК-зависимой РНК-полимеразы (L), как уже упоминалось выше, которые могут также быть получены из различных штаммов, как уже указывалось выше.

Рекомбинантный MVA/FPV вектора, согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, содержит две гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки GP-MARV и GP-EBOV, и третью гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту VP40. Такой VP40 может представлять собой любой VP40, как описано выше или ниже. Соответственно, одна гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки, может кодировать GP-SEBOV-Gulu, другая - GP-ZEBOV-Mayinga, а третья гетерологичная нуклеотидная последовательность, может кодировать антигенную детерминанту филовирального белка VP40-ZEBOV, VP40-SEBOV или VP40-MARV, предпочтительно VP40-ZEBOV-Mayinga или VP40-MARV-Musoke.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор содержит две гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки GP-EBOV, предпочтительно GP-ZEBOV и/или GP-SEBOV, более предпочтительно GP-ZEBOV-Mayinga и GP-SEBOV-Gulu, один филовиральный гликопротеин оболочки GP-MARV, предпочтительно GP-MARV-Musoke, или GP-MARV-Angola, и по меньшей мере один филовиральный нуклеопротеин, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из NP-Ebola-Cdi, NP-ZEBOV, и NP-MARV, предпочтительно NP-MARV-Musoke или NP-MARV-Angola.

Интеграционные сайты в MVA/FPV

Гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты филовирального гликопротеина, в качестве варианта, дополнительно содержащие по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую дополнительный филовиральный белок, могут быть вставлены в одну или несколько межгенных областей (IGR) MVA. В некоторых вариантах реализации изобретения, межгенная область выбирается из: IGR 07/08, IGR 44/45, MO64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, и IGR 148/149. В некоторых вариантах реализации изобретения, менее чем 5, 4, 3 или 2 межгенные области рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты филовирального гликопротеина оболочки и/или дополнительного филовирального белка. Гетерологичные нуклеотидные последовательности могут, дополнительно или альтернативно, быть вставлены в один или несколько естественно-встречающихся делеционных сайтов, в частности в основных делеционных сайтах I, II, III, IV, V или VI в геноме MVA. В некоторых вариантах реализации изобретения, менее чем 5, 4, 3 или 2 из естественно-встречающихся делеционных сайтов рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты филовирального гликопротеина оболочки и/или дополнительного филовирального белка.

Количество инсерционных сайтов MVA, содержащие гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты из филовирального белка может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или больше. В некоторых вариантах реализации изобретения, гетерологичные нуклеотидные последовательности, вставляются в 4, 3, 2, или меньшее количество инсерционных сайтов. Предпочтительно, используется два инсерционных сайта. В некоторых вариантах реализации изобретения, используются три инсерционных сайта.

Предпочтительно, рекомбинантные MVA содержат по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, или 7 генов, вставленных в 2 или 3 инсерционных сайта.

Гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты фило-вирусного гликопротеина, в качестве варианта, дополнительно содержащие по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую дополнительный филовирусный белок, могут быть вставлены в одну или несколько межгенных областей (IGR) FPV. В предпочтительном варианте реализации изобретения, межгенная область находится между ORF 7 и 9, 1,3-кб HindIII фрагмента генома (см. Drillien et al, Virology 160:203-209 (1987) (US 5180675) и Spehner et al, J. Virol. 64:527-533 (1990)). В некоторых вариантах реализации изобретения, гетерологичная нуклеотидная последовательность может быть вставлена в инсерционные сайты вируса оспы кур, как описано в EP 0 538 496 A1 и WO 05/048957, включены в настоящий документ посредством ссылки. Также предпочтительные инсерционные сайты вируса птичьего оспы настоящего изобретения представляют собой LUS инсерционный сайт, FP14 инсерционный сайт, и 4 3К инсерционный сайт. Эти сайты также упоминаются иногда как FPN006/FPN007 (LUS инсерционный сайт), FPN254/FPN255 (LUS инсерционный сайт), FPV060/FPV061 (FP14 инсерционный сайт), и FPV107/FPV108 (43К инсерционный сайт).

В одном предпочтительном варианте реализации изобретения инсерционный сайт в вирусе оспы кур представляют собой инсерционный сайт LUS. Существует две длинных уникальных последовательности (LUS) на каждом конце вирусного генома вируса оспы кур (номер доступа ГенБанка: AF 198100.1), и, таким образом, два LUS инсерционных сайта в каждом геноме. LUS инсерционный сайт на левом конце генома лежит 3' FPV006 и 5' FPV007 125L, предпочтительно между позициями 7470 и 7475 в геномной последовательности вируса оспы кур, как аннотировано в номере доступа ГенБанка AF198100.1. LUS инсерционный сайт на правом конце генома лежит 3' FPV254 и 5' FPV255, предпочтительно между позициями 281065 и 281070 в геномной последовательности вируса оспы кур, например, номера доступа ГенБанка AF198100.1. В одном варианте реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность может быть вставлена в любую позицию между нуклеотидными позициями 281065 и 281070.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения инсерционный сайт в вирусе оспы кур представляет собой FP14 инсерционный сайт. Этот сайт находится в 3' FPV060 и 5' FPV061 в геномной последовательности вируса оспы кур, предпочтительно между позициями 67080 и 67097 генома вируса оспы кур, например, номера доступа ГенБанка. AF198100.1. В одном варианте реализации изобретения нуклеотиды между позициями 67080 и 67097 ДНК последовательности удаляются в рекомбинантном вирусе, и заменяются определенными вставками, представляющими собой последовательность интереса. В одном варианте реализации изобретения, FP14 инсерционный сайт находится между ортологом гена FPV060 и ортологом FPV061, например, AF198100.1. Термин "FPV060, FPV061, FPV254" и т. д. обозначает положения соответствующей кодирующей последовательности (например, CDS) соответствующего гена, пронумерованной от 5' к 3' концу, как аннотировано в номере доступа ГенБанка. AF198100.1. В предпочтительном варианте реализации изобретения FP14 инсерционный сайт находится между позициями 67091 и 67092 в геномной последовательности вируса оспы кур (называемые также как IGR60/61 инсерционный сайт, как аннотировано в номере доступа ГенБанка. AF198100.1).

В еще одном предпочтительном варианте реализации изобретения, инсерционный сайт в вирусе оспы кур обозначает 43К инсерционный сайт. Этот сайт находится в 3' FPV107 и 5' FPV108, предпочтительно в позиции 128178 геномной последовательности вируса оспы кур, как аннотировано в номере доступа ГенБанка. AF198100.1.

В предпочтительном варианте реализации изобретения, интеграционный сайт представляет собой FP14 (IGR60/61) и/или BamHI J области. BamHI J области дополнительно описывается в S. Jenkins et al. (1991), Aids Research and Human Retroviruses 7(12):991:998 включенный в настоящий документ посредством ссылки.

В определенном варианте реализации изобретения, IGR представляет собой BamHI J FPV.

Количество инсерционных сайтов FPV, содержащего гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты филовирусного белка, может составлять один или два. Предпочтительно, используется два инсерционных сайта. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантный FPV содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 генов, вставленных в один или два инсерционных сайта.

Рекомбинантные MVA/FPV вирусы представленные в настоящем документе, могут быть созданы с помощью обычных способов, известных в данной области техники. Способы получения рекомбинантных поксвирусов, или вставки экзогенных кодирующих последовательностей в поксивирусный геном, хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, способы стандартных методик молекулярной биологии, таких как клонирование ДНК, ДНК и РНК выделения, Вестерн-блот анализ, ОТ-ПЦР и ПЦР методы амплификации описаны в Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.) (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), и методы обращения с вирусами и манипуляции вирусами, описаны в Virology Methods Manual (B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)). Аналогичным образом, методы и умения для обращения с, манипуляций и генетической инженерии MVA описаны в Molecular Virology: A Practical Approach (A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, Chapter 9: Expression of genes by

Vaccinia virus vectors)) и Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Son, Inc. (1998) (см., например, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)).

Для создания различных рекомбинантных MVA/FPV векторов, описанных в настоящем документе, могут быть применены различные способы. Последовательность ДНК, которую нужно вставить в вирус, может быть размещена в плазмидной конструкции *E. coli*, в которую было вставлено ДНК, гомологичное участку ДНК MVA/FPV. Отдельно, последовательность ДНК для вставки может быть лигирована с промотором. Соединение промотор-ген может быть расположено в плазмидной конструкции таким образом, чтобы соединение промотор-ген фланкировалось на обоих концах ДНК, гомологичной последовательности ДНК, фланкирующей ДНК область MVA/FPV, содержащую несущественный локус. Количество копий полученной плазмидной конструкции может быть увеличено путем размножения в бактерии *E. coli*, и в дальнейшем эта плазмидная конструкция может быть выделенная из бактерии. Выделенная плаزمид, содержащая ДНК последовательность гена, который должен быть вставлен, может быть трансфицирована в культуру клеток, например, культуру эмбриональных куриных фибробластов, в то же время культура инфицируется MVA. Рекомбинация между гомологичным ДНК MVA в плазмиде и вирусным геномом, соответственно, может создавать MVA, модифицированный наличием чужеродной последовательности ДНК.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения, клетки подходящей клеточной культуры, такие, как например КЭФ клетки, могут быть заражены поксивирусом. Зараженная клетка может быть, впоследствии, трансфицирована первым плазмидным вектором, содержащим чужеродный или гетерологичный ген или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем поксивирусного элемента контролирующего экспрессию. Как объяснено выше, плазмидный вектор также содержит последовательности, способные направлять включение экзогенной последовательности в выбранную часть поксивирусного генома. В качестве варианта, плазмидный вектор также содержит кассету, содержащую маркер и/или ген отбора, функционально связанный с поксивирусным промотором. Подходящий маркер или гены отбора представляют собой, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок, β -галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Применение отбора или кассеты маркеров упрощает идентификацию и выделение произведенного рекомбинантного поксивируса. Однако, рекомбинантный поксивирус также может быть определены с помощью метода ПЦР. В последствии, дополнительные клетки могут быть инфицированы рекомбинантным поксивирусом, полученными, как описано выше, и трансфицированы вторым вектором, содержащим второй чужеродный или гетерологичный ген или гены. В случае, если этот ген вводится в разные инсерционные сайты поксивирусного генома, второй вектор также отличается в поксивирус-гомологичных последовательностях, направляющих встраивание второго чужеродного гена или генов в геном поксивируса. После того как произошла гомологичная рекомбинация, может быть выделен рекомбинантный вирус, содержащий два или более чужеродных или гетерологичных гена. Для введения дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус, этапы заражения и трансфекции могут быть повторены с помощью рекомбинантного вируса, выделенного на предыдущих этапах, для заражения, и с помощью дополнительного вектора, содержащего дополнительный чужеродный ген или гены, для трансфекции.

В альтернативном варианте, этапы заражения и трансфекции, как описано выше, являются взаимозаменяемыми, то есть, подходящая клеточная линия может сначала быть трансфицирована плазмидным вектором, содержащим чужеродный ген и, затем, заражена поксивирусом. В дополнительном альтернативном варианте, также возможно ввести каждый чужеродный ген в различные вирусы, заразить клетку совместно всеми полученными рекомбинантными вирусами, провести поиск рекомбинантных вариантов, содержащие все чужеродные гены. Третий альтернативный вариант представляет собой лигирование ДНК генома и чужеродной последовательности *in vitro*, и реконструировать рекомбинированный вирусный ДНК геном вируса коровьей оспы, применяя вспомогательный вирус. Четвертый альтернативный вариант представляет собой гомологичную рекомбинацию в *E. coli* или другом виде бактерий, между геномом вируса коровьей оспы, клонированным как бактериальная искусственная хромосома (BAC), и линейной чужеродной последовательностью, фланкированную ДНК последовательностями, гомологичными последовательностям, фланкирующие желаемые сайты встраивания в геноме вируса коровьей оспы.

Экспрессия гетерологичных филовиральных генов

Гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального белка, может экспрессироваться как единая транскрипционная единица. Например, гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального белка, может быть функционально связана с поксивирусом, например, с промотором вирусом коровьей оспы промотор и/или связана с поксивирусом, например, транскрипционным терминатором вируса коровьей оспы.

В некоторых вариантах реализации изобретения, "транскрипционная единица" вставляется самостоятельно в инсерционный сайт MVA/FPV генома. В некоторых вариантах реализации изобретения, "транскрипционная единица" вставляется вместе с другой единицей транскрипции в инсерционный сайт MVA/FPV генома. "Транскрипционная единица" не встречается в природе (т. е. является гетерологичной,

экзогенной или чужеродной) в MVA/FPV геноме, и способна к транскрипции в зараженных клетках.

Предпочтительно рекомбинантный MVA/FPV содержит 1, 2, 3, 4, 5, или более транскрипционных единиц, вставленных в MVA/FPV геном. В некоторых вариантах реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV стабильно экспрессирует гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенные детерминанты филовирального белка, кодируемый 1, 2, 3, 4, 5, или более транскрипционными единицами. В некоторых вариантах реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV содержит 2, 3, 4, 5, или более транскрипционных единиц, вставленных в MVA/FPV геном в 1, 2, 3 или более инсерционных сайта в MVA/FPV геноме.

В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия одного, нескольких или всех гетерологичных нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенные детерминанты филовирального белка, находится под контролем одного или более поксиовирального промотора. В некоторых вариантах реализации изобретения поксиовирусный промотор представляет собой Pr7.5 промотор, гибрид раннего/позднего промотора, PrS промотор, PrS5E промотор, синтетический или естественный ранний или поздний промотор, или ATI промотор вируса коровьей оспы. Подходящие промоторы дополнительно описаны в WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 и WO 2014/063832, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения поксиовирусный промотор выбран из группы, состоящей из PrS промотора (SEQ ID NO:23), PrS5E промотора (SEQ ID NO:24), Pr7.5 (SEQ ID NO:25), ® промотора (SEQ ID NO:27), Pr13.5 длинного промотора (SEQ ID NO:35) и FPV-40K промотора (SEQ ID NO:26); более предпочтительно, выбран из группы, состоящей из: PrS промотора (SEQ ID NO:23), PrS5E промотора (SEQ ID NO:24), Pr7.5 (SEQ ID NO:25) и PrLE1 промотора (SEQ ID NO:27).

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального белка, предпочтительно ZEBOV, SEBOV, Ebola-Cdi, MARV и NP-ZEBOV белка, более предпочтительно GP-ZEBOV-Mayinga, GP-SEBOV-Gulu, GP-MARV и NP-ZEBOV, более предпочтительно GP-MARV-Musoke или GP-MARV-Angola, находится под контролем промотора, выбранного из группы, состоящей из PrS, PrLE1 и Pr7.5. В предпочтительном варианте реализации изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального белка GP-SEBOV и GP-MARV-Musoke, экспрессируется под контролем PrS промотора (например, SEQ ID NO:23), NP-Ebola-Cdi экспрессируется под контролем PrLE1 или модифицированного PrLE1 промотора (например, SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:32), и GP-ZEBOV-Mayinga экспрессируется под контролем положения Pr7.5 промотора (например, SEQ ID NO:25).

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту филовирального белка FPV любого из вариантов реализации изобретения, находится под контролем промотора, предпочтительно содержащего или имеющего SEQ ID NO:26.

Филовиральные вакцины и фармацевтические композиции

Поскольку рекомбинантные вирусы MVA, описанные в настоящем документе, являются сильно ограниченными в репликации, и таким образом, сильно ослабленными, они являются идеальными кандидатами для лечения широкого круга иммунодефицитных, включая людей, и даже людей с ослабленным иммунитетом. Следовательно, в настоящем документе предложены фармацевтические композиции и вакцины для индукции иммунного ответа в живом организме животного, включая человека. Дополнительно предложен рекомбинантный вектор MVA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту филовирального гликопротеина для применения в лечении и/или профилактике филовирального заболевания.

Вакцина предпочтительно содержит любой рекомбинантный вирус MVA, описанный в настоящем документе, приготовленная в виде раствора в диапазоне концентраций от 10^4 до 10^9 ИДКТ₅₀/мл, 10^5 в 5×10^8 ИДКТ₅₀/мл, от 10^6 до 10^8 ИДКТ₅₀/мл, или от 10^7 до 10^8 ИДКТ₅₀/мл. Предпочтительная доза для вакцинации для человека составляет от 10^6 до 10^9 ИДКТ₅₀, в том числе доза 10^6 ИДКТ₅₀, 10^7 ИДКТ₅₀, или 10^8 ИДКТ₅₀.

Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут как правило, включать один или более фармацевтически приемлемый и/или одобренный носитель, добавки, антибиотики, консерванты, адъюванты, разбавители и/или стабилизаторы. Такими вспомогательными веществами могут быть: вода, физиологический раствор, глицерин, этанол, увлажняющие или эмульгирующие агенты, pH буферные вещества, или тому подобное. Подходящие носители обычно являются большими, медленно метаболизирующимися молекулами, такими как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты, или тому подобное.

Для приготовления вакцин, рекомбинантные вирусы MVA, предложенные в настоящем документе, могут быть преобразованы в физиологически приемлемую форму. Это может быть сделано на основе опыта в подготовке поксиовирусных вакцин, применяемых для вакцинации против оспы, как описано Н. Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99:2386-2392 (1974).

Например, очищенные вирусы могут храниться при температуре -80°C с титром 5×10^8 ИДКТ₅₀/мл, приготовленные примерно в 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl и pH 7,4. Для приготовления доз вакцины, например, 10^2 - 10^8 или 10^2 - 10^9 частиц вируса могут быть лиофилизированы в 100 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР) в присутствии 2% пептона и 1% альбумина человека, в ампуле, предпочтительно в стеклянной ампуле. В качестве варианта дозы вакцины могут быть приготовлены с помощью поэтапной лиофилизации вируса в лекарственный препарат. Этот лекарственный препарат может содержать дополнительные добавки, такие как маннит, декстрин, сахар, глицин, лактозу или поливинилпирролидон, или других средства, такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, сывороточный альбумин человека), подходящие для *in vivo* введения. Затем стеклянная ампула герметизируется и может храниться при температуре от 4°C до комнатной температуре в течение нескольких месяцев. Однако, пока нет необходимости, ампулу хранят предпочтительно при температурах ниже -20°C .

Для вакцинации или терапии, лиофилизат может быть растворен в водном растворе, предпочтительно физиологическом растворе или Трис-буфере, и введен или системно, или локально, т. е. парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально, или любым другим известным путем введения, опытный практикующим врачом. Режим введения, доза и количество введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области техники известным способом. Однако, чаще всего пациент вакцинируется второй дозой вакцины примерно в течение от одного месяца до шести недель после первой вакцинации.

Комбинированные вакцины, применяя гомологичные/гетерологичные примирования-бустирования режимы

Комбинированный вакцины и способы, описанные в настоящем документе, могут также применяться как часть гомологичного примирования-бустирования режима. В гомологичном примирования-бустирования режиме, проводится первая примиряющая вакцинация, за которой следует одна или более последующих усиливающих иммунный ответ вакцинаций. Повторные вакцинации выполнены с возможностью для того чтобы повысить иммунный ответ, созданный при первой вакцинации, путем введения того же рекомбинантного поксивируса, который был использован в первой вакцинации.

В одном типовом варианте реализации изобретения, может быть использован гомологичный примирования-бустирования режим, при этом вирусный вектор MVA, как определено в настоящем документе, вводится в первой дозе. Может быть проведено одно или более последующих введения вирус MVA вектора, как определено в настоящем документе, чтобы повысить иммунный ответ, вызванный при первом введении. Предпочтительно, одна или более антигенных детерминант представляют собой такие же или похожие на те, что и при первом введении.

MVA и FPV рекомбинантные вирусные векторы, согласно настоящему изобретению, также могут быть применены в гетерологичных примированиях-бустированиях режимах, в которых одна или более начальных примиряющих вакцинаций выполняются с помощью вектора MVA или FPV, как определено в настоящем документе, и одна или более последующих усиливающих иммунный ответ вакцинаций выполняются поксивирусным вектором, не примененным в примиряющих вакцинациях, например, если вектор MVA, определенный в настоящем документе, предоставляется в примирования-бустирования режиме, то последующие бустирование вакцинации будут проводиться векторами FPV и наоборот.

В предпочтительном варианте реализации изобретения примиряющая вакцинация выполняется вектором MVA, а повторная вакцинация вектором FPV. В качестве варианта один из аспектов изобретения связан с комбинированной вакциной, содержащей:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере одного филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем первые композиции представляют собой примиряющую композицию, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования, предпочтительно, при этом композиция для бустирования содержит две или более доз вектора композиции для бустирования.

Вакцины и наборы, содержащие рекомбинантные MVA и FPV вирусы

Также в настоящем документе предложены вакцины и наборы, содержащие любую одну или более рекомбинантных FPV и/или MVA, описанных в настоящем документе. Набор может содержать один или множество контейнеров или флаконов рекомбинантного MVA или FPV, вместе с инструкциями для введения рекомбинантного MVA и FPV субъекту, подверженному риску заражения филовиром. В некоторых вариантах реализации изобретения, субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, в инструкции указывается, что рекомбинантный MVA вводят субъекту в виде одной дозы или нескольких (например, 2, 3, 4 и т. д.) доз. В некоторых вариантах реализации изобретения, в инструкции указывается, что рекомбинантный вирус MVA или FPV вводят при первом (при-

мирование) и втором (бустирование) введении зараженным или незараженным субъектам. Предпочтительно, набор содержит по меньшей мере две ампулы для примиряющей/бустировающей иммунизации, содержащие рекомбинантные MVA, как описано в настоящем документе, для первой инокуляции ("примиряющая инокуляция") в первой ампуле/контейнере, и для по меньшей мере второй и/или третьей, и/или дополнительной инокуляции ("бустировающая инокуляция") во второй и/или дополнительной ампуле/контейнере.

В предпочтительном варианте реализации изобретения вакцины и наборы, предложенные в настоящем документе, содержат первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго филовирального субтипа, третьего филовирального субтипа, или по меньшей мере четырех подвидов филовирусов.

В предпочтительном варианте реализации изобретения вакцины и наборы, предложенные в настоящем документе, содержат вектор MVA в первой композиции, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В дополнительном варианте реализации изобретения вакцины и наборы, предложенные в настоящем документе, содержат вектор MVA в первой композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, имеющей: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:31, предпочтительно, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, имеющей: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:31.

В дополнительном варианте реализации изобретения вакцины и наборы, предложенные в настоящем документе, содержат первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере четырех филовирусных подвидов, предпочтительно, при этом четыре разных филовирусных субтипа выбираются из группы, имеющей: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В дополнительном варианте реализации изобретения вакцины и наборы, предложенные в настоящем документе, предназначены для применения в создании защитного иммунного ответа против по меньшей мере одного филовирального субтипа, причем первая композиция применяется для примирования упомянутого иммунного ответа, а вторая композиция, применяется для бустирования упомянутого иммунного ответа, или для применения в создании защитного иммунного ответа против по меньшей мере одного филовирального субтипа, при этом вторая композиция применяется для примирования упомянутого иммунного ответа, а первая композиция применяется для бустирования упомянутого иммунного ответа. В любой вакцине, и любом наборе, которые предложены в настоящем документе, композиция для бустированная может содержать две или более дозы вектора композиции для бустирования.

Как обсуждалось ранее выше, настоящее изобретение также связано с гетерологичными режимами вакцинации, с применением двух разных нереплицирующихся вирусных векторов.

Для гетерологичных режимов вакцинации, в настоящем изобретении предложена совмещенная вакцина и/или набор для вакцинации, которая(ый) содержит:

а) первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В настоящем изобретении также предложена совмещенная вакцина и/или набор для вакцинации, которая(ый) содержит:

(а) первой композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

(б) второй композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В этом варианте реализации изобретения совмещенные вакцины и/или наборы содержат по меньшей мере две ампулы для примиряющей/бустировающей иммунизации, содержащие рекомбинантный MVA/FPV, как описано в настоящем документе, для первой инокуляции ("примиряющая инокуляция") в первой пробирке/контейнере, и по меньшей мере для второй и/или третьей, и/или дополнительной инокуляции ("бустировающая инокуляция") в второй и/или дополнительной ампуле/контейнере.

Совмещенная вакцина и/или набора может содержать несколько контейнеров или флаконов рекомбинантного MVA/FPV, вместе с инструкциями для введения рекомбинантного MVA/FPV субъекту, подверженному риску заражения филловиром. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации изобретения в инструкции указывается, что рекомбинантный MVA/FPV вводят субъекту в виде одной дозы или нескольких (например, 2, 3, 4 и т.д.) доз. В некоторых вариантах реализации изобретения в инструкции указывается, что рекомбинантный MVA/FPV вирус вводят при первом (примирование) и втором (бустирование) введении зараженным или незараженным субъектам.

Первая и/или вторая композиция или MVA и/или FPV любой совмещенной вакцины, набора для вакцинации и/или гетерологичных программ вакцинации по изобретению, может содержать любой из MVA и/или векторов FPV, которые описанные в настоящем документе, или, как более подробно описано в разделе "Рекомбинантные MVA и FPV", и любую их комбинацию.

В предпочтительном варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат первую композицию, содержащую вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго филловирного субтипа, антигенную детерминанту третьего филловирного субтипа, антигенную детерминанту четырех филловирных субтипов или антигенную детерминанту, по меньшей мере четырех филловирных субтипов.

В другом варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат филловирный субтип из вируса Эбола (EBOV) или вирус Марбург (MARV).

В другом варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат антигенную детерминанту из одного или более EBOV субтипа, выбранного из группы, состоящей из: Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), EBOLA virus d'Ivoire Cote (Ebola-Cdi), Ebola virus Reston (REBOV) и Ebola virus Bundibugyo (BEBOV).

В другом варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат антигенную детерминанту филловирного белка, выбранного из группы, состоящей из гликопротеина оболочки (GP), нуклеопротеина (NP), белка 35 (VP35) вириона, белка 40 (VP40) вириона, белок 30 (VP30) вириона, белок 24 (VP24) вириона, и белка РНК-зависимой РНК-полимеразы белка (L).

В дополнительном варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат вектор MVA в первой композиции, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В дополнительном варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере четырех филловирных субтипов, предпочтительно, при этом четыре разных филловирных субтипа выбираются из группы, имеющей: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В предпочтительном варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, содержат первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки из четырех различных филловирных субтипов, выбранных из группы, имеющей: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:31.

В другом варианте реализации изобретения совмещенные вакцины, предложенные в настоящем документе, применяются для создания защитного иммунного ответа против по меньшей мере одного филловирного субтипа, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере четырех филловирных субтипов.

В другом варианте реализации настоящего изобретения настоящее изобретение связано с совмещенной вакциной или рекомбинантным MVA любого из вариантов реализации изобретения, для применения в качестве лекарственного средства или вакцины для создания защитного иммунного ответа, или для вызова усиленного иммунного ответа против по меньшей мере одного филловирного субтипа, по меньшей мере двух филловирных субтипов, по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех филловирных субтипов, причем MVA способен производить филловир-подобные частицы в субъекте, который лечат, желательно, при этом MVA производит филловир-подобные частицы в субъекте, который лечат.

Способы и применения рекомбинантных MVA/FPV вирусов

Также, в настоящем документе предложены способы и/или любые рекомбинантные MVA/FPV, как описано в настоящем документе, для применения в способе иммунизации животного субъекта или влияющих на иммунный ответ в субъекте. Кроме того, рассматриваются следующие виды применения рекомбинантных MVA/FPV, как описано в настоящем документе, для приготовления лекарства или лекарственного средства, применяемого для иммунизации животного субъекта, в частности для приготовления лекарственного средства или вакцины для лечения и/или для предотвращения вызванного филловиром заболевания субъекта. Также предложен рекомбинантный MVA/FPV в соответствии с любым вариантом

реализации настоящего изобретения, для применения в примировании или усилении иммунного ответа против филовируса, предпочтительно, при этом рекомбинантный MVA и/или рекомбинантный FPV вводят однократно, дважды, трижды, или четыре раза.

Дополнительно, в настоящем документе рассматриваются следующие виды применения комбинаций вакцин или рекомбинантного MVA по любому из вариантов реализации изобретения, для применения в качестве лекарственного средства или вакцины для индукции усиленного иммунного ответа против филовиральной инфекции, причем MVA способен производить филовирус-подобные частицы в субъекте, который лечат, желательно, при этом, MVA производит филовирус-подобные частицы в субъекте, который лечат. Также, в настоящем документе рассматриваются следующие виды применения комбинаций вакцин или рекомбинантного MVA по любому из вариантов реализации изобретения, для применения в лечение или профилактике филовиральной инфекции, причем MVA способен производить филовирус-подобные частицы в субъекте, который лечат, желательно, при этом, MVA производит филовирус-подобные частицы в субъекте, который лечат.

Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения, в настоящем изобретении предложен способ вызова иммунного ответа против филовируса у субъекта, включающий стадию, в которой субъекту вводят:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора на основе вируса оспы кур, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В другом варианте реализации изобретения в изобретение предложен способ вызова иммунного ответа против филовируса у субъекта, включающий стадию, в которой субъекту вводят:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовирусных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирусного субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем одна из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования.

В другом варианте реализации изобретения в настоящем документе описаны: способ вызова иммунного ответа против филовируса, применение рекомбинантных MVA/FPV для приготовления лекарственного средства и иммунизации животного субъекта, в частности, для приготовления лекарственного средства или вакцины для лечения и/или профилактики вызванного филовирусом заболевания у субъекта, или совмещенная вакцина по любому из вариантов реализации изобретения, для применения в обеспечении защитного иммунного ответа против филовиральной инфекции, как предложено в настоящем документе, содержит первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок второго филовирусного субтипа, третьего филовирусного субтипа или по меньшей мере четырех филовирусных субтипов.

В другом варианте реализации изобретения в настоящем документе описаны: способ вызова иммунного ответа против филовируса, применение рекомбинантных MVA/FPV для приготовления лекарственного средства и иммунизации животного субъекта, в частности, для приготовления лекарственного средства или вакцины для лечения и/или профилактики вызванного филовирусом заболевания у субъекта, или совмещенная вакцина по любому из вариантов реализации изобретения, для применения в обеспечении защитного иммунного ответа против филовиральной инфекции, как предложено в настоящем документе, содержит первую композицию, которая содержит вектор MVA в первой композиции, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В дополнительном варианте реализации изобретения, в настоящем документе описаны: способ вызова иммунного ответа против филовируса, применение рекомбинантных MVA/FPV для приготовления лекарственного средства и иммунизации животного субъекта, в частности, для приготовления лекарственного средства или вакцины для лечения и/или профилактики вызванного филовирусом заболевания у субъекта, или совмещенная вакцина по любому из вариантов реализации изобретения, для применения в обеспечении защитного иммунного ответа против филовиральной инфекции, как предложено в настоящем документе, содержит первую композицию, которая содержит вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок по меньшей мере четырех филовирусных субтипов, предпочтительно, при этом четыре разных филовирусных субтипа выбраны из группы, имеющей: SEQ ID

NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В другом варианте реализации в настоящем изобретение предложен способ обеспечения защитного иммунитета и/или защитного иммунного ответа против филовирусной инфекции в субъекте. В другом варианте реализации в изобретение предложен способ обеспечения защитного иммунитета и/или защитного иммунного ответа против филовирусной инфекции у субъекта, включающий стадию в которой субъекту вводят:

а) первую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора MVA, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенные белки по меньшей мере двух филовиральных субтипов, предпочтительно, по меньшей мере трех, или по меньшей мере четырех разных филовиральных субтипов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и

б) вторую композицию, содержащую иммунологически эффективное количество вектора FPV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок первого филовирального субтипа, вместе с фармацевтически приемлемым носителем;

причем первая из композиций представляет собой композицию для примирования, а другая композиция представляет собой композицию для бустирования, предпочтительно, при этом композиция для бустирования, предпочтительно, для введения единажды, дважды, трижды или четырежды.

В другом варианте реализации изобретения, способ, обеспечивающий защитный иммунитет и/или защитный иммунный ответ против филовирусной инфекции по любому из вариантов реализации изобретения, включает вектор MVA в первой композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В другом варианте реализации изобретения, способ, обеспечивающий защитный иммунитет и/или защитный иммунный ответ против филовирусной инфекции по любому из вариантов реализации изобретения, включает вектор MVA в первой композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок из четырех разных филовиральных субтипов, имеющий: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:37.

В другом варианте реализации, в настоящем изобретении предложен способ продуцирования филовирал-подобных частиц или способ вызова усиленного иммунного ответа против филовируса в субъекте, способ, включающий производство филовирал-подобных частиц в субъекте по любому из вариантов реализации изобретения, причем филовиральный VP40 выбран из группы, состоящей из Ebola virus Zaire (ZEBOV), Ebola virus Sudan (SEBOV), вируса Эбола с Кот д'Ивуар (Ebola-Cdi), Ebola virus Reston (REBOV) и Ebola virus Bundibugyo (BEBOV), предпочтительно, при этом филовиральный VP40 выбирается из группы из одного или более ZEBOV, SEBOV и MARV.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ продуцирования филовирал-подобных частиц или способ вызова усиленного иммунного ответа против филовируса в субъекте, способ, включающий производство филовирал-подобных частиц в субъекте по любому из вариантов реализации изобретения, причем филовиральный гликопротеин и филовиральный VP40 выбраны из того же филовирального штамма.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ продуцирования филовирал-подобных частиц или способ вызова усиленного иммунного ответа против филовируса в субъекте, способ, включающий производство филовирал-подобных частиц в субъекте по любому из вариантов реализации изобретения, причем вектор MVA дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую филовиральный нуклеопротеин (NP), предпочтительно при этом филовиральный нуклеопротеин и филовиральный VP40 получены из того самого филовирального штамма.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения филовиральный штамм по любому из выше перечисленных способов выбирается из группы Zaire-Mayinga, Zaire-Kikwit, Zaire-Gabon, Ebola virus Cote d'Ivoire, Sudan-Boniface, Sudan-Maleo, Sudan-Gulu, Marburg-Ravn, Marburg-Ozolin, Marburg-Ratayczak, Marburg-Musoke, Marburg-Angola, вирусов Zaire-Mayinga или Ebola virus Cote d'Ivoire, предпочтительно при этом филовиральный VP40 выбран из группы Zaire-Mayinga или Marburg-Musoke, более предпочтительно филовиральный VP40 содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белковую последовательность SEQ ID NO:34 или при этом нуклеиновая кислота, кодирующая антигенный белок филовирального VP40 содержит SEQ ID NO:33.

Как используется здесь, термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфекцию возбудителя, против которого была сделана прививка. Как правило, субъект, имеющий выработанный "защитный иммунный ответ" показывает только от легких до умеренных клинических симптомов, или вообще никаких симптомов. Как правило, субъект имеющий "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" против некоего возбудителя не умирает в результате инфицирования указанным возбудителем. В некоторых вариантах реализации изобретения, животный субъект представляет собой млекопитающее. Млекопитающее может быть взрослой коровой, теленком, в частности ювенильным теленком, крысой, кроликом, свиньей, мышью, но предпочтительно человеком, и способ включает введение субъекту дозы любого одного или более ре-

комбинантных MVA/FPV, предложенных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой взрослого человека. В некоторых вариантах реализации изобретения взрослый человек представляет собой взрослого человека с ослабленным иммунитетом. В некоторых вариантах реализации изобретения, взрослый человек имеет возраст 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, или 85 лет. В некоторых вариантах реализации изобретения, возраст субъекта составляет менее чем 5 лет, менее чем 3 года, менее чем 2 года, менее чем 15 месяцев, менее чем 12 месяцев, менее чем 9 месяцев, менее чем 6 месяцев, или менее чем 3 месяца. В некоторых вариантах реализации изобретения возраст субъекта составляет от 0 до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев, от 6 до 9 месяцев, от 9 до 12 месяцев, до 1 до 2 лет, или от 2 до 5 лет.

Любой из рекомбинантных MVA/FPV предложенных в настоящем документе, могут быть введены субъекту в дозе от 10^6 до 10^{10} ИДКТ₅₀, предпочтительно от 10^6 до 10^9 ИДКТ₅₀ как, например, в дозе 10^6 до 10^9 ИДКТ₅₀, 10^6 до 5×10^8 ИДКТ₅₀, 10^7 до 10^8 ИДКТ₅₀, 5×10^7 ИДКТ₅₀ в 5×10^8 ИДКТ₅₀, 10^7 ИДКТ₅₀ или 10^8 ИДКТ₅₀. В некоторых вариантах реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вектор вводят в количестве 1×10^8 ИДКТ₅₀ 1×10^{10} ИДКТ₅₀. В другом варианте реализации изобретения, рекомбинантный MVA/FPV вводят в количестве 1×10^8 ИДКТ₅₀ до 5×10^9 , предпочтительно в количестве 5×10^8 ИДКТ₅₀ в 6×10^9 . В некоторых вариантах реализации изобретения, любой из рекомбинантных MVA, предложенных в настоящем документе, вводят человеческому субъекту в дозе 10^7 ИДКТ₅₀ или 10^8 ИДКТ₅₀ или 5×10^8 ИДКТ₅₀. В некоторых вариантах реализации изобретения, любой из рекомбинантных FPV, предложенных в настоящем документе, вводят человеческому субъекту в дозе 5×10^8 , $6,3 \times 10^8$ или 1×10^9 ИДКТ₅₀.

В другом варианте реализации изобретения рекомбинантные MVA, предложенные в настоящем документе, вводят человеческому субъекту в дозе ниже, чем рекомбинантные FPV. В некоторых вариантах реализации изобретения, любой из рекомбинантных MVA/FPV предложенных в настоящем документе, вводят субъекту в дозах, предусмотренных в настоящем документе, перед воздействием филовиром, как, например, 1, 2, 3, или 4 недели или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 месяцев перед воздействием филовиром. В некоторых вариантах реализации изобретения, любой из рекомбинантных MVA/FPV предложенных в настоящем документе, вводят субъекту в дозах, предложенных в настоящем документе, после воздействия филовиром, как, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, или 24 часа или 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7 дней после воздействия филовиром.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные MVA/FPV предложенные в настоящем документе, вводят субъекту в виде одной дозы или в виде нескольких (например, 2, 3, 4 и т. д.) доз. В некоторых вариантах реализации изобретения, рекомбинантные MVA/FPV предложенные в настоящем документе, вводят при первом (примирование) и втором (усиление иммунного ответа) введениях. Первая доза может составлять от 10^7 до 10^8 ИДКТ₅₀ рекомбинантного MVA/FPV вируса, а вторая доза может составлять от 10^7 до 10^8 ИДКТ₅₀ рекомбинантного MVA/FPV вируса.

Композицию для бустирования, как правило, вводят один или несколько раз, недели или месяцы после введения композиции для примирования, например, спустя около 1 или 2 недели, или 3 недели, или 4 недели, или 6 недель, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 32 недель, один или два года.

Предпочтительно начальную усиливающую иммунный ответ прививку вводят в течение 1-12 недель, 2-12 недель после примирования, более предпочтительно 1, 2, 4 или 8 недель после примирования. В предпочтительном варианте реализации изобретения, первоначальную усиливающую иммунный ответ инокуляцию вводят 4 или 8 недель после примирования. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации изобретения, первоначальное усиление иммунного ответа проводят по меньшей мере 2 недели или, по меньшей мере 4 недели после примирования. В еще одном предпочтительном варианте реализации изобретения первоначальное усиление иммунного ответа проводят в течение 4-12 недель или в течение 4-8 недель после примирования.

Рекомбинантные MVA/FPV, предложенные в настоящем документе, можно вводить системно или локально. В некоторых вариантах реализации изобретения, рекомбинантные MVA/FPV вводят парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно или интраназально, в частности подкожно. Предпочтительно, рекомбинантные MVA/FPV вводят интраназально. В других вариантах реализации изобретения рекомбинантные MVA/FPV вводятся любым другим путем введения, известным опытному практикующему врачу. В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA/FPV вводят внутримышечно, предпочтительно рекомбинантный MVA/FPV вводят внутримышечно в объеме, находящимся в диапазоне от около 100 мкл до 10 мл, предпочтительно содержащий концентрации, например, около от 10^4 до 10^{10} вирусных частиц/мл. Предпочтительно рекомбинантный MVA/FPV вектор вводят в объеме, находящимся в диапазоне от 0,25 до 1,0 мл. Более предпочтительно рекомбинантный MVA/FPV вектор вводят в объеме около 0,5 мл.

Способ получения рекомбинантного MVA/FPV вектора

Дополнительные варианты реализации изобретения включают способ получения рекомбинантного вектора MVA по любому из вариантов осуществления изобретения или антигенную детерминанту, экс-

прессированную из генома указанного рекомбинантного вектора MVA, включающий в себя этапы, в которых:

а) инфицируют клетку-хозяина рекомбинантным вирусом MVA по любому из вариантов реализации изобретения или трансфицируют клетку рекомбинантной ДНК рекомбинантного вируса MVA по любому из вариантов реализации изобретения, предпочтительно с добавлением вспомогательного вируса для производства вирусных частиц MVA,

б) культивируют инфицированную или трансфицированную клетку, и

в) изолируют вирус MVA и/или антигенную детерминанту из указанной клетки.

В другом варианте реализации изобретения изобретение связано с рекомбинантным вирусом MVA и/или антигенной детерминантой, полученной по способу создания рекомбинантного вектора.

Дополнительные варианты реализации изобретения включают способ получения рекомбинантного вектора FPV по любому из вариантов реализации изобретения, или антигенной детерминанты, экспрессированной из генома указанного рекомбинантного вектора FPV, включающий этапы, в которых:

а) инфицируют клетку-хозяина рекомбинантным FPV вирусом по любому из вариантов реализации изобретения или трансфицируют клетку рекомбинантной ДНК рекомбинантного FPV вируса по любому из вариантов реализации изобретения, предпочтительно с добавлением вспомогательного вируса для производства вирусных частиц FPV,

б) культивируют инфицированную или трансфицированную клетку, и

в) изолируют FPV вирус и/или антигенную детерминанту из указанной клетки.

В другом варианте реализации изобретения изобретение связано с рекомбинантным FPV вирусом и/или антигенной детерминантой, полученной по способу создания рекомбинантного вектора.

В другом варианте реализации изобретения изобретение связано со способом получения рекомбинантного вектора MVA, включающим этапы, в которых:

а) инфицируют клетку-хозяина вирусом MVA,

б) трансфицируют инфицированную клетку рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту какого-либо из белков, указанная нуклеотидная последовательность дополнительно содержит геномную последовательность вируса MVA, способная направлять встраивание по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности в геном вируса MVA, и

в) идентифицируют, изолируют и при необходимости очищают созданный рекомбинантный вирус MVA.

В другом варианте реализации изобретения изобретение связано со способом получения рекомбинантного вектора FPV, включающим этапы, в которых:

а) инфицируют клетку-хозяина FPV вирусом,

б) трансфицируют инфицированную клетку рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту какого-либо из белков, указанная нуклеотидная последовательность дополнительно содержит геномную последовательность FPV вируса, способная направлять встраивание по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности в геном FPV вируса, и

в) идентифицируют, изолируют и при необходимости очищают созданный рекомбинантный FPV вирус.

Другие варианты реализации изобретения будут очевидны для специалистов в данной области при рассмотрении спецификации и практическом осуществлении изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что спецификация и примеры будут рассматриваться только как иллюстративные, причем истинный объем и сущность изобретения указываются в формуле изобретения.

Примеры

Подробные примеры, которые следуют далее, предназначены для содействия лучшему пониманию настоящего изобретения. Однако изобретение не ограничивается примерами. Другие варианты реализации изобретения будут очевидны для специалистов в данной области при рассмотрении спецификации и практическом осуществлении изобретения, описанных в настоящем документе.

Пример 1. Конструирование рекомбинантного MVA В следующих разделах описаны конструкции рекомбинантных MVA, содержащие одну или более гетерологичных нуклеиновых кислот, экспрессирующих антигенную детерминанту филовирального гликопротеина оболочки и/или дополнительного филовирального белка. Все остальные конструкции, описанные в настоящем документе, созданы с использованием аналогичных способов. Конструирование MVA-mBN252B (PrS-GP-MARV-Musoke) Полноразмерная ДНК последовательностью гена GP-MARV-Musoke естественного происхождения (изолят Lake Victoria) послужила как эталонная последовательность для конструирования вакцины-кандидата MARV MVA-mBN2 52B. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный GP-MARV-Musoke, была синтезирована в Geneart AG (Регенсбург, Германия) с использованием кодонов, оптимизированных для экспрессии в организме человека, и для того, чтобы свести к минимуму или предотвратить внутренние события гомологической рекомбинации. Хотя кодоновая оптимизация изменила последовательностью ДНК дикого типа, кодон-оптимизированная последовательность кодирует аминокислотную после-

довательность, идентичную последовательности дикого типа GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:6; номер доступа NCBI - ABA87127.1). Экспрессия GP-MARV-Musoke управляется с помощью промотора PrS, синтетического промотора, разработанного на основе ранних и поздних элементов промоторов вируса осповакцины (SEQ ID NO:23; см. также S. Chakrabarti et al., "Compact, Synthetic Vaccinia Virus Early/Late Promoter for Protein Expression", *BioTechniques* 23 (6) :1094-1097 (1997)). Кодон-оптимизированный ген GP-MARV-Musoke был вставлен в геном MVA-BN с помощью стандартных способов (см. ниже), применяя одну из нескольких адаптированных рекомбинантных плазмид, нацеленных на различные определенные области генома MVA-BN, в том числе и на сайты делеции или межгенные (некодирующие) области (IGR).

Для того чтобы вставить кодон-оптимизированный ген GP-MARV-Musoke в геном MVA-BN, клетки куриных эмбриональных фибробластов (клетки КЭФ) были инфицированы MVA-BN и впоследствии трансфицированы рекомбинационной плазмидой pBN4 33 (фиг. 5А). pBN433 содержал кодон-оптимизированный ген GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5 (ДНК), кодирующая SEQ ID NO:6 (аминокислотная)) под контролем синтетического PrS промотора, вставленного с помощью BspEI/NheI рестрикцию в плазмиду pBNX197 (фиг. 4Б). PBN433 плазмиды также содержит последовательности ДНК MVA-BN, фланкирующие IGR 148/149 в геноме MVA-BN, и селекционную кассету, фланкированную сайтами loxP, которые позволяют последующее выбрасывание кассеты с помощью Cre рекомбиназо-опосредованной рекомбинации. После гомологичной рекомбинации между фланкирующими последовательностями в плазмиде и гомологичными последовательностями в нужном инсерционном сайте в геноме MVA-BN (т.е. IGR 148/149), кодирующая часть плазмиды была вставлена в нужный сайт в геноме MVA-BN.

После амплификации и клонирования с помощью метода бляшкообразования (девять пассажей; три из них включали клонирование с помощью метода бляшкообразования) при селективных условиях (микофеноловая кислота/ксантин и гипоксантин), был получен рекомбинантный MVA-BN продукт, обозначенный как MVAmBN252A (PreMaster A), содержащий ген GP-MARV-Musoke. Рекомбинантный MVA-mBN2 52A PreMaster исходный вирус был проверен на выбрасывание MVA-BN (родительский вирус; данные не показаны), на правильность последовательности вставленного гена вместе с инсерционными фланкирующими областями (с помощью ген-специфической ПЦР, применяя праймеры, специфичные для геномной MVA-BN последовательности, в которую был вставлен чужеродный ген; данные не показаны), на отсутствия микроорганизмов (тест на стерильность; данные не показаны), и на наличие и правильный размер вставки (с помощью секвенирования; данные не показаны). Также был определен титр исходного вируса MVAmBN252A PreMaster.

Наличие селекционной кассеты во вставленной последовательности разрешает проведение положительного отбора рекомбинантных вирусов MVA-BN в культуре. Чтобы создать рекомбинантный MVA-mBN252B, селекционная кассета была удалена из исходного вируса MVA-mBN252A PreMaster, применяя систему Cre/loxP. Чтобы удалить селекционную кассету, КЭФ клетки, инфицированные рекомбинантным MVA-BN, содержащим вставку плазмиды pBN433 (например, GP-MARV-Musoke под контролем PrS промотора, а также селекционная кассета, фланкирована loxP сайтами) были дополнительно трансфицированы pBN274, плазмидой экспрессии, кодирующей CRE рекомбиназу (Фиг. 4В). Сайт-специфическая Cre-рекомбиназа катализирует точное вырезание последовательностей ДНК селекционной кассеты, фланкированных целевой последовательностью loxP, полностью удаляя селекционную кассету. Полученный вирус был клонирован с помощью метода бляшкообразования, при не селективных условиях (двадцать семь пассажей, девять из них включали клонирование с помощью метода бляшкообразования), и был выделен рекомбинантный вирус MVA-mBN252B, лишенный селекционной кассеты. Полное устранение селекционной кассеты было подтверждено с помощью "вложенной" ПЦР (данные не показаны). В результате, экспрессия GP-MARV-Musoke с помощью рекомбинантного MVA-mBN252B была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; данные не показаны). Конструирование MVA-mBN226B (Мультиантиген MVA-Filo) Для всех трансгенов, экспрессируемых MVA-mBN226B, полноразмерные ДНК последовательности генов природного происхождения служили эталонными последовательностями. Те были синтезированы в Genearth AG (Регенсбург, Германия) с использованием кодонов, оптимизированных для экспрессии в организме человека, и для того, чтобы свести к минимуму или предотвратить внутренние события гомологической рекомбинации. Оптимизация кодонов изменила последовательность ДНК дикого типа без изменения аминокислотной последовательности. MVA-mBN226B содержит такие филовиральные гены: GP-SEBOV (SEQ ID NO:30); NP-EBOV-CdI (SEQ ID NO:28); GP-ZEBOV, штамм Mayinga (GP-ZEBOV-Mayinga, SEQ ID NO:19) и GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5). GP-SEBOV и GP-MARV-Musoke экспрессируются под контролем PrS промотора (SEQ ID NO:23), NP-EBOV-CdI экспрессируются под контролем PrLE1 или модифицированного PrLE1 промотора (SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:32), и GP-ZEBOV-Mayinga экспрессируются под контролем Pr7.5 промотора (SEQ ID NO:25).

Промотор PrS представляет собой синтетический промотор, разработанный на основе ранних и поздних элементов Vaccinia virus промоторов, который обеспечивает экспрессию трансгена во время ранней и поздней фаз экспрессии генов. Аналогичным образом, Pr7.5 промотор из 7,5 кДа гена вируса коровьей оспы представляет собой сильный ранний и поздний промотор, что означает, что трансгены

под его контролем также будут экспрессироваться во время ранней и поздней фаз экспрессии генов (SEQ ID NO:25; см. также M.A. Cochran et al., "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals", J. Virol. 54(1): 30-37 (1985)). Промотор PrLE1 представляет собой искусственный промотор, состоящий из промотора вирусного включения А-типа вируса коровьей оспы (АТ1), слитый с пятью оптимизированными ранними элементами, полученными из Pr7.5 (SEQ ID NO:27; см. также K. Baur et al., "Immediate-Early Expression of a Recombinant Antigen by Modified Vaccinia Virus Ankara Breaks the Immunodominance of Strong Vector-Specific B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T-Cell Responses", J. Virol. 84(17): 8743-8752 (2010)). Следовательно, NP-EBOV-CdI будет экспрессироваться во время ранней и поздней фаз экспрессии. Кроме того, было показано, что PrLE1 вызывает особенно сильный, клеточно-опосредованный иммунный ответ. При пассажировании MVA-mBN226B, был потерян один из пяти ранних элементов, полученных из Pr7.5, вероятно, путем гомологичной рекомбинации; анализ показал достаточный уровень экспрессии NP-EBOV-CdI, однако (данные не показаны), измененная конструкция была использована без замены модифицированного промотора PrLE1.

Для вставки чужеродных генов в геном MVA-BN, было создано несколько рекомбинационных плазмид, которые нацелены на различные области удаления и межгенные области (IGR) генома MVA-BN. Для создания рекомбинантных MVA-BN продуктов, чужеродные последовательности интереса могут быть встроены в любой из этих базовых векторов, например, pBNX186 нацелен на IGR 88/89 (см. фиг. 4А) и pBNX197 нацелен на IGR 148/149 (см. фиг. 4Б), применяя широко доступные ферменты рестрикции и обычные методы молекулярной биологии. Для получения рекомбинантных изолятов MVA-BN, экспрессирующих нужные трансгены, КЭФ клетки затем инфицировали с помощью MVA-BN, и потом трансфицировали одной или несколькими рекомбинационными плазмидами, экспрессирующими нужный трансген или трансгены, и в том числе селекционную кассету, позволяющую проводить положительный отбор рекомбинантных вирусов. В ходе гомологичной рекомбинации, плазмидные фланкирующие последовательности рекомбинируют с гомологичными последовательностями инсерционного сайта в вирусном геноме MVA-BN. Это введет к встраиванию плазмидных последовательностей в сайт, на который нацелен базовый вектор, примененный в качестве исходного материала (например, IGR 148/149, IGR 88/89 и т. д.) в геном MVA-BN. pBNX197 нацелена на IGR 148/149 (фиг. 4Б) и была применена как изначальная плазида для конструирования окончательной рекомбинационной плазмиды pBN384 (фиг. 5Б). Плазида pBN384 экспрессирует GP-ZEBOV-Mayinga и GP-MARV-Musoke. pBNX 186 нацелена на IGR 88/89 (фиг. 4А) и была применена как изначальная плазида для конструирования окончательной рекомбинационной плазмиды pBN385 (фиг. 5Б). Плазида pBN385 экспрессирует GP-SEBOV и NP-EBOV-CdI.

Чтобы встроить трансгены GP-SEBOV, NP-EBOV-CdI, GP-ZEBOV-Mayinga, и GP-MARV-Musoke в MVA-BN, КЭФ клетки были инфицированы MVA-BN и впоследствии трансфицированы рекомбинационными плазмидами pBN384 и pBN385. После амплификации и клонирования с помощью метода бляшкообразования (десять пассажей; три из них включали клонирование с помощью метода бляшкообразования) при двойных селективных условиях (микоеноловая кислота/ксантин и гипоксантин также как и Geneticin), был получен рекомбинантный MVA-BN продукт, обозначенный как MVA-mBN226A (Interim PreMaster), содержащий гены трех гликопротеинов, один нуклеопротеин и две селекционные кассеты. Рекомбинантный MVA-mBN226A PreMaster исходный вирус был проверен на выбрасывание MVA-BN (родительский вирус; данные не показаны), на правильность последовательности вставленного гена вместе с инсерционными фланкирующими областями (с помощью ген-специфической ПЦР, применяя праймеры, специфичные для геномной MVA-BN последовательности, в которую был вставлен чужеродный ген; данные не показаны), на отсутствия микроорганизмов (тест на стерильность; данные не показаны), и на наличие и правильный размер вставок FPV (с помощью секвенирования; данные не показаны). Также был определен титр исходного вируса MVA-mBN252A PreMaster.

После дополнительной амплификации, удаление селекционной кассеты и клонирование с помощью метода бляшкообразования при не селективных условиях (двадцать пассажей, шесть из них включали клонирование с помощью метода бляшкообразования), был выделен рекомбинантный вирус MVA-mBN226B, лишенный селекционных кассет. Полное устранение селекционных кассет было подтверждено с помощью "вложенной" ПЦР (данные не показаны). В результате, экспрессия трансгена с помощью рекомбинантного MVA-mBN226B была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; данные не показаны).

Конструирование MVA-mBN254A (MVA-GP-ZEBOV)

Для GP-ZEBOV трансгена, экспрессированного из MVA-mBN254A, полноразмерная ДНК последовательность гена природного происхождения служила в качестве эталонной последовательности. GP-ZEBOV были синтезированы в Geneart AG (Регенсбург, Германия) с использованием кодонов, оптимизированных для экспрессии в организме человека, и для того, чтобы свести к минимуму или предотвратить внутренние события гомологической рекомбинации, как описано выше в "Конструирование MVA-mBN226B". Оптимизация кодонов изменила последовательность ДНК дикого типа без изменения аминокислотной последовательности. GP-ZEBOV-Mayinga экспрессировался под контролем PrS5E промотора

(SEQ ID NO:24).

PrS5E (SEQ ID NO:24) представляет собой искусственный сильный ранний и поздний промотор, разработан на основе искусственного раннего и позднего промотора (Chakrabarti et al., 1997) после которого следуют 5 ранних элементов Pr7.5 промотора из 7.5 кДа гена вируса осповакцины (SEQ ID NO:25; см. также M.A. Cochran et al., "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals", J. Virol. 54(1):30-37 (1985)). PrS5E промотор описан более подробно в патентной заявке WO 2013/189611A1.

Для встраивания чужеродных генов в геном MVA-BN, было создано несколько рекомбинационных плазмид, которые нацелены на различные области удаления и межгенные области (IGR) генома MVA-BN. Для создания рекомбинантных MVA-BN продуктов, чужеродные последовательности интереса могут быть встроены в любой из этих базовых векторов, например, pBNX197 нацелен на IGR 148/149 (см. Фиг. 4Б), применяя широко доступные ферменты рестрикции и обычные методы молекулярной биологии. Для получения рекомбинантных изолятов MVA-BN, экспрессирующих нужные трансгены, КЭФ клетки затем инфицировали с помощью MVA-BN, и потом трансфицировали одной или несколькими рекомбинационными плазмидами, экспрессирующими нужный трансген или трансгены, и в том числе селекционную кассету, позволяющую проводить положительный отбор рекомбинантных вирусов. В ходе гомологичной рекомбинации, плазмидные фланкирующие последовательности рекомбинируют с гомологичными последовательностями инсерционного сайта в вирусном геноме MVA-BN. Это введет к встраиванию целевых последовательностей в сайт, на который нацелен базовый вектор, примененный в качестве исходного материала (например, IGR 148/149), в геном MVA-BN. pBNX197 нацелена на IGR 148/149 (фиг. 4Б) и была применена как изначальная плазида для конструирования окончательной рекомбинационной плазмиды pBN436 (фиг. 5Г). Плазида pBN436 содержит GP-ZEBOV-Mayinga.

Чтобы встроить трансген GP-ZEBOV-Mayinga в MVA-BN, КЭФ клетки были инфицированы MVA-BN, и впоследствии трансфицированы рекомбинационной плазмидой pBN436 (фиг. 5Г). После амплификации и клонирования с помощью метода бляшкообразования (девять пассажей; включая три с клонированием с помощью метода бляшкообразования) при селективных условиях (микофеноловая кислота/ксантин и гипоксантин), был получен рекомбинантный MVA-BN продукт, обозначенный как MVA-mBN254A (Premaster), содержащий ген GP-ZEBOV-Mayinga и слитый ген GPT-RFP, в качестве маркера селекции (Фиг. 3В). Рекомбинантный MVA-mBN254A PreMaster исходный вирус был проверен на исключение MVA-BN (родительский вирус; данные не показаны), на правильность последовательности вставленного гена вместе с инсерционными фланкирующими областями (с помощью ген-специфической ПЦР, применяя праймеры, специфичные для геномной последовательности MVA-BN, в которую был вставлен чужеродный ген; данные не показаны), на отсутствия микроорганизмов (тест на стерильность; данные не показаны), и на наличие и правильный размер вставок (с помощью секвенирования; данные не показаны). Также был определен титр исходного вируса MVA-mBN254A PreMaster. В результате, экспрессия трансгена рекомбинантным MVA-mBN254A была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; данные не показаны).

Другие конструкции были созданы соответствующим способом. В частности, MVA-mBN255 экспрессировал NP- EBOV-CdI (SEQ ID NO:28) под контролем PrS промотора, встроенного в IGR 88/99, VP40 ZEBOV (SEQ ID NO:33) под контролем PrS промотора в IGR 136/137 и GP-ZEBOV (SEQ ID NO:19) под контролем PrS5E промотора в IGR 148/149 (фиг. 13).

Конструирование FPV-mBN368A (FPV-GP-ZEBOV) и FPV-mBN391 (FPV-multi-filo).

Для GP-ZEBOV трансгена, экспрессированного из FPV-mBN368A, полноразмерная ДНК последовательность гена природного происхождения служила в качестве эталонной последовательности. Ген GP-ZEBOV были синтезирована в Geneart AG (Регенсбург, Германия) с использованием кодонов, оптимизированных для экспрессии в организме человека, как описано выше в "Конструирование MVA-mBN226B". Оптимизация кодонов изменила последовательность ДНК дикого типа без изменения аминокислотной последовательности. GP-ZEBOV-Mayinga экспрессировался под контролем промотора FPV-40K (SEQ ID NO:26). FPV-40K промотор представляет собой последовательность промотора FPV, кодирующей последовательности 40K белка в FPV.

Для встраивания чужеродных генов в геном FPV, было создано несколько рекомбинационных плазмид, которые нацелены на различные сайты встраивания генома FPV. Для создания рекомбинантных FPV продуктов, чужеродные последовательности интереса могут быть вставлены в любой из этих базовых векторов, например, pBNX221 нацелен на инсерционный сайт BamHI J (см. фиг. 4Г), применяя широко доступные ферменты рестрикции и обычные методы молекулярной биологии. Для получения рекомбинантных FPV изолятов, экспрессирующих нужные трансгены, КЭФ клетки затем инфицировали FPV, и потом трансфицировали одной или несколькими рекомбинационными плазмидами, экспрессирующими нужный трансген или трансгены, и в том числе селекционные кассеты, позволяющие проводить положительный отбор рекомбинантных вирусов. В ходе гомологичной рекомбинации, плазмидные фланкирующие последовательности рекомбинируют с гомологичными последовательностями инсерционного сайта в FPV вирусном геноме. Это введет к встраиванию целевых последовательностей в сайт, на который нацелен базовый вектор, примененный в качестве исходного материала (например, инсерцион-

ный сайт BamHI J), в геноме FPV. pBNX221 нацелена на инсерционный сайт BamHI J (фиг. 4Г) и была применена как изначальная плазмида для конструирования окончательной рекомбинационной плазмиды pBN555 (фиг. 5Д). Плазмида pBN555 содержит GP-ZEBOV-Mayinga под контролем FPV-40K промотора.

Чтобы встроить трансген GP-ZEBOV-Mayinga, в FPV, КЭФ клетки были инфицированы FPV, и впоследствии трансфицированы рекомбинационной плазмидой pBN555 (фиг. 5Д). После амплификации и клонирования с помощью метода бляшкообразования (тринадцать пассажей; включая четыре с клонированием с помощью метода бляшкообразования) при селективных условиях (микофеноловая кислота/ксантин и гипоксантин), был получен рекомбинантный MVA-BN продукт, обозначенный как FPV-mBN368A (Premaster), содержащий ген GP-ZEBOV-Mayinga и слитый ген GPT-RFP, в качестве маркера селекции (фиг. 3Г). Рекомбинантный FPV-mBN368A PreMaster исходный вирус был проверен на выбрашивание FPV (родительский вирус; данные не показаны), на правильность последовательности вставленного гена вместе с инсерционными фланкирующими областями (с помощью ген-специфической ПЦР, применяя праймеры, специфичные для геномной FPV последовательности, в которую был вставлен чужеродный ген; данные не показаны), на отсутствия микроорганизмов (тест на стерильность; данные не показаны), и на наличие и правильный размер вставок FPV (с помощью секвенирования; данные не показаны). Также был определен титр исходного вируса FPV-mBN368A PreMaster. В результате, экспрессия трансгена рекомбинантным FPV-mBN368A была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; данные не показаны).

Дополнительно FPV конструкции были созданы, применяя FP14 (IGR 60/61) и BamHI J области для встраивания согласно способу, как описано выше. FPV-mBN391 экспрессировались GP-ZEBOV (SEQ ID NO:19 и 20) под контролем FPV-40K промотора (SEQ ID NO:26), GP-MARV-Musoke (SEQ ID NO:5 и 6) под контролем PrS промотора (SEQ ID NO:23), обо в FP14 сайте, и GP-MARV-Angola (SEQ ID NO:36 и 37) под контролем Pr13.5 длинного промотора (SEQ ID NO:35), GP-SEBOV (SEQ ID NO:30 и 31) под контролем FPV-40K промотора и NP-EBOV-Cdi (SEQ ID NO:28 и 29) под контролем PrLE1 промотора (SEQ ID NO:27), все три были вставлены в BamHI J область в порядке упоминания.

Пример 2. MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B) в низших приматах.

Иммуногенность и защитная эффективность MVA-BN-Filo (MVA-mBN226B) была проанализирована в модели заражения яванских макаков вирусами Эбола и Марбург. Обезьяны разместили и кормили в соответствии с соответствующими институциональными рекомендациями по уходу и кормлению лабораторных животных.

Дизайн эксперимента приводится в табл.1 ниже.

Таблица 1. Протокол вакцинации для MVAB-N-Filo в яванских макаков

Группа	Размер Группы	Тестирование /Пункты протокола введения				Вирус для заражения Введение	
		Вакцинация	Доза на каждое введение	Путь введения	Расписание (Дни)	Вирус	Расписание (День)
1	1	Контроль носителя (ТСБ)	–	подкожно	0 и 28	EBOV	42
2	1	Контроль носителя (ТСБ)	–	подкожно	0 и 28	MARV	42
3	3	MVA-BN [®] -filo	5×10 ⁸ ИДКТ ₅₀	подкожно	0 и 28	EBOV	42
4	3	MVA-BN [®] -filo	5×10 ⁸ ИДКТ ₅₀	подкожно	0 и 28	MARV	42

Внутримышечное введение (1,000 pfu) или штамма Zaire EBOV или штамма Musoke MARV; выжившие животные были умерщвлены в День 63. Объем дозы составлял 0,5 мл для группы контроля и группы вакцинации, все прививки были выполнены путем подкожных инъекций. Первый день вакцинации обозначен как День 0. Все животные получили дозу возбудителя от 1,000 pfu ZEBOV (Группы 1 и 3) или MARV-Musoke (Группы 2 и 4) с помощью внутримышечной инъекции в День 42. Все выжившие животные были умерщвлены в День 63.

GP-специфические антитела были измерены методом иммуноферментного анализа. Как и ожидалось, невакцинированные контрольные животные, зараженные MARV-Musoke, не имели GP-MARV-специфических антител при проверке в любое время до заражения (т.е. в День 0, в День 28, и День 36 (данные не показаны) и поддались болезни. В тоже время, два из трех животных, вакцинированных MVA-BN-Filo (номера животных 30766 и 30768) имели низкий GP-MARV титр антител через 28 дней после первой прививки (после первой прививки; см. также фиг. 6), и каждое из трех вакцинированных животных продемонстрировало явный усиленный иммунный ответ через восемь дней после второй при-

вивки (после бустерной вакцинации; см. фиг. 6). Все трое животных пережили в противном случае летальное внутримышечное заражение MARV-Musoke.

Аналогичным образом, невакцинированные контрольные животные, зараженные ZEBOV, были отрицательными по GP-ZEBOV-специфическим антителам, во всех временных точках тестирования (данные не показаны). Контрольное животное, также как и вакцинированные животные, подверглось болезни, после заражения ZEBOV с помощью внутримышечной инъекции. Удивительно, но все трое вакцинированных животных, продуцировали GP-ZEBOV-специфические антитела перед заражением, на уровнях, больших по величине, чем те, которые были измерены в гипериммунной сыворотке, продуцированных в низших приматах при вакцинации ZEBOV-GP. Были выполнены полные вскрытия, ткань размещали в 10% нейтральном забуференном формалине в момент смерти. Срезы тканей были обработаны с помощью стандартных методов, срезы были выполнены толщиной в 5 мкм, и окрашены гематоксилином и эозином для гистологического исследования. Результаты обобщены в табл.2 ниже.

Таблица 2. Гистологическая оценка вакцинированных и контрольных животных

Животное №	30763	30766	30765	30768	30764	30770	30769	30767
Вскрытие	N11-05	N11-04	N11-06	N11-10	N11-07	N11-08	N11-09	N11-03
Заражение	Мар-бург	Мар-бург	Мар-бург	Мар-бург	Эбола	Эбола	Эбола	Эбола
Экспериментальная группа	Контроль	Вакцина	Вакцина	Вакцина	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль
Выживаемость	9 д	21 д	21 д	21 д	5 д (У)	7 д (У)	6 д (У)	6 д (У)
Печень:								
множественные поражения печени								
некроз	++	-	-	-	+	++	++	-
васкулит	+	+++*	-	+++*	-	-	-	-
Легкие:								
внутриальвеолярный отек	+	-	-	-	+	+	+	-
септальный отек	+	-	-	-	+	+	+	-
кровавоизлияние	+	-	-	-	+	+	-	-
<u>Интерстициальный пневмонит</u>	-	-	-	-	-	+++	++	-
Селезенка:								
гиперплазия	-	++	+++	+++	-	-	-	-
истощение лимфоидной ткани	++	-	-	-	++	+++	+++	++
фибриновые отложения в красной пульпе селезенки	+++	-	-	-	++	+++	+	++
селезеночный васкулит	+++	-	-	-	++	++	+	++
Паховые лимфатические узлы:								
инфильтрация макрофагов	++	-	++	-	+	+	+	+++
истощение лимфоидной ткани	+++	-	-	-	+++	+++	++	-
Подмышечные лимфатические узлы:								
инфильтрация макрофагов	-	-	-	-	-	-	-	-
истощение лимфоидной ткани	+	-	-	-	++	++	++	+
Брыжеечные лимфатические узлы:								
инфильтрация макрофагов	-	-	-	-	-	-	-	-
истощение лимфоидной ткани	++	-	-	-	++	++	++	+
Надпочечник:								
некроз	-	-	-	-	+++	++	-	-

* васкулит у животных 30766 и 30768, по-видимому, уже был в наличии. У- умерщвленные; СС- спонтанная смерть.

Анализ подтвердил типичные симптомы геморрагической лихорадки в MARV-Musoke-зараженных, невакцинированных контрольных животных, а также во всех ZEBOV-зараженных животных, в то время как вакцинированные животные, зараженные MARV-Musoke, продемонстрировали несколько гистоло-

гических изменений, за исключением селезеночной гиперплазии, согласующейся с иммунным ответом после заражения и В-клеточной гиперплазией.

Результаты эксперимента представлены на фиг. 7. фиг. 7А иллюстрирует, что вакцинация с помощью MVA-BN-Filo защищала 100% животных от заражения MARV-Musoke. Фиг. 7Б иллюстрирует клинические показатели после заражения; вакцинированные животные, зараженные MARV-Musoke, не показали никаких симптомов или гистологических изменений, связанных с геморрагической лихорадкой, и не содержали вирус в печени, селезенке, надпочечниках, лимфатических узлах или легких.

Пример 3. MVA-BN-Filo в низших приматах.

В этом эксперименте тестировали MVA-BN-Filo в низших приматах по аналогичном протоколу исследования, как описано в примере 2, но заражение проводили другим штаммом вируса Марбург, т.е. Marburg-Angola вместо Marburg-Musoke в примере 2.

Таблица 3. Дизайн исследования и результаты для MVA-BN-Filo в низших приматах

Группа	N	Испытание/Протокол контрольного введения			Заражение	Выживание
		Вакцинация	Доза	Расписание		
1	2	MVA-BN® Filo	5×10^8 ИДКТ ₅₀	0, 28	Marburg Angola День 56	2/2
2	3	MVA-BN® MARV-IL15sushi	1×10^8 ИДКТ ₅₀			2/3
3	3	MVA-BN®MARV-CD40L	1×10^8 ИДКТ ₅₀			3/3
4	3	MVA-BN® MARV-TRICOM	1×10^8 ИДКТ ₅₀			2/3
5	1	TCB	n/a			0/1

Внутримышечное заражение (1,000 pfu) штаммом MARV Angola; выжившие животные были умерщвлены в День 70.

Табл. 3 показывает, что MVA-BN-Filo полностью защищает низших приматов от штамма Angola вируса Марбурга. В отличие от этого, невакцинированные животные в группе 5 подверглись заражению. Это также показывает, что защитная эффективность зависит от дозы, поскольку доза в 5 раз меньше, применяя MVA-BN-MARV, кодирующий также GP вируса Марбург, лишь отчасти является защитной, до тех пор, пока он экспрессирует CD40L как ко-стимулирующую молекулу. Все привитые кандидаты продуцируют специфические антитела для вектора MVA (Vaccinia специфические антитела), а также антитела, специфичные для MARV GP вставки, как показано в табл.4.

Таблица 4. Антитела, индуцированные MVA-BN-Filo в низших приматах

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

Пример 4. Гетерологичное примирование/бустирование.

В этом эксперименте протестировали комбинацию рекомбинантного MVA и рекомбинантного FPV в примировующих/бустирующих иммунизациях.

H-2K^b B6CBA F1 мыши (Janvier Labs, Франция) иммунизировали подкожно (подкожно) с помощью 5×10^7 ИДКТ₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN254A, фиг. 3B) или FPV-ZEBOV-GP (FPV; FPV-mBN368A, фиг. 3Г). Доза вируса был введена в обе боковые поверхности живота в общем объеме 100 мкл/сторона.

Для обнаружения ZEBOV-GP-специфических IgG, 96-луночные планшеты (Корнинг, штат Массачусетс, США) были покрыты ZEBOV GP антигеном (IBT Bioservices, Мэриленд, США) при 4°C в течение ночи. Дубликаты двукратных разведений сыворотки были добавлены в вымытые и блокированные планшеты, было применено IgG-HRP антимышь-овца антитело (AbD Serotec, Великобритания) в качестве антитела обнаружения. Субстрат ТМВ был добавлен на 30 минут при комнатной температуре, и реакцию останавливали добавлением 1М раствора H₂SO₄. Абсорбцию измеряли при 450 нм. Моноклональные антитела мышиные 13F6 был использован в качестве стандарта для расчета концентрации ZEBOV-GP IgG в сыворотке крови.

Лимфоциты мыши были свежо выделенными из селезенки с помощью осторожного измельчения и продавливания ткани через 70 мкм клеточное сыто (BD Bioscience, Калифорния, США). После лизиса эритроцитов, клетки инкубировали с 5 мкг/мл ZEBOV-GP577-584 пептида (TELRTFSI) (GenScript, Нью-Джерси, США) в течение 6 часов при 37°C в полном RPMI в присутствии 10 мкг/мл брэфелдина А и

CD107a-FITC. Для распознавания живого/мертвого, клетки окрашивали с помощью Zombie Aqua™ Fixable Viability kit (BioLegend, Калифорния, США). Внутриклеточное окрашивание ИФН- γ и ФНО- α проводили после поверхностного окрашивания CD4-BV605, CD8 α -BV421 (BioLegend, Калифорния, США) и CD44-APC-eFluor780 (eBioscience, Калифорния, США) и фиксацию/пермеабиллизацию согласно инструкций производителя (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences). Все клетки были получены с помощью цифровой проточной цитометрии (LSR II, BD Biosciences, Калифорния, США) и данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, Орегон, США).

Четыре возможные комбинации рекомбинантных MVA и FPV примиряющих/усиливающих иммунный ответ иммунизации были протестированы в Н-2К^{k+} СВAB6 F1 мышах, потому что сильный CD8 Т-клеточный эпитоп из штамма гликопротеина (GP) Zaire вируса Эбола (ZEBOV) был описан для этого гаплотипа МНС класса I, а именно GP₅₇₇₋₅₈₄ (TELRTFSI) (Rao et al., Vaccine 17 (23-24): 2991-8 (1999)). Концентрацию в сыворотке ZEBOV-GP-специфических IgG анализировали в День 21 и в День 41 после подкожной иммунизации в День 0 и 21. В то время как в День 21 все MVA-иммунизированные мыши имели надежные титра IgG, только 20% от FPV-иммунизированных мышей имели сероконверсию. После второй иммунизации, все животные были серопозитивными по ZEBOV-GP-специфическим IgG. Самые низкие титры наблюдались после гомологичной иммунизации с помощью FPV. Между животными, иммунизированными дважды с помощью MVA, и теми, что были примированы с помощью FPV и повторно иммунизированы с помощью MVA, не было выявлено никакой разницы в концентрации GP-специфических IgG в День 41. Мыши, примированные с помощью MVA и повторно иммунизированные FPV, однако, имели немного более высокие титры, чем все остальные группы в День 41 (фиг. 8А).

Интересно, что такая же комбинация, которая приводила к сильнейшему иммунному ответу, также вызвала сильнейший CD8 Т-клеточный ответ. Опять же, гомологичная иммунизация с помощью FPV приводила к слабому CTL ответу, за которым следовали MVA-MVA и FPV-MVA иммунизации. Примирование с помощью MVA, после которого следовала повторная иммунизация с помощью FPV, индуцировало ~ в 5 раз больше цитотоксических CD8 Т-клеток, чем при гомологичной комбинации 2× MVA (фиг. 8Б).

Взятые вместе, эти данные предполагают, что гетерологичная иммунизация с помощью первого MVA и второго FPV, вызывает сильнейший ZEBOV-GP-специфический гуморальный ответ, а также самый сильный CTL ответ, что продемонстрировано присутствием высокофункциональных CD8 Т-клеток.

Пример 5. Усиленный ZEBOV-GP специфический CD8 Т-клеточный ответ.

Н-2К^{k+} СВА мыши были иммунизированы подкожно с помощью 5×10^7 ИДКТ₅₀ MVA или FPV в День 0 и День 21. Мыши (5 в каждой группе) были принесены в жертву в День 42 для Т-клеточного анализа путем внутриклеточного окрашивания цитокинов спленоцитов. Были применены следующие примиряющие/усиливающие иммунный ответ режимы: 1: MVA-ZEBOV-GP (mBN254)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 2: MVA-multi-filo (MVA-mBN226)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 3: MVA-ZEBOV-GP-VP40 (mBN255)/FPV-ZEBOV-GP (mBN368). Данные представлены на фиг. 9.

Реакции CD8 Т-клеток селезенки были проанализированы на День 42 после стандартных 6 ч *in vitro* повторной стимуляции с помощью 5 мкг/мл ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ пептида (TELRTFSI) в присутствии 10 мкг/мл берефелдина А и анти-CD107a-FITC. Клетки были поверхностно окрашены с помощью анти-CD4-BV605, анти-CD8-BV421, CD44-APC-eFluor780 и внутриклеточно окрашены с помощью анти-ИФН- γ -PECy7 и анти-TNF- α -PerCP-eFluor710. Распознавание живой/мертвой было выполнено с помощью LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit согласно инструкции производителя (Life Technologies). Гистограммы показывают общее количество CD107a⁺, ИФН- γ ⁺ and TNF- α ⁺ CD8 Т клеток. Показано среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего по 5 мышей/группа. CD8 Т-клеточный ответ против ZEBOV-GP-производного пептида TELFRTSI был усилен примерно двукратно, когда MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 был применен как примиряющая конструкция в MVA-FPV гетерологичном примировании-бустировании режиме по сравнению с MVA-ZEBOV-GP (mBN254) или MVA-multi-filo (MVA-mBN226) в качестве примиряющих конструкций (фиг. 9).

Пример 6. Усиленная защита NHP против ZEBOV после вакцинации с помощью MVA-GP-VP40.

Яванские макаки (*Macaca fascicularis*) были вакцинированы дважды (в День 0 и 28) подкожно дозой 5×10^8 ИДКТ₅₀ или MVA-BN-ZEBOV/GP (n=3), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (n=3), или получили Три-солевой буферный раствор (ТБС) в качестве отрицательного контроля (плацебо группа, n=2). До вакцинации и за неделю до контрольного заражения (Дни 7, 14, 21, 28, 35 и 40) была собрана сыворотка крови для анализа с помощью иммуоферментного анализа специфического для гликопротеина (GP) Ebola virus Zaire и специфического для спинно-мозгового MVA. Через четыре недели после повторной вакцинации, животные были заражены Ebola virus Zaire (штамм Kikwit), с помощью внутримышечного введения около 1000 pfu.

Таблица 5. Дизайн исследования

Группа	Вакцинация			Заражения		Выживание
	Вакцина	Доза	Расписание (Курс)	Вирус	Расписание	
1	MVA-BN-ZEBOV/GP	5×10^8 ИДКТ ₅₀	День 0+28 (подкожно)	ZEBOV Kikwit Примерно 1000 pfu внутри- мышечно	4 недели после последней вакцина- ции	0/3
2	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 ИДКТ ₅₀	День 0+28 (подкожно)			2/3
3	ТБС-контроль	n/a	День 0+28 (подкожно)			0/2

Zaire Ebola virus (ZEBOV)-специфический иммуноферментный анализ.

Был выполнен иммуноферментный анализ для определения ZEBOV/GP-специфических антител, иммобилизованных с помощью рекомбинантного ZEBOV/GP, и детекция выполнялась с помощью пероксидазы хрена (ПХ), конъюгированной с антителами против NHP IgG. Количество связанных HRP-меченых антител было посчитано после субстратной реакции, в качестве значения оптической плотности (ОП) при 450 нм. Концентрация антител была рассчитана согласно регрессионному анализу с четырьмя параметрами, и на основе стандартной кривой с применением моноклональных антител мыши.

Результаты ИФА представлены на фиг. 10. Все животные вакцинированные MVA-BN-ZEBOV/GP или MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 конструктами имели обнаруживаемые спинномозговые- и ZEBOV-специфические антитела, уже после примирующей вакцинации, и гуморальный ответ были повышены второй вакцинацией.

В втором исследовании яванские макаки (*Macaca fascicularis*) были вакцинированы трижды (в День 0, 28 и 56) подкожно дозой 5×10^8 ИДКТ₅₀ или MV-ABN-multi-filo (MVA-mBN226, n=2), MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255, n=2), или получили Трис-солевой буферный раствор (ТБС) в качестве отрицательного контроля (плацебо группа, n=2). До вакцинации и за неделю до контрольного заражения (Дни 0, 27, 41, 55, 35 и 67) была собрана сыворотка крови для анализа с помощью Ebola virus Zaire гликопротеин (GP)-специфического нейтрализующего анализа (фиг. 11). Через четыре недели после последней вакцинации, животные были заражены вирусом Ebola virus Zaire (штамм Kikwit), с помощью внутримышечного введения около 100 pfu.

Таблица 6. Дизайн исследования

Группа	Вакцинация			Вирус	Заражения Расписание	Выживание
	Вакцина	Доза	Расписание			
1	Отрицательный контроль	n/a	День 0+56	ZEBOV Kikwit примерно	4 недели после последней вакцинации	0/2
2	MVA-BN-multi-filo	5×10^8 ИДКТ ₅₀	День 0+28+56	100 pfu внутримышечно		0/2
3	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 ИДКТ ₅₀	День 0+28+56			2/2

Вакцинация с помощью MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 привела к выработке нейтрализующих антител, выявляемых сразу же после примирующей вакцинации, в то время как MVA-BN-multi-filo не вызывал выработки нейтрализующих антител на обнаруживаемом уровне после примирования в День 27 (Фиг. 11). Животные, вакцинированные MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40, имели более высокие титры нейтрализующих антител, чем MVA-BN-multi-filo вакцинированные животные, во всех временных точках анализа. После ZEBOV заражения MVA-BN-multi-filo поддались заражению к 7 дню после контрольного заражения, тогда как MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 вакцинированные животные выжили без симптомов или временных эпизодов лихорадки.

Пример 7. Формирование ВПЧ и экспрессия белков VP40 и GP.

Клетки линии HeLa были инфицированы указанными вирусами при MOI равным 10. После двух дней инфекции, супернатанты собирали, и затем ВПЧ в очищенных супернатантах (CH) были осаждены через 20% слой сахарозы путем ультрацентрифугирования (УЦ-CH). Клеточные лизаты были приготовлены путем прямого лизиса клеток в буфере $1 \times$ Laemmli. Клеточные лизаты разбавляли 1:5 до разделения с помощью SDS-PAGE для иммуноблоттинга. УЦ-CH не разбавляли перед SDS-PAGE. ZEBOV-GP было обнаружено с помощью моноклонального антитела мыши (клон 6D8) из USAMRIID, и ZEBOV-VP40 было обнаружено с помощью очищенного поликлонального антитела кролика из IBT Bioservices.

Экспрессия GP и VP40 была подтверждена в свежих препаратах с помощью иммуноблоттинга. Оба белка присутствовали в клеточных лизатах, а также были обогащены при УЦ-CH (фиг. 12B). Известно,

что экспрессии матриксного белка VP40 достаточно для формирования ВПЧ, и не поступало сведений про прямое взаимодействия белка VP40 и GP белка. Чтобы показать, что GP действительно включен в ВПЧ вместе с VP40, GP был иммунопреципитирован из СН инфицированных клеток. Для этого, клетки линии HeLa были заражены MVA-ZEBOV/GP-VP40, контрольные клетки - MVA-ZEBOV/GP и BAC-полученные MVA wt. BAC-derived MVA wt были описаны ранее в Meisinger-Henschel et al (Meisinger-Henschel et al. (2010), J Virol. 84 (19) :9907-9919). СН из зараженных клеток подвергали иммунопреципитации (ИП) с помощью анти-GP-специфического антитела. СН аликвоты были обработаны 1% Triton X-100 (TX-100) в течение 30 минут до иммунопреципитации, которая, как было продемонстрировано ранее, разрушает большинство зрелых упакованных ВПЧ вируса лейкоза мышей (Davidoff et al. (2012), Virology 433 (2):401-409).

Затем ИП-комплексы были проанализированы с помощью иммуноблотинга на наличие GP и ко-осажденного VP40. Для иммунопреципитации (ИП), очищенные СН инкубировали с анти-ZEBOV-GP (клон 6D8, USAMRIID) антителами вместе с Protein G-Agarose (10 мкл) при 4°C в течение ночи. Иммуноблоты иммунопреципитатов затем инкубировали с антителами к ZEBOV-GP (моноклональное антитело 6D8) и ZEBOV-VP40 (из IBT). GP белок был эффективно иммунопреципитирован из супернатанта клеток, экспрессирующих только GP (фиг. 12Г, верхняя панель), и экспрессия не зависела от наличия VP40. Важно, VP40 иммунопреципитировалось вместе с GP из супернатантов MVA-ZEBOV/GP-VP40 зараженных клеток лишь в отсутствии TX-100 (фиг. 12Г, нижняя панель, линия 2), указывая на то, что GP действительно были включены в вирусоподобные частицы. Поскольку предполагается, что TX-100 разрушает ВПЧ и поскольку не существует прямого GP-VP40 взаимодействия, VP40 не может быть ко-преципитировано в TX-100-обработанных образцах (фиг. 12Г, нижняя панель, линия 4). Таким образом, было показано, что действительно, ВПЧ представляющие GP, были продуцированы после заражения рекомбинантными MVA.

Пример 8. Формирование ВПЧ в 293T/17.

Возможно получить более высокие ВПЧ концентрации после заражения клеток, 293T/17 клетки для приготовления свежих ВПЧ. Белковое содержимое препаратов было проанализировано на наличие GP и VP40 с помощью Вестерн-Блотинга.

293T/17 клетки в T175 культуральных чашках были заражены указанными вирусами при MOI равным 10. Супернатанты собирали 24 часа после заражения и, или непосредственно смешивали с трехкратным буфером для нанесения (сырой СН), или концентрировали через 20% слой сахарозы (УЦ-приг.). Клеточные лизаты (КЛ) были подготовлены в однократном буфере для нанесения. Белки были разделены по размеру с помощью денатурирующего SDS-PAGE. Иммуноблоты инкубировали с анти-GP антителом (клон 6D8, 1:2500, USAMRIID) или анти-VP40 антителом (поликлональное, 1:1000, IBT) и были обработаны применяя хемилюминисцентный субстрат.

Экспрессию гликопротеина EBOV (GP) было легко обнаружить после заражения клеток MVA-ZEBOV/GP и MVA-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-filo-VLP), VP40 после заражения MV-Afilo-VLP, оба в клеточном лизате (КЛ) и супернатанте (СН) из-за Р-зараженных клеток. Неожиданно, оказалось что MVA-ZEBOV/G-ные клетки экспрессируют больше GP по сравнению с клетками, зараженными MVA-filo-VLP, в то время как при заражении MVA-filo-VLP было найдено больше GP в СН. Это, возможно, отражает тот факт, что с MVA-filo-VLP, ко-экспрессия GP и VP40 усиливает высвобождение GP

(в форме ВПЧ) из зараженных клеток. Оба, GP и VP40 белки были представлены в УЦ-прегот., указывая на то, что GP и VP40 были собраны УЦ. Некоторые GP и также VP40 по-прежнему присутствовали в СН после УЦ, хотя и в меньшем количестве по сравнению с неочищенным СН, что особенно актуально для VP40. Таким образом, VP40 - главным образом присутствует в форме ВПЧ, вместе с GP - в значительной мере исчерпан из СН, в то время как части GP пула (возможно, в виде плеоморфных частиц) остаются в СН после УЦ.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) и иммуно-электронно-микроскопический анализ ВПЧ из 293T/17 клеток показали, что MVA-filo-ВПЧ продуцированные соответствующим MVA рекомбинантом, были плотно декорированы GP, GP шипами выстилающими всю поверхность filo-ВПЧ. Кроме того, препараты из клеток, инфицированных MVA-wt или MVA-ZEBOV/GP были проанализированы с помощью иммуно-ЭМ; вирусоподобные частицы не были обнаружены в этих пробах.

Пример 9. Иммуногенность гетерологичной примиряющей-бустирующей иммунизации в NHP.

Четыре яванских макаки были привиты (подкожно) в День 0 и 28. Два животных получили в качестве примиряющей дозы 5×10^8 ИДКТ₅₀ MVA-mBN226 в День 0 и в качестве усиливающей иммунный ответ дозы 1×10^9 ИДКТ₅₀ FPV-mBN368 в День 28. Одно животное получило в качестве примиряющей дозы 1×10^9 ИДКТ₅₀ FPV-mBN368 в День 0 и в качестве усиливающей иммунный ответ дозы 5×10^8 ИДКТ₅₀ MVA-mBN226. Одно контрольное животное получило только ТБС. В День 0, 7, 28, 35 и 49 были изолированы мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). Кровь была собрана в День 0, 28 и 49 для гематологии, клинической химии, параметров коагуляции, изоляции МКПК или сыворотки для анализа Т-клеток и гуморального ответа, соответственно и анализа вирусной нагрузки. Образцы сыворотки были проанализированы на Эбола-специфические гуморальные реакции с помощью ИФА и FRNT. GP- и

Vaccinia- специфические Т-клетки были проанализированы с помощью *in vitro* повторной стимуляцией МКПК с помощью ZEBOV/GP библиотеки пептидов с Vaccinia Wyeth, после чего следовало обнаружение ИФН- γ секретирующих клеток с помощью ELISPOT. Все животные были заражены внутримышечно (в/м) (100 pfu) EBOV Kikwit-9510621 в День 56. Все трое животных, которые получил гетерологичную примиряющую усиливающей иммунный ответ инъекцию MVA и FPV, выжили. Полная сероконверсия уже была получена после примирования, которая была дополнительно усовершенствована путем повторной иммунизации.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO:1 [последовательность ДНК, кодирующая GP-SEBOV-Maleo (номер доступа ГенБанка U23069.1)]

SEQ ID NO:2 [аминокислотная последовательность GP-SEBOV-Maleo (номер доступа ГенБанка U23069.1)]

SEQ ID NO:3 [последовательность ДНК, кодирующая NP-SEBOV-Boniface (Номер Доступа ГенБанка AF173836.1)]

SEQ ID NO:4 [аминокислотная последовательность NP-SEBOV-Boniface (номер доступа ГенБанка AF173836)]

SEQ ID NO:5 [кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая GP-MARV-Musoke (номер доступа ГенБанка ABA87127.1 для белковой последовательности)]

SEQ ID NO:6 [аминокислотная последовательность GP-MARV-Musoke (номер доступа ГенБанка ABA87127.1)]

SEQ ID NO:7 [последовательность ДНК, кодирующая TTC]

SEQ ID NO:8 [аминокислотная последовательность TTC]

SEQ ID NO:9 [последовательность ДНК, кодирующая hCD40L]

SEQ ID NO:10 [аминокислотная последовательность hCD40L]

SEQ ID NO:11 [последовательность ДНК, кодирующая hIL15R-Sushi]

SEQ ID NO:12 [аминокислотная последовательность hIL15R-Sushi]

SEQ ID NO:13 [последовательность ДНК, кодирующая человеческий LFA-3/CD58 (номер доступа EMBL-CDS CAA75083.1)]

SEQ ID NO:14 [аминокислотная последовательность человеческого LFA-3/CD58 (номер доступа UniProtKB/SwissProt P19256)]

SEQ ID NO:15 [последовательность ДНК, кодирующая человеческий ICAM-1/CD54 (номер доступа ГенБанка BT006854)]

SEQ ID NO:16 [аминокислотная последовательность человеческого ICAM-1/CD54 (номер доступа UniProtKB/SwissProt P05362)]

SEQ ID NO:17 [последовательность ДНК, кодирующая человеческий B7.1/CD80 (номер доступа EMBL-CDS AAA58390.1)]

SEQ ID NO:18 [аминокислотная последовательность человеческого B7.1/CD80 (номер доступа UniProtKB/SwissProt P33681)]

SEQ ID NO:19 [кодон-оптимизированная ДНК, кодирующая GP-ZEBOV-Mayinga (номер доступа ГенБанка ABX75367.1)]

SEQ ID NO:20 [аминокислотная последовательность GP-ZEBOV-Mayinga (номер доступа ГенБанка ABX75367.1)]

SEQ ID NO:21 [последовательность ДНК, кодирующая якорь W B5R]

SEQ ID NO:22 [аминокислотная последовательность якоря W B5R]

SEQ ID NO:23 [последовательность ДНК промотора PrS]

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

SEQ ID NO:25 [последовательность ДНК промотора Pr7.5]

SEQ ID NO:26 [последовательность ДНК FPV-40K промотора FPV]

SEQ ID NO:27 [последовательность ДНК промотора PrLE1-1x (ATI)+5x (Pr7.5e)]

SEQ ID NO:28 [кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая NP-EBOV-Cdi (номер доступа ГенБанка ACI28629.1)]

SEQ ID NO:29 [аминокислотная последовательность NP-EBOV-Cdi (номер доступа ГенБанка ACI28629.1)]

SEQ ID NO:30 [кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая GP-SEBOV-Gulu (номер доступа ГенБанка AAU438 87.1)]

SEQ ID NO:31 [аминокислотная последовательность GP-SEBOV-Gulu (номер доступа ГенБанка AAU43887.1)]

SEQ ID NO:32 [последовательность ДНК промотора PrLE1-1x (ATI)+4x (Pr7.5e)]

SEQ ID NO:33 [кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая последовательность VP40-ZEBOV-Mayinga]

SEQ ID NO:34 [аминокислотная последовательность последовательность VP40-ZEBOV-Mayinga]

SEQ ID NO:35 [последовательность промотора Pr13.5]

SEQ ID NO:36 [кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая GP-MARV-Angola]

SEQ ID NO:37 [аминокислотная последовательность GP-MARV-Angola].

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение рекомбинантного вектора на основе модифицированного вируса осповакцины (MVA), содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую гликопротеин оболочки (GP) вируса Марбург (MARV), причем рекомбинантный вектор MVA дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту белков вируса Эбола (EBOV), и причем антигенная детерминанта белков EBOV представляет собой гликопротеин оболочки (GP) Zaire Ebola virus (ZEBOV), гликопротеин оболочки (GP) Sudan Ebola virus (SEBOV) и нуклеопротеин (NP) Cote d'Ivoire Ebola virus (EBOV-CdI), для лечения и/или профилактики вызванного MARV заболевания.

2. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором гликопротеин оболочки MARV является полноразмерным гликопротеином MARV-Musoke.

3. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.2, в котором первая нуклеиновая кислота кодирует иммуногенный белок, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

4. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.3, в котором первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5.

5. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором рекомбинантный вектор MVA содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуногенный белок, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 37.

6. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором рекомбинантный вектор MVA содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуногенный белок, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

7. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.6, в котором указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

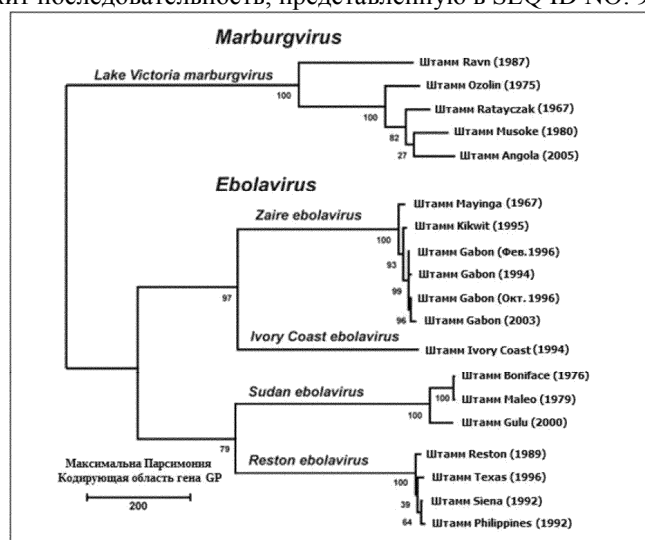
8. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором применение обеспечивает защитный иммунитет или защитный иммунный ответ у субъекта.

9. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором рекомбинантный вектор MVA содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательности, указанные в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31.

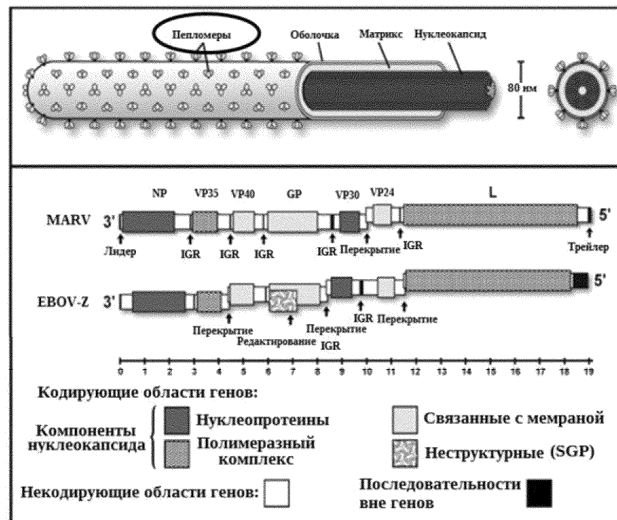
10. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.1, в котором рекомбинантный вектор MVA дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CD40L.

11. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.10, в котором CD40L содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

12. Применение рекомбинантного вектора MVA по п.11, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая CD40L, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

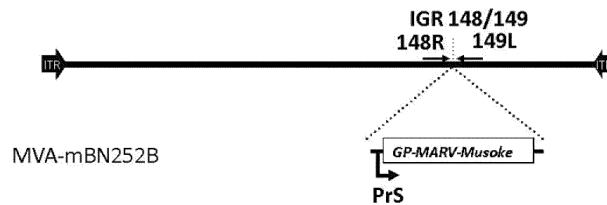


Фиг. 1

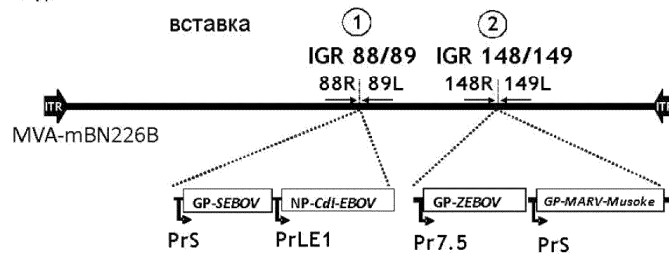


Займствованно из Fields ed.: Virology

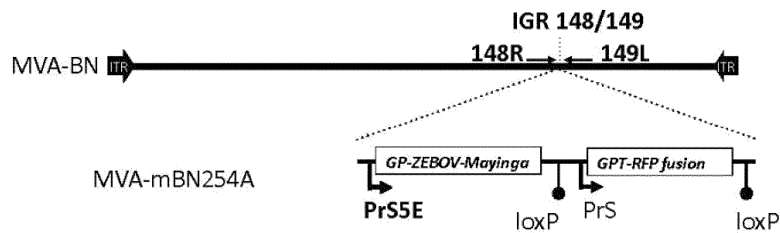
Фиг. 2



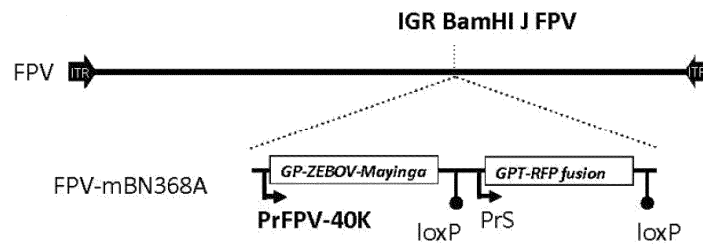
Фигура 3Б



Фиг. 3А

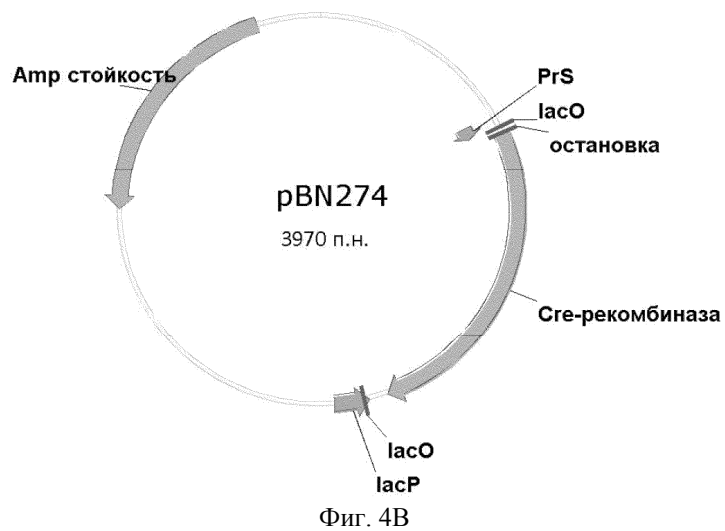
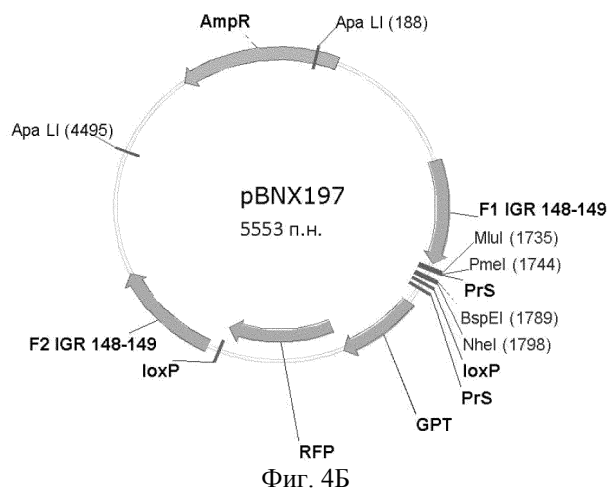
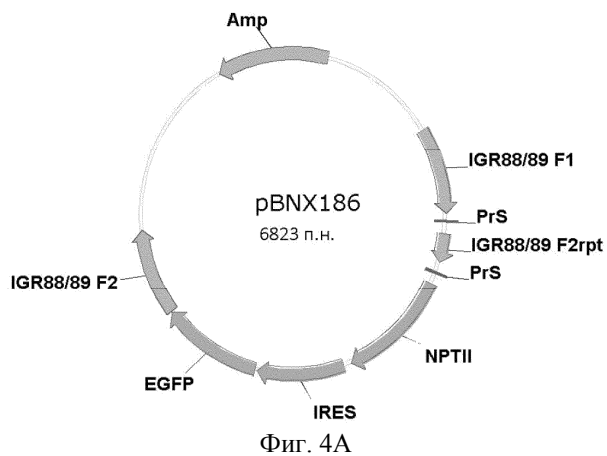


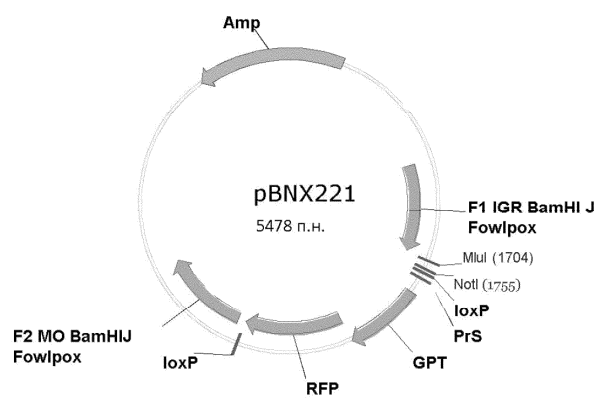
Фиг. 3Б



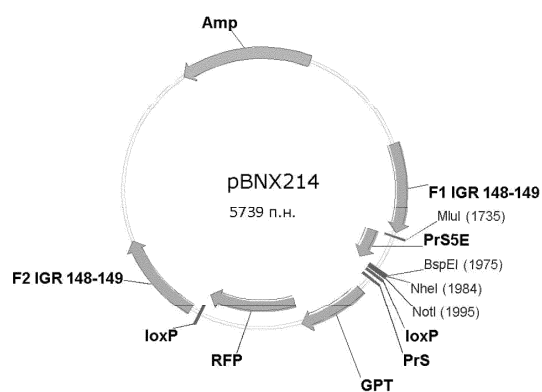
Фиг. 3Г

039715

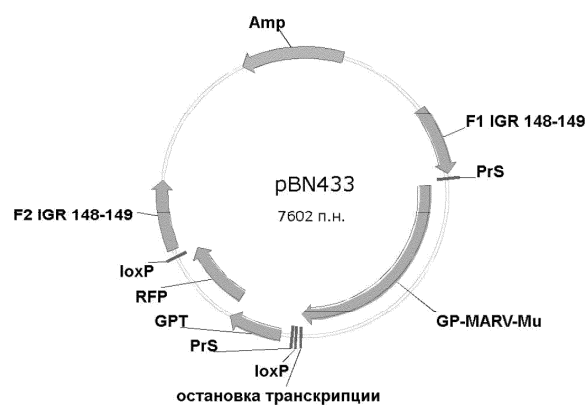




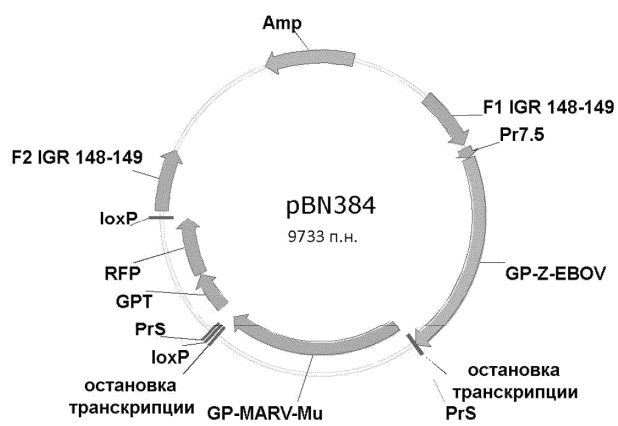
Фиг. 4Г



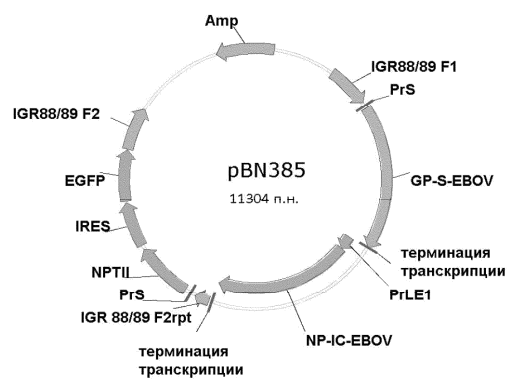
Фиг. 4Д



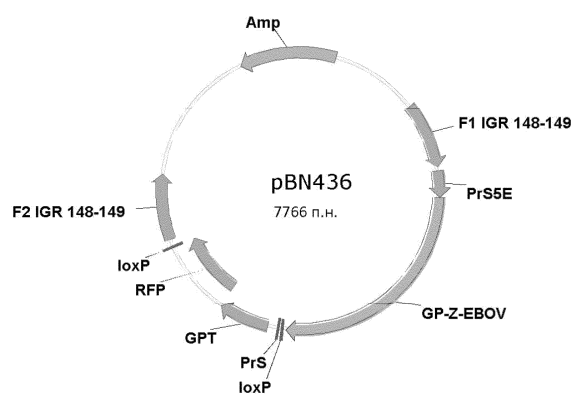
Фиг. 5А



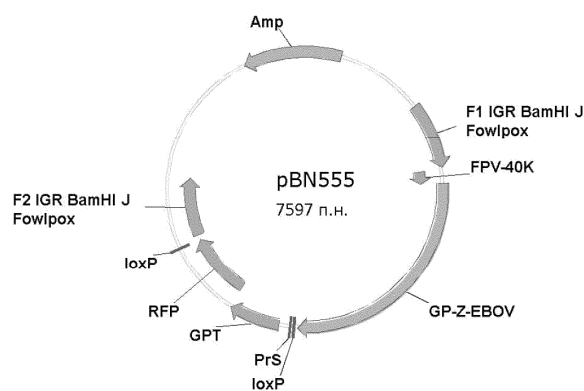
Фиг. 5Б



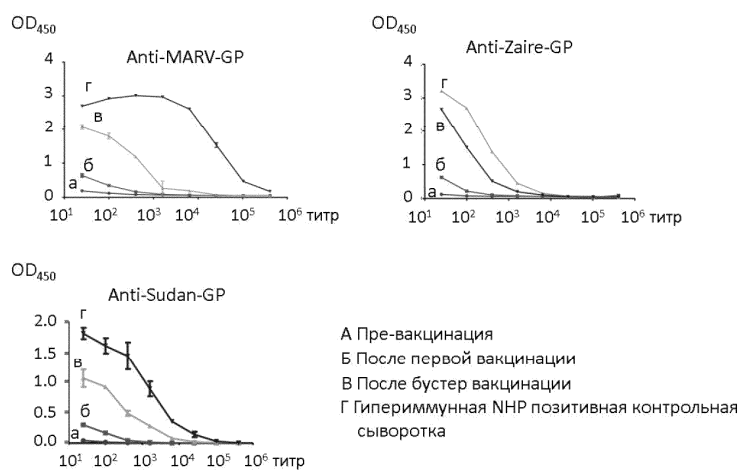
Фиг. 5В



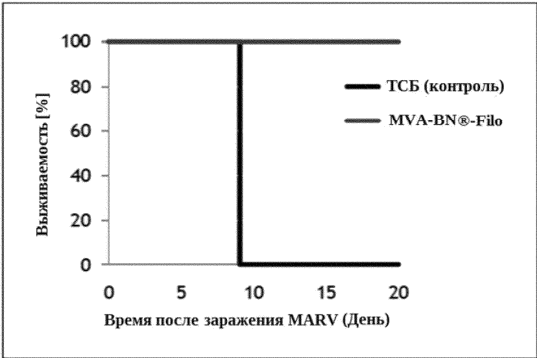
Фиг. 5Г



Фиг. 5Д



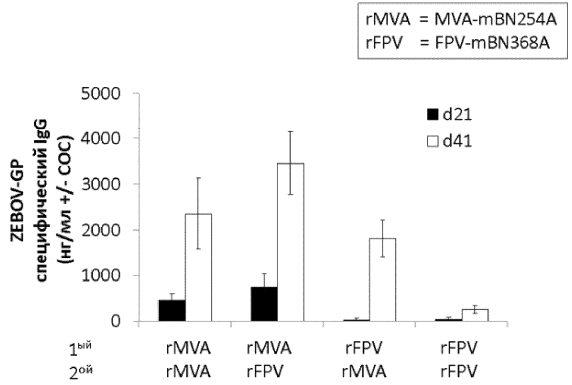
Фиг. 6



Фиг. 7А

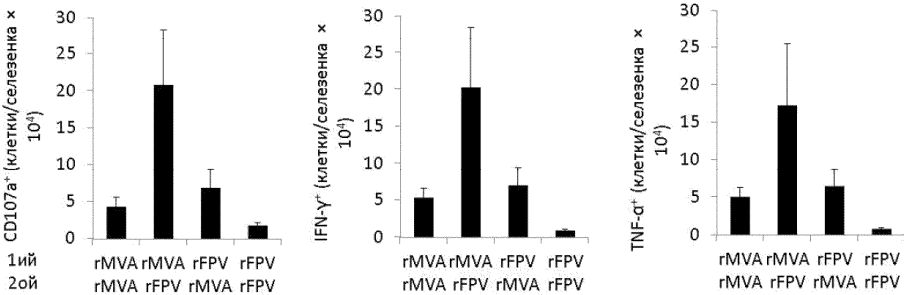


Фиг. 7Б

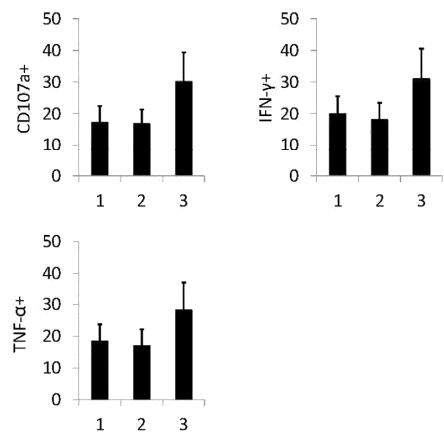


Фиг. 8А

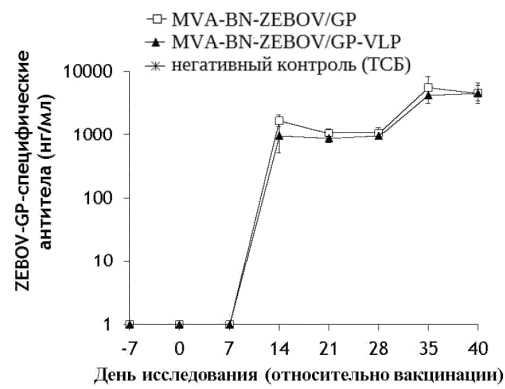
rMVA = MVA-mBN254A
rFPV = FPV-mBN368A



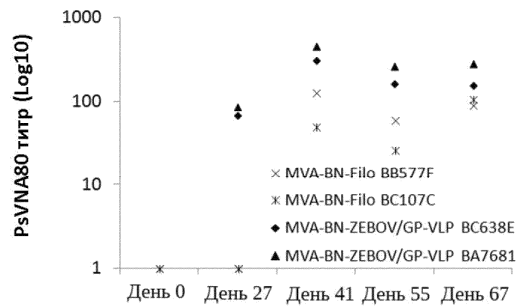
Фиг. 8Б



Фиг. 9

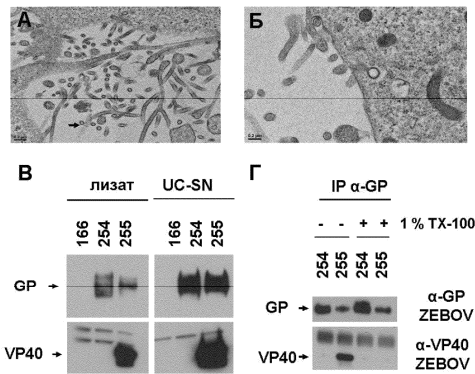


Фиг. 10

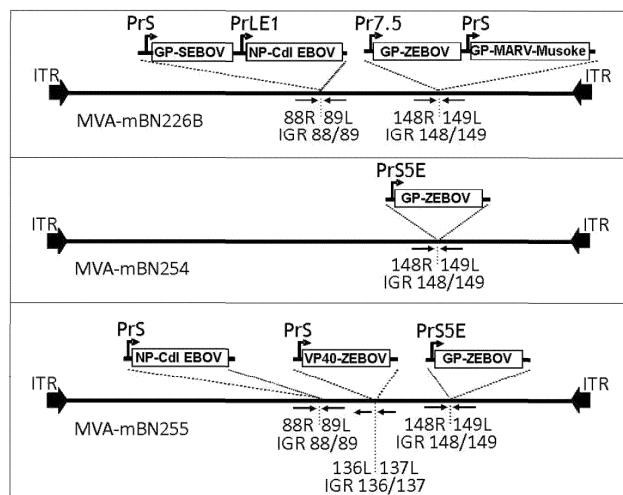


Время относительно вакцинации

Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

