



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.09

(21) Номер заявки
201990114

(22) Дата подачи заявки
2013.10.28

(51) Int. Cl. C12N 15/863 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ПРОМОТОР PR13.5 ДЛЯ УСТОЙЧИВЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

(31) 61/719,429

(32) 2012.10.28

(33) US

(43) 2019.09.30

(62) 201590831; 2013.10.28

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

(72) Изобретатель:
Штайгервальд Робин, Бринкманн Кай
(DE)

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

(56) WACHSMAN M. et al.: "Antigen-presenting capacity of epidermal cells infected with vaccinia virus recombinants containing the herpes simplex virus glycoprotein D, and protective immunity", *The Journal of general virology*, 1 September 1989 (1989-09-01), pages 2513-2520, XP055095225, ENGLAND, DOI: 10.1099/0022-1317-70-9-2513, retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550579>, page 2514, lines 2-7

PERKUS M.E. et al.: "Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system", *JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US*, vol. 63, № 9, 1 September 1989 (1989-09-01), pages 3829-3836, XP000351647, ISSN: 0022-538X, page 3829, last paragraph - page 3830, paragraph 1

TINE J.A. et al.: "NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, mutant antigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria", *INFECTION AND IMMUNITY*, vol. 64, № 9, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 3833-3844, XP055095101, figure 1, page 3836, last line

WO-A2-2006073431

KAREN 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", *JOURNAL OF VIROLOGY*, vol. 84, № 17, 10 June 2010 (2010-06-10), pages 8743-8752, XP055057695, DOI: 10.1128/jvi.00604-10, figures 1A, 3-5, page 8743, last line - page 8744, paragraph 1

DAVISON A.J. et al.: "Structure of vaccinia virus early promoters", *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM*, vol. 210, № 4, 20 December 1989 (1989-12-20), pages 749-769, XP024010295, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/0022-2836(89)90107-1 [retrieved on 1989-12-20], abstract

ANONYMOUS: "Vaccinia virus WR, complete genome - Nucleotide - NCBI", GenBank Accession Number AY243312, 14 June 2006 (2006-06-14), XP055095213, retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/29692106> [retrieved on 2014-01-08], cited in the application, *VACWR018 nucleotide and amino acid sequence*

MAGDALINI MOUTAFTSI et al.: "Uncovering the interplay between CD8, CD4 and antibody responses to complex pathogens", *FUTURE MICROBIOLOGY*, vol. 5, № 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 221-239, XP055095338, ISSN: 1746-0913, DOI: 10.2217/fmb.09.110

MAGDALINI et al.: "Vaccinia Virus-Specific CD4+ T Cell Responses Target a Set of Antigens Largely Distinct from Those Targeted by CD8 T Cell Responses", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 178, № 11, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 6814-6820, XP055095361

KOTWAL G.J. et al.: "Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant", *VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL*, vol. 167, № 2, 1 December 1988 (1988-12-01), pages 524-537, XP023051144, ISSN: 0042-6822 [retrieved on 1988-12-01], page 534, lines 18-20, last paragraph, table 1

SONIA T. WENNIER et al.: "A Novel Naturally Occurring Tandem Promoter in Modified Vaccinia Virus Ankara Drives Very Early Gene Expression and Potent Immune Responses", *PLOS ONE*, vol. 8, № 8, 12 August 2013 (2013-08-12), page e73511, XP055075403, DOI: 10.1371/journal.pone.0073511, the whole document

(57) Изобретение включает рекомбинантные поксвирусы, предпочтительно модифицированные вирусы осповакцины Анкара (MVA), содержащие промотор Pr13.5, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, и способы их применения. Изобретение относится к композициям и способам индукции сильных CD8 Т-клеточных и гуморальных иммунных реакций на специфический(е) антиген(ы) путем проведения одной или более иммунизаций рекомбинантным MVA млекопитающего, предпочтительно человека.

Уровень техники

MVA происходит от штамма вируса осповакцины Анкара, поражающего кожу (хориоаллантаинового вируса осповакцины Анкара (CVA)), который в течение многих лет поддерживался в Институте вакцинации, Анкара, Турция, и использовался в качестве основы для вакцинации людей. Однако из-за частых тяжелых поствакцинальных осложнений, связанных с вирусами осповакцины (VACV), было принято несколько попыток создания более аттенуированной и безопасной противооспенной вакцины.

В период с 1960 по 1974 профессору Anton Maug удалось успешно аттенуировать CVA путем более чем 570 последовательных пассажей в клетках CEF (Maug et al., 1975, Passage History: Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA, *Infection*, 3:6-14). В рамках начального этапа разработки противооспенной вакцины на основе MVA были проведены клинические исследования MVA-517 (соответствующего 517-му пассажу) в комбинации с Lister Elstree (Stickl, 1974, Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA", *Prev. Med.*, 3(1):97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel, 1971, Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus"), *Munch Med Wochenschr.*, 113:1149-1153) у субъектов, подверженных риску нежелательных реакций на введение противооспенной вакцины. В 1976-м MVA, полученный из посевного материала MVA-571 (соответствующего 571-му пассажу), был зарегистрирован в Германии в качестве первичной вакцины в двухэтапной программе инъекционной противооспенной вакцинации. В дальнейшем MVA-572 были вакцинированы приблизительно 120000 европейцев, большинство из которых - дети от 1 до 3 лет. При этом не сообщалось о серьезных побочных эффектах, несмотря на то что многие из субъектов принадлежали к популяции, имеющей высокий риск осложнений, связанных с обычным вирусом осповакцины (Maug et al., 1978, The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behaviour in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl), *Zentralbl. Bacteriol. (B)*, 167:375-390). MVA-572 был депонирован в Европейской коллекции клеточных культур животных, Лаборатория исследования и производства вакцин, Лабораторная служба общественного здравоохранения, Научно-производственный центр микробиологии, Портон Даун, Солсбери, Уилтшир SP4 0JG, Соединенное Королевство, под номером ECACC V9401 2707.

Так как для аттенуации MVA было использовано множество пассажей, существует ряд различных штаммов или изолятов в зависимости от номера пассажа в клетках CEF. Все штаммы MVA получены от доктора Мауг, и большинство происходит от MVA-572, который применялся в рамках программы по эрадикации оспы в Германии, или от MVA-575, который интенсивно использовался в качестве ветеринарной вакцины. MVA-575 был депонирован 7 декабря 2000 в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под регистрационным номером V001 20707.

Путем серийного культивирования (более 570 пассажей) CVA в первичных фибробластах эмбриона цыпленка был получен аттенуированный вирус CVA - MVA (модифицированный вирус осповакцины Анкара). MVA был дополнительно пассирован компанией Bavarian Nordic и получил наименование MVA-BN. У MVA, как и у MVA-BN, отсутствует приблизительно 13% (26,5 кб, соответствующих шести крупным и множеству мелких делеционных сайтов) генома, по сравнению с предковым вирусом CVA. Делеции затрагивают некоторые гены вирулентности и тропизма, а также большой фрагмент гена, кодирующего белок включений типа А (ATI), и ген, кодирующий структурный белок, который направляет зрелые вирусные частицы в тельца-включения типа А. Образец MVA-BN был депонирован 30 августа 2000 г. в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под номером V00083008.

MVA-BN может прикрепляться к клеткам человека и проникать в них, где вирусные гены крайне эффективно экспрессируются. При этом не происходит сборки и высвобождения дочерних вирионов. MVA-BN и его производные вводились многим типам животных и более чем 2000 людей, в том числе страдающим от иммунодефицита. Все вакцинации были признаны в целом безопасными и хорошо переносимыми.

Во множестве различных публикаций представлено мнение, что все штаммы MVA одинаковы и представляют собой высокоаттенуированные безопасные живые вирусные векторы. Однако в результате доклинических испытаний было показано, что MVA-BN демонстрирует исключительную аттенуированность и эффективность, по сравнению с другими штаммами MVA (WO 02/42480). MVA-BN, варианты штаммы MVA, как, например, депонированные в ECACC под номером V00083008, имеют способность к репродуктивной репликации в фибробластах эмбриона цыпленка (CEF) *in vitro*, но не способны к репродуктивной репликации в клетках человека, в которых могут репродуктивно реплицироваться MVA 575 или MVA 572. К примеру, MVA-BN не способен к репродуктивной репликации в кератиноцитах человека линии HaCaT, клетках почки эмбриона человека линии 293, клетках остеосаркомы человека линии 143В и клетках аденокарциномы шейки матки человека линии HeLa. Более того, штаммы MVA-BN не реплицируются при моделировании на мышцах, не способны к продуцированию зрелых В- и Т-клеток и в связи с этим имеющих тяжелый иммунодефицит и являющихся в высшей степени восприимчивыми к реплицирующемуся вирусу. Дополнительным или альтернативным свойством штаммов MVA-BN является способность к индукции по меньшей мере существенно схожего уровня иммунитета при проведении вакцинации в режиме прайм-буст с использованием вируса осповакцины как для первичной иммунизации, так и для реиммунизации по сравнению с вакцинацией в режиме прайм-буст с использованием ДНК

для первичной иммунизации и вируса осповакцины для реиммунизации.

Термин "не способный к репродуктивной репликации" применяется в настоящей заявке, как определено в WO 02/42480 и патенте США 6761893, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, данный термин относится к вирусу, который через 4 дня от начала инфекции демонстрирует степень амплификации, составляющую менее чем 1, что выявляется с помощью методов, описанных в патенте США 6761893, который включен в настоящий документ посредством ссылки. "Степень амплификации" вируса представляет собой соотношение количества вирусов, происходящих из инфицированной клетки (выход), к исходному количеству вирусов, использованных для инфицирования клеток (вход). Соотношение между выходом и входом, составляющее "1", описывает статус амплификации, при котором количество вирусов, происходящих из инфицированной клетки, совпадает с исходным количеством вирусов, использованных для инфицирования клеток.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения MVA-BN или его производные характеризуются индуцированием по меньшей мере существенно схожего уровня иммунитета при проведении вакцинации в режиме прайм-буст с использованием вируса осповакцины как для первичной иммунизации, так и для реиммунизации по сравнению с вакцинацией в режиме прайм-буст с использованием ДНК для первичной иммунизации и вируса осповакцины для реиммунизации. Вирус осповакцины рассматривается как индуцирующий по меньшей мере существенно схожий уровень иммунитета при проведении вакцинации в режиме прайм-буст с использованием вируса осповакцины как для первичной иммунизации, так и для реиммунизации по сравнению с вакцинацией в режиме прайм-буст с использованием ДНК для первичной иммунизации и вируса осповакцины для реиммунизации в случае, если ответ ЦТЛ, оцененный с помощью "анализа 1" или "анализа 2", раскрытых в WO 02/42480, предпочтительно с помощью обоих анализов, является по меньшей мере существенно схожим при проведении вакцинации в режиме прайм-буст с использованием вируса осповакцины как для первичной иммунизации, так и для реиммунизации по сравнению с вакцинацией в режиме прайм-буст с использованием ДНК для первичной иммунизации и вируса осповакцины для реиммунизации. Более предпочтительно, чтобы ответ ЦТЛ после проведения вакцинации в режиме прайм-буст с использованием вируса осповакцины как для первичной иммунизации, так и для реиммунизации, оцененный с помощью по меньшей мере одного из анализов, был более интенсивным по сравнению с вакцинацией в режиме прайм-буст с использованием ДНК для первичной иммунизации и вируса осповакцины для реиммунизации. Наиболее предпочтительно, чтобы ответ ЦТЛ был более интенсивным при его оценке с помощью обоих анализов.

В WO 02/42480 раскрыт способ получения вирусов осповакцины, имеющих свойства MVA-BN. Высокоаттенуированный вирус MVA-BN может быть получен, например, путем дополнительного пассирования модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), такого как MVA-572 или MVA-575.

Таким образом, было показано, что MVA-BN имеет самый высокий профиль аттенуированности по сравнению с другими штаммами MVA, и является безопасным даже для животных с тяжелым иммунодефицитом.

Несмотря на то что репликация MVA в клетках млекопитающих резко подавлена, его гены эффективно транскрибируются, при этом блок вирусной репликации происходит на уровне сборки и выхода вируса. (Sutter and Moss, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:10847-10851; Carroll and Moss, 1997, Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line, Virology, 238:198-211.) Несмотря на высокую аттенуированность и сниженную вирулентность MVA-BN доклинические исследования показали, что он вызывает как гуморальные, так и клеточные иммунные реакции на VACV и продукты гетерологичных генов, клонированных в геном MVA (Harrer et al., 2005, Therapeutic Vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antiviral Therapy, 10:285-300; Cosma et al., 2003, Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals, Vaccine, 22(1):21-29; Di Nicola et al., 2003, Clinical protocol. Immunization of patients with malignant melanoma with autologous CD34(+) cell-derived dendritic cells transduced ex vivo with a recombinant replication-deficient vaccinia vector encoding the human tyrosinase gene: a phase I trial, Hum Gene Ther., 14(14):1347-1 360; Di Nicola et al., 2004, Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+)-derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma, Clin Cancer Res., 10(16):5381-5390).

MVA-BN и вакцины на основе рекомбинантного MVA-BN могут быть получены, пассированы, продуцированы и произведены в клетках CEF, культивируемых в среде без сыворотки. С учетом известных характеристик, многие рекомбинантные варианты MVA-BN были предложены для доклинической и клинической разработки. Между MVA-BN, основой вирусного вектора, и различными вакцинами на основе рекомбинантного MVA не было обнаружено отличий по аттенуированности (недостаточности репликации в линиях клеток человека) или безопасности (по результатам доклинических исследований токсичности или клинических исследований).

Индукция сильных гуморальной и клеточной иммунных реакций на продукт чужеродного гена, экспрессируемый VACV-вектором, затруднена вследствие того, что продукт чужеродного гена должен

конкурировать с более чем 150 антигенами вектора VACV за распознавание и индукцию специфических антител и Т-клеток. Особую проблему представляет иммунодоминирование CD8 Т-клеточных антигенных детерминант вектора, которое препятствует индукции сильной CD8 Т-клеточной реакции на продукт чужеродного гена. (Smith et al., Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara, *J. Immunol.*, 175:8431-8437, 2005.) Это относится к реплицирующимся VACV-векторам, таким как Dгувах, а также к нереплицирующимся векторам, например NYVAC и MVA.

Для экспрессии рекомбинантного антигена ("неоантигена") вектором VACV могут использоваться только поксвирус-специфические промоторы, но не обычные эукариотические промоторы. Это обусловлено особенностями биологии поксвирусов, которые реплицируются в цитоплазме и привносят свою собственную, независимую от клетки транскрипционную машинерию, не распознающую типичные эукариотические промоторы.

Цикл вирусной репликации подразделен на две основных фазы: раннюю фазу, включающую первые два часа от начала инфекции до репликации ДНК, и позднюю фазу, начинающуюся вместе с репликацией вирусной ДНК на 2-4 ч от начала инфекции.

Поздняя фаза охватывает остаток цикла вирусной репликации от ~2-20 ч от начала инфекции до высвобождения дочерних вирионов из инфицированной клетки. Существует ряд типов поксвирусных промоторов, отличающихся периодами цикла вирусной репликации, в течение которых они являются активными, и называемых в соответствии с этим, например, ранние и поздние промоторы (см., например, Davison and Moss, *J. Mol. Biol.*, 210:771-784, 1989; Davison and Moss, *J. Mol. Biol.*, 210:749-769, 1989; Hirschmann et al., *Journal of Virology*, 64:6063-6069, 1990, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки).

Тогда как ранние промоторы могут быть активны также на позднем этапе инфекции, активность поздних промоторов ограничивается поздней фазой. Промоторы третьего класса, называемые промежуточными промоторами, активны в течение перехода от ранней к поздней фазе и зависимы от репликации вирусной ДНК. Последнее относится также к поздним промоторам, однако транскрипция с промежуточных промоторов начинается раньше, чем с типичных поздних промоторов и нуждается в другом наборе транскрипционных факторов.

В последние годы становится все более очевидным, что выбор временного класса поксвирусного промотора для экспрессии неоантигена оказывает сильное влияние на силу и качество неоантиген-специфической иммунной реакции. Было показано, что Т-клеточные реакции на неоантигены, экспрессированные под контролем позднего промотора, являются более слабыми, чем на такой же антиген, экспрессированный под контролем раннего промотора (Bronte et al., Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:3183-3188, 1997; Coupar et al., Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response, *Eur. J. Immunol.*, 16:1479-1487, 1986).

Еще более поразительно, недавно было показано, что при повторных аутологических иммунизациях VACV, как и VACV-вектором MVA, дефектным по репликации, CD8 Т-клеточные реакции на антигены, находящиеся под контролем исключительно позднего промотора, могут полностью отсутствовать. Это нарушение привело к тому, что антиген-специфическая CD8 Т-клеточная реакция почти не проявляется после вторичной иммунизации (Kastenmuller et al., Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination, *J. Exp. Med.*, 204:2187-2198, 2007).

Следовательно, ранняя экспрессия неоантигенов VACV-векторами, по-видимому, является определяющей для эффективных неоантиген-специфических CD8 Т-клеточных реакций. Было также показано, что антиген, экспрессированный VACV-вектором в ранней фазе, конкурирует не только с антигенами, экспрессированными в поздней фазе, но также и с другими антигенами, экспрессированными в ранней фазе, за иммунодоминирование в течение CD8 Т-клеточной реакции. (Kastenmuller et al., 2007.) Специфические свойства ранних участков поксвирусных промоторов, следовательно, могут быть крайне важны для индукции неоантиген-специфической Т-клеточной реакции. Более того, согласно общепринятой точке зрения, большее количество антигена способствует индукции более сильных антиген-специфических иммунных реакций (для информации относительно поксвирусов; см., например, Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines, *Vaccine*, 26:486-493, 2008).

Ранее был описан промотор, сочетающий в себе 4 ранних промоторных элемента и поздний промоторный элемент гена ATI (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses, *J. Virol.*, 65:5584-5588, 1991; Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines, *Vaccine*, 26:486-493, 2008). Было показано, что он обеспечивает повышенную раннюю экспрессию антигена. Тем не менее Т-клеточные реакции, индуцированные антигеном, экспрессия которого находится под контролем подобного промотора, были исследованы только после однократной иммунизации и явно не отличались от реакций, имевших место в случае экспрессии под контролем типичного промотора Pr7.5K (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses, *J. Virol.*, 65:5584-5588, 1991).

Jin et al. в Arch. Virol., 138:315-330, 1994, было описано конструирование рекомбинантных промоторов VACV, состоящих из промотора АТ1 VACV в сочетании с тандемными повторами (2-38 копий) мутантного промотора Pr7.5, функционально связанного с геном САТ. До 10 копий мутантного промотора Pr7.5 включительно эффективно повышали раннюю экспрессию генов. Дальнейшее увеличение количества копий, похоже, имеет подавляющее действие. Для всех конструкторов количество белка САТ, производимое в присутствии цитозин арабинозида (AraC) (т.е. если цикл вирусной репликации был остановлен в ранней фазе), составляло менее чем одну десятую количества, производимого в отсутствие AraC (Jin et al., Arch. Virol., 138:315-330, 1994).

Недавно было показано, что повторные иммунизации мышей рекомбинантным MVA, экспрессирующим OVA под контролем гибридного ранне-позднего промотора (pHub), содержащего пять копий сильного раннего элемента, приводят к развитию исключительных острых CD8 Т-клеточных реакций и реакций CD8 Т-клеток памяти, по сравнению с OVA, экспрессия которого находится под контролем Pr7.5- и PrS (Baur et al., Journal of Virology, vol. 84(17):8743-8752 (2010)). Кроме того, после трех или более иммунизаций белок B8R, происходящий из MVA, заменяется OVA, экспрессированным под контролем pHub, в качестве иммунодоминантного CD8 Т-клеточного антигена Id.

Assarsson et al. в P.N.A.S., 105:2140-45, 2008, оценили одновременные уровни экспрессии 223 аннотированных генов вируса осповакцины в течение инфекции и определили их динамику с помощью геномных микрочипов высокой плотности. Они обнаружили, что многие гены штамма WR вируса осповакцины имеют высокие уровни транскрипции. Assarsson et al. привели примеры высокоэкспрессированных генов: предранних VACWR-059 (белок, связывающий двухцепочечную РНК) и VACWR-18 4 (продукт неизвестен); раннего VACWR-018 (продукт неизвестен); ранне-позднего VACWR-131 (капсидный белок); и позднего VACWR-169 (продукт неизвестен). Assarsson et al. указали на то, что вследствие исключительно высоких уровней экспрессии эти гены могут представлять особый интерес для будущих исследований, но не определили, какие промоторы иницируют транскрипцию этих генов.

Yang et al. в P.N.A.S., 107:11513-11518, 2010, применили глубокое секвенирование РНК для анализа динамики транскриптомов вируса осповакцины (VACV) в течение инфекции. До репликации вирусной ДНК были выявлены транскрипты со 118 ORF VACV; после репликации были описаны транскрипты с 93 дополнительных ORF. Высокое разрешение позволило определить точные границы многих мРНК, включая сквозные транскрипты, и расположение сайтов инициации транскрипции и перекрывающихся промоторов.

Orubu et al. в PLoS ONE, 7(6):e40167, 2012, показали, что сильные ранние промоторы, под контролем которых находится экспрессия нефункциональных или второстепенных открытых рамок считывания (ORF) MVA, могут быть использованы для иммуногенной экспрессии рекомбинантного антигена. Точная замена MVA-ортологов C11R, F11L, A44L и B8R на модельный антиген, расположенный таким образом, чтобы использовать тот же кодон инициации трансляции, сделала возможной раннюю экспрессию трансгена, подобную или несколько более интенсивную, чем та, что достигается с помощью широко используемого промотора p7.5 или коротких синтетических промоторов. Аналогично, частота антиген-специфических CD8+ Т-клеток, индуцированных путем однократного введения или первичной иммунизации аденовирусом и реиммунизации гMVA у мышей, при использовании эндогенных промоторов в их исходных геномных локусах была такой же или несколько повышенной, по сравнению с типичными конструкторами.

Усиление иммуногенности, наблюдаемое при использовании промоторов C11R или F11L, в сравнении с p7.5, было подобно усилению иммуногенности, имевшему место при сравнении промотора mH5 с p7.5.

Сильные Т-клеточные гуморальные иммунные реакции на антигены, кодируемые рекомбинантными поксвирусами, могут повысить эффективность вакцины. Следовательно, в данной области техники существует потребность в композициях и способах, вызывающих сильные Т-клеточные и гуморальные иммунные реакции на антигены, кодируемые рекомбинантными поксвирусами, такими как MVA. Изобретение удовлетворяет эту потребность.

Краткая сущность изобретения

Изобретение предлагает рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий промотор Pr13.5, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей неоантиген, и способы их применения. В одном варианте реализации изобретения изобретение предлагает способ индукции устойчивой CD8 Т-клеточной реакции на неоантиген у млекопитающего, предпочтительно человека, включающий проведение одной или более иммунизаций вирусом MVA млекопитающего, в том числе человека.

В различных вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая по меньшей мере на 95, 98 или 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В различных вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию второй нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 31 нуклеотида, которая по меньшей мере на 95, 98 или 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В различных вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 2 копии нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 нуклеотидов, которая на 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В различных вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит SEQ ID NO: 2.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена upstream-последовательность гена MVA013.5L (SEQ ID NO: 3). Приведены последовательности промоторов Pr13.5-short и Pr13.5-long. Подчеркнут пунктирной линией: Pr13.5-long (пол. 15878-15755). Подчеркнут жирной линией: Pr13.5-short (пол. 15808-15755). Подчеркнуты сплошной линией: Стартовый кодон ATG гена MVA013.5 (пол. 15703-15701). Стоп-кодон TAA гена MVA014L (пол. 15878-15856). Черные стрелки снизу: сайты инициации транскрипции, определенные с помощью ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (пол. 15767 и 15747). Серые стрелки сверху: сайты инициации транскрипции, приведенные Yang et al., 2010, suppl. data. Заключен в рамку: коровый промотор, приведенный Yang et al., 2010, suppl. data (пол. 15913-15899). Положения приведены на основании последовательности DQ983238.1 в GenBank.

На фиг. 2 представлены последовательность и положение промоторов Pr13.5-long и Pr13.5-short в геноме MVA (SEQ ID NO: 3). В upstream-последовательности гена MVA013.5 расположен прямой повтор, состоящий из 44 п.о. Заключена в рамку: повторяющаяся последовательность, состоящая из 44 п.о., расположенная в upstream-последовательности промотора 13.5, отделенного спейсером, состоящим из 36 п.о. Подчеркнут пунктирной линией: Pr13.5-long (пол. 15878-15755). Подчеркнут жирной линией: Pr13.5-short (пол. 15808-15755). Подчеркнут сплошной линией: стартовый кодон ATG гена MVA013.5 (пол. 15703-15701). Положения приведены на основании последовательности DQ983238.1 в GenBank.

На фиг. 3 представлены результаты измерения уровней мРНК гена овальбумина в клетках HeLa, инфицированных упомянутыми конструктами, с помощью RT-qPCR в указанные моменты с начала инфекции.

На фиг. 4 представлены результаты измерения белковой экспрессии Ova с помощью FACS в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в клетках HeLa, инфицированных упомянутыми конструктами, в указанные моменты с начала инфекции. Среднее значение интенсивности флуоресценции для клеток дикого типа (не содержащих ген Ova), составляющее 399 СИФ, представляет собой фоновый уровень флуоресценции.

На фиг. 5 представлено среднее соотношение клеток Ova+/B8R+ у мышей, вакцинированных упомянутыми конструктами, после первой, второй и третьей иммунизации.

На фиг. 6 представлено среднее соотношение Ova+/B8R+Т-клеточных реакций у мышей на 10-ю неделю после третьей иммунизации упомянутыми конструктами.

Фиг. 7А и 7В иллюстрируют образование антител после первой, второй и третьей иммунизаций упомянутыми конструктами. А. Среднее геометрическое титра (СГТ) антител. В. Соотношение СГТ в сравнении с промотором PrS. Промоторы MVA50L+PrSSL и MVA170R+PrSSL являются промоторами MVA соответствующих генов, слитыми с 5'-концом синтетического короткого сильного позднего промотора PrSSL (Short Strong Late) непосредственно upstream от ATG гена овальбумина (AATTTTAAATA-TATAA; SEQ ID NO: 7; PCT WO 2010/060632 A1).

На фиг. 8А-8F представлено выравнивание последовательности SEQ ID NO: 1 с нуклеотидными последовательностями различных поксвирусных промоторов Pr13.5 с помощью BLAST. Идентичные нуклеотиды обозначены точками, отсутствующие нуклеотиды обозначены тире, а замены представлены буквами.

На фиг. 9А-9D представлены учетные номера и названия последовательностей, использованных для выравнивания, представленного на фиг. 8А-8F.

Подробное описание сущности изобретения

Клетки HeLa инфицировали MVA-BN, после чего получали РНК. Синтезировали специфические праймеры к различным ORF MVA и проводили ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (FirstChoice® RLM-RACE Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) для получения ПЦР-продуктов, соответствующих РНК MVA, кодирующим эти ORF. ПЦР-продукты были секвенированы для определения сайтов инициации транскрипции. Исходя из этих данных, были определены промоторы для транскрипции мРНК, кодирующих эти ORF. Для контроля экспрессии гена овальбумина (OVA) в MVA-конструкты были вставлены промоторы MVA для следующих ORF: MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) и MVA170R (B3R; WR 185).

Клетки HeLa были инфицированы рекомбинантными вирусами MVA *in vitro*, а белковую экспрессию овальбумина оценивали с помощью анализа FACS. Анализ FACS не обнаружил белковой экспрессии овальбумина на 2-й или даже 4-й час от начала инфекции для конструктов, содержащих промоторы MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) и MVA170R (B3R; WR 185). В то же время для промотора MVA13.5 (CVA022; WR 018) интенсивная экспрессия овальбумина была выявлена уже после 2-х часов.

Предполагаемый коровый элемент промотора для ORF MVA13.5L был ранее определен в Yang et al., 2010, как содержащий 15 нт коровую последовательность и нетранслируемую лидерную последователь-

ность размером 177 нт. Тем не менее в настоящем исследовании установлено, что сайты инициации транскрипции, используемые ORF MVA13.5L, находятся более чем на 100 нуклеотидов downstream от сайта инициации, определенного Yang et al. Соответственно промотор MVA13.5, определенный изобретателями, отличается от корового элемента промотора, определенного Yang et al.

Промотор MVA13.5, определенный изобретателями, содержит повтор, состоящий из более чем 40 нуклеотидов: TAAAAATAGAAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID NO: 1). Повторяющаяся последовательность встречается также у многих других поксвирусов, например вируса оспы лошадей, вируса оспы обезьян, вируса оспы коров, вируса натуральной оспы, вируса осповакцины, вируса оспы верблюдов, вируса оспы кроликов, вируса оспы мышей и вируса оспы гололапых песчанок (фиг. 8 и 9).

Были созданы два MVA-конструкта с промоторами, содержащими одну копию (MVA13.5 short; SEQ ID NO: 1) или две копии (MVA13.5 long; SEQ ID NO: 2) повтора, контролирующего экспрессию гена овальбумина (OVA). После инфицирования клеток HeLa обоими конструктами *in vitro* была выявлена интенсивная экспрессия овальбумина (фиг. 4).

С помощью RT-qPCR была оценена динамика экспрессии РНК овальбумина под контролем различных промоторов в инфицированных клетках HeLa *in vitro*. Как MVA13.5 short, так и MVA13.5 long продемонстрировали высокие уровни ранней экспрессии РНК (фиг. 3). MVA13.5 long продемонстрировал наивысшие уровни ранней белковой экспрессии.

CD8 Т-клеточные реакции на OVA, экспрессируемый с рекомбинантных конструктов под контролем промоторов PrS, Pr7.5 opt+spacer, Pr13.5 short и Pr13.5 long, были оценены у мышей после одной, двух и трех иммунизации рекомбинантным MVA (фиг. 5, 6). OVA-специфические и B8R (вирус)-специфические CD8 Т-клеточные реакции были оценены путем определения количества CD8 Т-клеток, специфически связывающихся с гексамерами МНС I класса. Декстрамеры МНС I класса образовывали комплекс с соответствующими H-2Kb-связывающими пептидами: SIINFELK (SEQ ID NO: 4) для OVA или TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) для вирусного пептида B8R.

Среднее соотношение OVA-специфических к B8R-специфическим CD8 Т-клеткам составляло примерно 2,5 для MVA13.5-long после 3-х иммунизации. Три других конструкта продемонстрировали среднее соотношение, составляющее менее чем 1. Таким образом, инверсия иерархии иммунодоминирования может быть достигнута путем применения для экспрессии неоантигена промотора Pr13.5 long, но не других промоторов.

Гуморальные иммунные реакции на OVA, экспрессируемый с рекомбинантных конструктов под контролем различных промоторов, были оценены у мышей после одной, двух и трех иммунизаций рекомбинантным MVA (фиг. 7A, 7B). Гуморальная иммунная реакция для MVA13.5 long была существенно более интенсивной, чем реакция, наблюдаемая при применении рекомбинантного MVA, содержащего промотор PrS. Следовательно, применение промотора Pr13.5 long для контроля экспрессии неоантигена MVA обеспечивает неожиданно превосходные результаты.

Промоторы Pr13.5.

Изобретение охватывает выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие или состоящие из промотора Pr13.5. В рамках настоящего изобретения "промотор Pr13.5" содержит по меньшей мере 1 копию нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1. Таким образом, в различных вариантах реализации изобретения "промотор Pr13.5" может относиться к нуклеотидной последовательности MVA, синтетической последовательности или аналогичной поксвирусной последовательности из поксвируса, отличного от MVA. В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1. Длина нуклеотидной последовательности составляет предпочтительно 40, 41, 42, 43, 44 или 45 оснований.

Процент идентичности может быть определен путем визуальной оценки и математического расчета. Кроме того, процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей может быть определен путем сравнения информации о последовательностях с помощью компьютерной программы GAP, версия 6.0, описанной Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) и предлагаемой Генетической компьютерной группой Университета Висконсина (UWGCG). Предпочтительные параметры по умолчанию для программы GAP включают

(1) унитарную матрицу сравнения (имеющую значение 1 для совпадений и 0 для несовпадений) для нуклеотидов и весовую матрицу сравнения Gribskov and Burgess, Nucl. Acids Res., 14:6745, 1986, как описано Schwartz and Dayhoff, eds. в Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, p. 353-358, 1979;

(2) штраф за каждый пропуск, составляющий 3,0, и дополнительный штраф 0,10 за каждый символ на месте каждого пропуска; и

(3) отсутствие штрафов за концевые пропуски.

Могут использоваться и другие программы, применяемые специалистами в области сравнения последовательностей.

В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 функционально связан с гетерологичной нуклеотидной последовательностью. В рамках настоящего изобретения "гетерологичная нуклеотидная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая в природе не связана с промотором. В рамках настоящего изобретения "функционально связанный" означает, что промотор может контролировать экспрессию гетерологичной нуклеотидной последовательности в клетке, инфицированной поксвирусом. В предпочтительном варианте реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует неоантиген. В рамках настоящего изобретения неоантиген означает антиген, который не экспрессируется поксвирусным вектором в естественных условиях.

Промотор Pr13.5 может быть функционально связан с гетерологичной нуклеотидной последовательностью с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В различных вариантах реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность вводится в 13.5 ORF поксвируса.

В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 является поксвирусным промотором природного происхождения. Например, промотор Pr13.5 может происходить от промотора Pr13.5 модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), вируса оспы обезьян, вируса оспы коров, вируса натуральной оспы, вируса осповакцины, вируса оспы верблюдов, вируса оспы кроликов, вируса оспы мышей или вируса оспы гололапых песчанок. Источники предпочтительных промоторов Pr13.5 могут быть выбраны среди вирусов, представленных на фиг. 9. Предпочтительные промоторы Pr13.5 могут быть выбраны среди последовательностей, представленных на фиг. 8.

В различных вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 является синтетическим промотором Pr13.5.

Промотор Pr13.5 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более копий последовательности, состоящей из по меньшей мере 40, 41, 42, 43, 44 или 45 нуклеотидов, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит 1 копию нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит 1 копию нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более копий последовательности, состоящей из по меньшей мере 40, 41, 42, 43 или 44 нуклеотидов, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит 1 копию нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1, и 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более копий второй нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 31 нуклеотида, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте реализации изобретения вторая нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 оснований.

В предпочтительном варианте реализации изобретения повторяющиеся последовательности разделены 20-80 нуклеотидами, более предпочтительно 30-40 нуклеотидами, наиболее предпочтительно 33, 35, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидами.

В предпочтительном варианте реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере одну копию последовательности: TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTATTGCTCTGTGACTAGAGAC TTTAGTTAGGTAAGTAACTATAATCATA-TAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах реализации изобретения промотор Pr13.5 содержит одну или более нуклеотидных замен, представленных на фиг. 8.

Изобретение охватывает способы экспрессии неоантигена, включающие функциональное связывание промотора Pr13.5 с гетерологичной нуклеотидной последовательностью.

Рекомбинантные поксвирусы, содержащие промоторы Pr13.5.

Изобретение предлагает рекомбинантный поксвирусный вектор, содержащий промотор Pr13.5, функционально связанный с гетерологичной нуклеотидной последовательностью. В одном варианте реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность вставлена в 13.5 ORF поксвируса таким образом, чтобы функционально связать гетерологичную нуклеотидную последовательность с эндогенным вирусным промотором Pr13.5. В другом варианте реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность связана с промотором Pr13.5 и вставлена в геномный сайт, отличный от 13.5 ORF.

В предпочтительном варианте реализации изобретения поксвирусный вектор происходит от поксвирусов, принадлежащих к подсемейству Chordopoxvirinae. Поксвирусы включают вирусы, принадлежащие к родам Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Lepripoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus и Yatapoxvirus. Наиболее предпочтительными являются поксвирусы, принадлежащие к родам Orthopoxvi-

gus и Aviroxvirus.

Другие поксвирусы, такие как вирус оспы енотов и вирус оспы мышей, могут быть использованы в настоящем изобретении, например, для производства вакцины для иммунизации диких животных. В настоящее изобретение включены также представители родов Carpoxvirus и Leporoxvirus, поскольку они пригодны для использования в качестве векторов для крупного рогатого скота и кроликов соответственно.

В других вариантах реализации изобретения поксвирус происходит от вирусов рода Aviroxvirus. Примеры вирусов рода Aviroxvirus, пригодных для использования в настоящем изобретении, включают любые вирусы оспы птиц, такие как вирус оспы кур, вирус оспы канареек, вирус оспы юнко, вирус оспы майн, вирус оспы голубей, вирус оспы попугаев, вирус оспы перепелов, вирус оспы павлинов, вирус оспы пингвинов, вирус оспы воробьев, вирус оспы скворцов и вирус оспы индеек. Предпочтительными вирусами рода Aviroxvirus являются вирус оспы канареек и вирус оспы кур.

В предпочтительном варианте реализации изобретения поксвирус представляет собой вирус осповакцины, наиболее предпочтительно MVA. Изобретение охватывает рекомбинантные вирусы MVA, созданные на основе любых возможных вирусов MVA. Предпочтительными вирусами MVA являются варианты штаммы MVA - MVA-BN, как, например, депонированный в ECACC под номером V00083008; MVA-575, депонированный 7 декабря 2000 в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под регистрационным номером V001 20707; и MVA-572, депонированный в Европейской коллекции клеточных культур животных как ECACC V9401 2707. Предпочтительными являются также производные от депонированных штаммов.

В предпочтительном варианте реализации изобретения MVA имеет способность к репродуктивной репликации в фибробластах эмбриона цыпленка (CEF) или других линиях клеток птиц *in vitro* или в яйце, содержащем эмбрион, *in vivo*, но не способен к репродуктивной репликации в человеческих клетках, в которых могут репродуктивно реплицироваться MVA 575 или MVA 572. В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения MVA не способен к репродуктивной репликации в кератиноцитах человека линии HaCaT, клетках почки эмбриона человека линии 293, клетках остеосаркомы человека линии 143B и клетках аденокарциномы шейки матки человека линии HeLa.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) отличается способностью к репродуктивной репликации в фибробластах эмбриона цыпленка (CEF) *in vitro*, а также большей, чем у MVA-575, аттенуированностью в кератиноцитах человека линии HaCaT, в клетках остеосаркомы человека линии 143B и клетках аденокарциномы шейки матки человека линии HeLa. В предпочтительном варианте реализации изобретения вирус MVA позволяет достичь в клетках CEF степени амплификации, составляющей более чем 500.

Любой антиген, включая антигены, индуцирующие Т-клеточную реакцию, может быть экспрессирован рекомбинантным MVA, предлагаемым в настоящем изобретении. Предпочтительными являются вирусные, бактериальные, грибковые и раковые антигены. Крайне предпочтительными антигенами являются антигены HIV-1, антигены вируса лихорадки денге, специфический антиген простаты (PSA) и простатическая кислая фосфатаза (PAP), антигены HER-2/Neu, антигены сибирской язвы, антигены вируса кори, вируса гриппа, пикорнавируса, коронавируса и антигены респираторно-синцитиального вируса. В предпочтительном варианте реализации изобретения антиген представляет собой чужеродный антиген или неоантиген.

Изобретение охватывает способы создания рекомбинантных поксвирусов, предпочтительно MVA, включающие вставку гетерологичной нуклеотидной последовательности в поксвирус таким образом, чтобы гетерологичная нуклеотидная последовательность была функционально связана с промотором Pr13.5.

Изобретение распространяется на применение рекомбинантных поксвирусов, предлагаемых в настоящем изобретении, в производстве лекарства или вакцины для лечения или профилактики инфекций и заболеваний млекопитающих, в том числе человека.

Изобретение распространяется на применение рекомбинантных поксвирусов, предлагаемых в настоящем изобретении, для лечения или профилактики инфекций и заболеваний млекопитающих, в том числе человека.

Изобретение распространяется на использование рекомбинантных поксвирусов, предлагаемых в настоящем изобретении, в качестве вакцин, в особенности для лечения или профилактики инфекций и заболеваний млекопитающих, в том числе человека.

Наборы, содержащие рекомбинантный MVA.

Изобретение предлагает наборы, содержащие рекомбинантный поксвирусный вектор, предпочтительно вирус MVA согласно настоящему изобретению. Набор может содержать по меньшей мере один, два, три, четыре или более контейнеров или флаконов с рекомбинантным поксвирусным вектором, предпочтительно вирусом MVA, вместе с инструкциями по введению вируса млекопитающим, в том числе человеку. В инструкциях может быть указано, что рекомбинантный вирус вводится млекопитающему, предпочтительно человеку, в однократной или многократной (т.е. 2, 3, 4, 5, 6 и т.д.) дозировке в определенные моменты времени (например, через по меньшей мере 4 недели, через по меньшей мере 6 недель, через по меньшей мере 8 недель после предыдущего введения). В предпочтительном варианте реализа-

ции изобретения в инструкциях указано, что рекомбинантный вирус предназначен для введения млекопитающим, предпочтительно человеку, в по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дозировках.

Способы индуцирования CD8 Т-клеточной и/или гуморальной иммунной реакции.

Изобретение предлагает способы индуцирования CD8 Т-клеточной и/или гуморальной иммунной реакции у хозяина. В предпочтительных вариантах реализации изобретения способ включает проведение по меньшей мере одной, двух, трех, четырех или пяти иммунизаций млекопитающего, в том числе человека, рекомбинантным поксвирусом, предпочтительно MVA, содержащим промотор Pr13.5.

Введение хозяину.

Рекомбинантный поксвирус, предпочтительно MVA согласно настоящему изобретению, может применяться для лечения целого ряда млекопитающих, включая людей и даже людей с ослабленным иммунитетом. Таким образом, настоящее изобретение предлагает также фармацевтическую композицию и вакцину для индуцирования иммунной реакции у млекопитающего, в том числе человека.

В предпочтительном варианте реализации изобретения вакцина содержит рекомбинантный поксвирус, предпочтительно MVA, в интервале концентраций от 10^4 до 10^9 TCID₅₀/мл (дозы, инфицирующей 50% культуры клеток), предпочтительно в интервале концентраций от 10^5 до 5×10^8 TCID₅₀/мл, более предпочтительно в интервале концентраций от 10^6 до 10^8 TCID₅₀/мл и наиболее предпочтительно в интервале концентраций от 10^7 до 10^8 TCID₅₀/мл, в особенности 10^8 TCID₅₀/мл.

Предпочтительная доза для вакцинации млекопитающего, предпочтительно человека, составляет от 10^6 до 10^9 TCID₅₀, более предпочтительно 10^7 TCID₅₀ или 10^8 TCID₅₀, в особенности 10^8 TCID₅₀.

Как правило, фармацевтическая композиция может включать один или более фармацевтически приемлемых и/или одобренных носителей, добавок, антибиотиков, консервантов, адъювантов, разбавителей и/или стабилизаторов. Такими вспомогательными веществами могут быть вода, физиологический раствор, глицерол, этанол, масло, увлажняющие или эмульгирующие агенты, pH-буферные вещества или подобные им. Подходящие носители обычно представляют собой крупные, медленно метаболизируемые молекулы, такие как белки, полисахариды, полилактоиды, полигликолиды, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты или подобные им.

Для изготовления вакцин рекомбинантный поксвирус, предпочтительно MVA согласно настоящему изобретению, может быть превращен в физиологически приемлемую форму. Это может быть сделано на основе опыта изготовления поксвирусных вакцин, которые применялись для противооспенной вакцинации (как описано Stickl et al., 1974).

Например, очищенный вирус может храниться при -80°C с титром, составляющим 5×10^8 TCID₅₀/мл, в смеси с примерно 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, pH 7,4. Для изготовления вакцины для инъекции можно, например, лиофилизировать 10^2 - 10^8 вирусных частиц в 100 мкл - 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в присутствии 2% пептона и 1% альбумина человека в ампуле, предпочтительно стеклянной ампуле. Кроме того, вакцина для инъекции может производиться путем ступенчатой лиофилизации вируса в лекарственном препарате. Лекарственный препарат может содержать вспомогательные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактоза или поливинилпирролидон или другие добавки, такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, сывороточный альбумин человека), пригодные для введения *in vivo*. Затем стеклянная ампула запаивается, после чего она может храниться при температурах от 4°C до комнатной в течение нескольких месяцев. При этом когда ампула не используется, предпочтительно хранить ее при температурах до -20°C .

В целях вакцинации или лечения лиофилизат может быть растворен в водном растворе, предпочтительно физиологическом растворе или буфере Трис, а затем применяться систематически или местно, т.е. парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или любым другим путем введения, известным квалифицированному специалисту. Способ применения, доза и количество введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области техники в известном порядке. Тем не менее чаще всего при вакцинации млекопитающего, предпочтительно человека, второе введение проводят примерно на вторую-шестую недели после первого введения вакцины. Третье, четвертое и последующие введения чаще всего проводятся примерно на вторую-шестую недели после предыдущего введения.

Настоящее изобретение предлагает способы иммунизации млекопитающих, в том числе человека. В одном варианте реализации изобретения проводится иммунизация млекопитающих, в том числе крыс, кроликов, мышей и людей, включающая введение дозы рекомбинантного MVA млекопитающему, предпочтительно человеку. В одном варианте реализации изобретения первая доза содержит 10^8 TCID₅₀ рекомбинантного вируса MVA, а вторая и дополнительные дозы (т.е. третья, четвертая, пятая и т.д.) содержат 10^8 TCID₅₀ вируса. Введения могут проводиться в первой дозировке (для первичной иммунизации) и второй или дальнейших дозировке(ах) (для реиммунизации).

Иммунизация может быть проведена систематически или местно, т.е. парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или любым другим путем введения, известным квалифицированному специалисту.

CD8 Т-клеточные и гуморальные иммунные реакции.

Иммунизации рекомбинантным MVA, предлагаемым в настоящем изобретении, могут индуцировать устойчивую CD8 Т-клеточную реакцию. В предпочтительных вариантах реализации изобретения после первой, второй, третьей, четвертой, пятой и т.д. иммунизаций рекомбинантный MVA индуцирует у млекопитающего, предпочтительно человека, устойчивую CD8 Т-клеточную реакцию на кодируемый антиген, более интенсивную, чем CD8 Т-клеточная реакция на иммунодоминантную вирусную CD8 Т-клеточную антигенную детерминанту, кодируемую вектором MVA, например, TSYKFESV (SEQ ID NO: 5). В предпочтительном варианте реализации изобретения после первой, второй, третьей, четвертой, пятой и т.д. иммунизаций у млекопитающего, предпочтительно человека, индуцируется иммунодоминантная Т-клеточная реакция на кодируемый антиген. В предпочтительном варианте реализации изобретения после второй, третьей, четвертой, пятой и т.д. иммунизаций рекомбинантный MVA индуцирует у млекопитающего, предпочтительно человека, CD8 Т-клеточную реакцию на кодируемый антиген, затрагивающую по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30 или 35% от общего количества CD8 Т-клеток. В предпочтительном варианте реализации изобретения после второй, третьей, четвертой, пятой и т.д. иммунизации рекомбинантный MVA усиливает CD8 Т-клеточную реакцию на кодируемый антиген у млекопитающего, предпочтительно человека, по меньшей мере в 2, 3, 4, 5 или 10 раз, т.е. от 1 до 2, 3, 4, 5 или 10% от общего количества CD8 Т-клеток), по сравнению с реакцией на кодируемый антиген после однократного введения или усиливает CD8 Т-клеточную реакцию на кодируемый антиген у млекопитающего, предпочтительно человека, по меньшей мере в 2, 3, 4, 5 или 10 раз, по сравнению с Т-клеточной реакцией на вирусный антиген (например, B8R). В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный MVA вызывает CD8 Т-клеточную реакцию на кодируемый антиген у млекопитающего, предпочтительно человека, по меньшей мере в 2, 3, 4, 5 или 10 раз более сильную, чем Т-клеточная реакция на вирусный антиген (например, B8R) после однократного введения. В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения CD8 Т-клеточная реакция на кодируемый антиген у млекопитающего, предпочтительно человека, значительно усиливается вследствие 2, 3, 4 или 5 и т.д. иммунизаций, по сравнению с реакцией на поздний вирусный антиген (например, B8R).

Интенсивность CD8 Т-клеточной реакции может быть определена, например, путем отбора примерно 100-120 мкл крови в FACS/гепариновый буфер. МКПК могут быть получены путем лизиса эритроцитов с помощью лизирующего буфера для ККТ. Затем может быть проведено одновременное окрашивание OVA- и B8R-специфических CD8 Т-клеток в образцах МКПК с помощью анти-CD8 α -FITC, CD44-PerCP-Cy5.5 и декстримеров MHC I класса, образующих комплекс с соответствующими Н-2Кb-связывающими пептидами: SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) или TSYKFESV (SEQ ID NO: 5). Декстример MHC I класса SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) может быть помечен PE, а декстример TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) - APC. Окрашенные клетки могут анализироваться с помощью проточной цитометрии в системе BD Biosciences BD LSR II. Возможно получать по десять тысяч CD8⁺ Т-клеток в каждом образце.

Кроме того, интенсивность CD8 Т-клеточной реакции может быть определена путем отбора крови у иммунизированного млекопитающего, предпочтительно человека, и отделения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Они могут быть ресуспендированы в питательной среде, содержащей 5 мкг/мл брэфелдина А (BFA, "GolgiPlug", BD Biosciences) и 1 мкМ тестируемых пептидов, включая пептиды против иммунодоминантных антигенных детерминант MVA (т.е. TSYKFESV; SEQ ID NO: 5) ("B8R") и пептиды, происходящие от экспрессируемого неоантигена. Затем МКПК можно инкубировать в течение 5 ч при 37°C в 5% CO₂, собирать, ресуспендировать в 3 мл холодного ФСБ/10% ФТС/2 мМ ЭДТК и оставлять на ночь при 4°C. На следующий день МКПК могут быть окрашены антителами анти-CD8 α -Pac-Blue (клон 53-6.7), анти-CD62L-PE-Cy7, анти-CD44-APC-A1exa 750 и анти-CD4-PerCP-Cy5.5 (все антитела от BD Biosciences). МКПК можно инкубировать с указанными антителами в необходимых разведениях в течение 30 мин при 4°C в темноте. После промывки клетки могут быть фиксированы и пермеабелизованы с помощью набора Cytofix/Cytoperm™ Plus (BD Biosciences) согласно инструкциям производителя. После промывки МКПК может быть проведено окрашивание внутриклеточного интерферона- γ (IFN- γ) с помощью FITC-конъюгированного анти-IFN- γ антитела (BD biosciences), разведенного в пермеабелизирующем буфере для отмывки (BD Biosciences). Окрашенные клетки могут анализироваться с помощью проточной цитометрии.

Иммунизации рекомбинантным MVA, предлагаемым в настоящем изобретении, могут индуцировать устойчивую гуморальную иммунную реакцию. Гуморальные иммунные реакции могут быть оценены с помощью твердофазного ИФА.

В рамках настоящего изобретения "устойчивая CD8 Т-клеточная реакция" подразумевает больший процент неоантиген-специфических CD8 Т-клеток, чем процент, который наблюдается для такого же MVA-конструкта, содержащего промотор PrS (5' AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAAATATAA 3'; SEQ ID NO: 6), после однократной иммунизации. В некоторых вариантах реализации изобретения при CD8 Т-клеточной реакции наблюдается по меньшей мере в 1,5 или 2 раза больше неоантиген-специфических CD8 Т-клеток, чем для такого же MVA-конструкта, содержащего промотор PrS (SEQ ID NO: 6), после однократной иммунизации.

В рамках настоящего изобретения "устойчивая гуморальная иммунная реакция" подразумевает титр антител, более высокий, чем титр антител, наблюдаемый для такого же MVA-конструкта, содержащего промотор PrS (SEQ ID NO: 6), после однократной иммунизации. В некоторых вариантах реализации изобретения титр антител по меньшей мере в 1,5 или 2 раза больше, чем титр антител, наблюдаемый для такого же MVA-конструкта, содержащего промотор PrS (SEQ ID NO: 6), после однократной иммунизации.

Тип индуцируемой рекомбинантным MVA реакции на неоантиген - "устойчивая CD8 Т-клеточная реакция" или "устойчивая гуморальная иммунная реакция" - может быть определен, как описано ниже в примерах. Например, как MVA13.5 short, так и MVA13.5 long индуцируют "устойчивую CD8 Т-клеточную реакцию", как определено в настоящем документе. MVA13.5 long индуцирует "устойчивую гуморальную иммунную реакцию", как определено в настоящем документе.

Несмотря на то что способ предпочтительно включает однократное введение вектора, в некоторых вариантах реализации изобретения могут проводиться две, три, четыре, пять, шесть, семь или более иммунизаций млекопитающего, предпочтительно человека, рекомбинантным MVA.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения кодируемый антиген представляет собой бактериальный, вирусный или опухолевый антиген. В предпочтительном варианте реализации изобретения антиген является чужеродным антигеном для млекопитающего, в том числе человека.

Примеры

Пример 1. Конструирование MVA-рекомбинантов.

Клетки HeLa инфицировали MVA-BN при множественности заражения (MOI), составляющей 10 (10 TCID₅₀ на клетку), а на 2- и 8-й час от начала инфекции получали тотальную РНК. Синтезировали специфические праймеры к различным ORF MVA и проводили ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (FirstChoice® RLM-RACE Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) для получения ПЦР-продуктов, соответствующих РНК MVA, кодирующим эти ORF. ПЦР-продукты были секвенированы для определения сайтов инициации транскрипции. Исходя из этих данных были определены промоторы для транскрипции РНК, кодирующих эти ORF. В MVA-конструкты были вставлены промоторы MVA для следующих ORF (Baur et al., Journal of Virology, vol. 84, (17): 8743-8752 (2010)) для контроля экспрессии гена овальбумина (OVA): MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) и MVA170R (B3R; WR 185).

Пример 2. Промоторзависимые уровни экспрессии РНК in vitro.

Инфицирование клеток HeLa рекомбинантными вирусами MVA при MOI, составляющей 10, производилось с помощью прикрепления вирусов на льду в течение 1 ч. После прикрепления клетки промывали и собирали в нулевой момент времени (0 ч) или инкубировали при 37°C для сбора в другие моменты времени. Пробы отбирали на 0,5, 1, 2, 4 и 8 ч от начала инфекции. Клетки гомогенизировали, и экстрагировали тотальную РНК. РНК подвергали ДНКазному расщеплению, после чего с помощью олиго(dT)-праймирования была синтезирована кДНК. Полученные образцы кДНК использовались в качестве матрицы для одновременной амплификации кДНК OVA и актина с помощью Taqman-qPCR. Реакцию проводили в цикле AB7500 от Applied Biosystem. Результаты представлены на фиг. 3.

Пример 3. Промоторзависимые уровни белковой экспрессии in vitro.

Клетки HeLa культивировали в DMEM с добавлением 10% ФТС. Клетки HeLa инфицировали при MOI рекомбинантного вируса MVA, составляющей 10 (10 TCID₅₀ на клетку). Инфицированные клетки отбирали на 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч от начала инфекции, фиксировали и пермеабилizировали. В половине клеток каждого образца проводили окрашивание белка OVA с помощью антител кролика к OVA цыпленка, а в другой половине проводили окрашивание антигенов MVA с помощью поликлональных антител кролика к VACV. Образцы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD Biosciences) и программного обеспечения FlowJo. Результаты представлены на фиг. 4.

Пример 4. Иммунизации и забор крови у мышей.

В этом исследовании использовались группы мышей (C57/B16). В каждой группе проводили суммарно три иммунизации.

В качестве контроля иммунных реакций использовали ФСБ-инъецированную группу. Для оценки иммунных реакций в течение исследования отбирали кровь из хвостовой вены.

Мышей иммунизировали интраперитонеально при 10⁸ TCID₅₀ соответствующих вирусов MVA в растворе ФСБ (300 мкл, общий объем) на 0, 4 и 8 недели. Заборы крови для анализа Т-клеток проводили на первую неделю после каждой иммунизации, а заборы крови для анализа антител - на третью неделю после каждой иммунизации.

Пример 5. Окрашивание Т-клеток и определение антител.

У каждой мыши отбирали примерно 100-120 мкл крови в FACS/гепариновый буфер. МКПК получали путем лизиса эритроцитов с помощью лизирующего буфера для ККТ. Затем проводили одновременное окрашивание OVA- и B8R-специфических CD8 Т-клеток в образцах МКПК с помощью анти-CD8α-FITC, CD44-PerCPCy5.5 и декстримеров МНС I класса, образующих комплекс с соответствующими Н-2Кб-связывающими пептидами: SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) или TSYKFESV (SEQ ID NO: 5). Декстример МНС I класса SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) был помечен PE, а декстример TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) -

APC. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии в системе BD Biosciences BD LSR II. Получали по десять тысяч CD8⁺ Т-клеток в каждом образце. Результаты представлены на фиг. 5, 6.

Получали сыворотку из цельной крови. Для определения специфических антител проводили твердофазный ИФА овалбумина и твердофазный ИФА MVA (набор Serazym от Seramun Diagnostika GmbH, Heidesee, Germany). Результаты представлены на фиг. 7.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) для индукции мощного CD8 Т-клеточного ответа на неоантиген у человека, включающее проведение одного или более введений человеку указанного рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA),

причем рекомбинантный MVA содержит промотор Pr13.5, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей неоантиген,

причем промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере 1 копию второй нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 31 нуклеотида, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, и

причем указанный промотор генерирует по меньшей мере в 1,5 раза больше неоантиген-специфических CD8 Т-клеток, чем генерируется с соответствующим MVA-конструктом, в котором промотор заменен промотором PrS, определяемым SEQ ID NO: 6, после однократной иммунизации.

2. Применение по п.1, в котором промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 2 копии последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 1.

3. Применение по пп.1, 2, в котором промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 2 копии последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей 100% идентичности с SEQ ID NO: 1.

4. Применение по п.1, в котором промотор Pr13.5 содержит 2 копии нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 1.

5. Применение по п.1, в котором промотор Pr13.5 содержит нуклеотиды 15878-15755, показанные на фиг. 1.

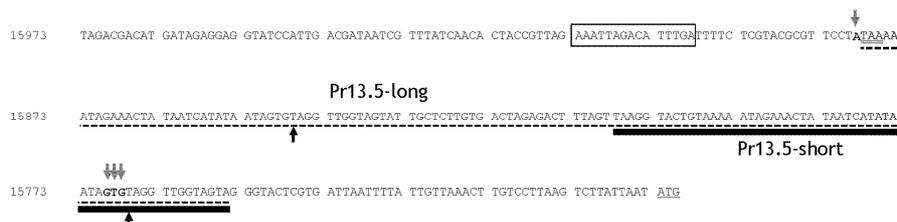
6. Рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий промотор Pr13.5, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей неоантиген, в котором промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 1 копию последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере 1 копию второй нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 31 нуклеотида, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, причем указанный промотор генерирует по меньшей мере в 1,5 раза больше неоантиген-специфических CD8 Т-клеток, чем генерируется с соответствующим MVA-конструктом, в котором промотор заменен промотором PrS, определяемым SEQ ID NO: 6, после однократной иммунизации.

7. Рекомбинантный MVA по п.6, в котором промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 2 копии последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 1.

8. Рекомбинантный MVA по пп.6, 7, в котором промотор Pr13.5 содержит по меньшей мере 2 копии последовательности нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, имеющей 100% идентичности с SEQ ID NO: 1.

9. Рекомбинантный MVA по п.6, в котором промотор Pr13.5 содержит 2 копии нуклеотидной последовательности, состоящей из по меньшей мере 40 оснований, которая имеет 100% идентичности с SEQ ID NO: 1.

10. Рекомбинантный MVA по п.6, в котором промотор Pr13.5 содержит нуклеотиды 15878-15755, показанные на фиг. 1.



Фиг. 1

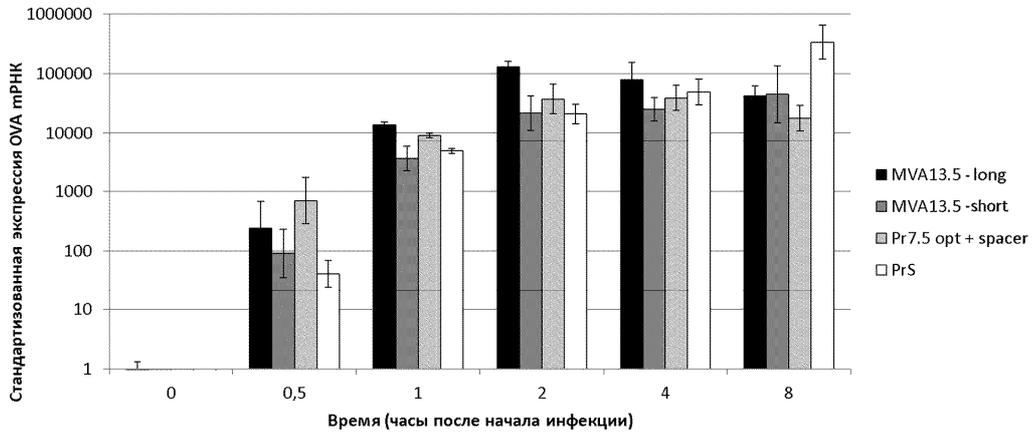
15973 TAGACGACAT GATAGAGGAG GTATCCATTG ACGATAATCG TTTATCAACA CТАСCGTTAG AAATTAGACA TTTGATTTTC TCGTACGGGT TCCT: AAAA

15873 ATAGAACTA TAATCATATA ATAGTGAGG TTGGTAGT TGCTCTGTG ACTAGAGACT TTAGT TAAGG TACTG AAAA ATAGAACTA TAATCATATA

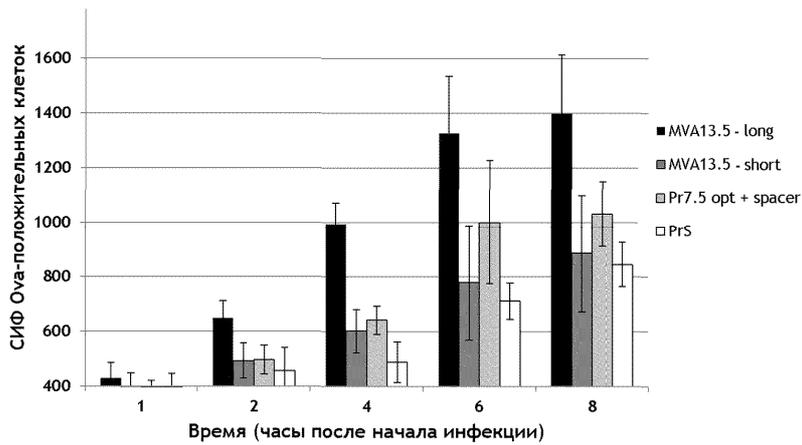
Pr13.5-long Pr13.5-short

15773 ATAGTGAGG TTGGTAGT GGTACTOGTG ATTAATTTTA TTGTTAAACT TGTCCSTAAG TCTTATTAAT ATG

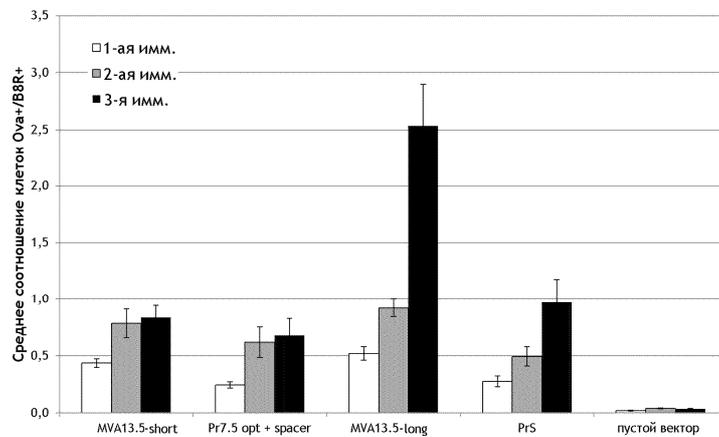
Фиг. 2



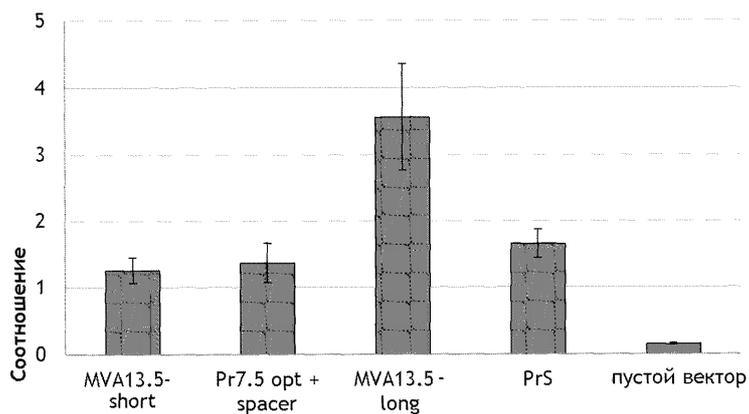
Фиг. 3



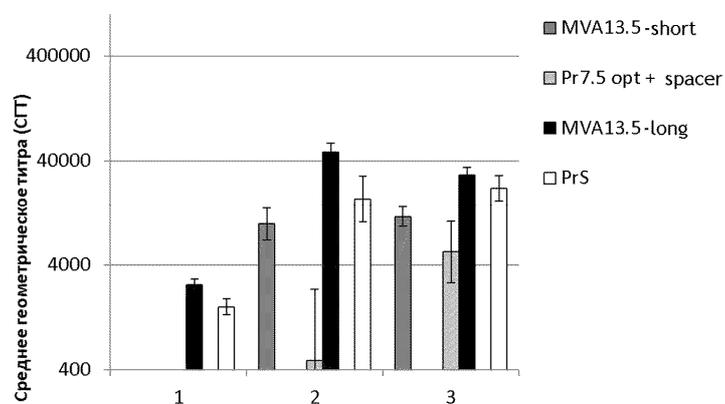
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А

Промотор	Соотношение СТТ в сравнении с PrS		
	1 ^{ая} иммунизация	2 ^{ая} иммунизация	3 ^я иммунизация
PrS	1,0	1,0	1,0
Pr13.5-short	0,1	0,6	0,5
Pr13.5-long	1,6	2,8	1,3
Pr7.5 opt + spacer	0,0	0,0	0,2
MVA50L + PrSSL	0,1	0,2	0,1
MVA170 + PrSSL	0,0	0,8	0,5

Фиг. 7В

045254

Исходная посл.		ТАААААТГААААСТАТААТСАТАТААТГАТГАГТТGGTAGTA	44
<u>383866716</u>	20492	20449
<u>383866716</u>	20410	20369
<u>373449558</u>	15874	15831
<u>373449558</u>	15954	15911
<u>373449318</u>	15878	15835
<u>373449318</u>	15958	15915
<u>373449318</u>	182742	182785
<u>373449318</u>	182822	182865
<u>373449076</u>	15864	15821
<u>373449076</u>	15944	15901
<u>373449076</u>	182666	182709
<u>373449076</u>	182746	182789
<u>373448847</u>	15961	15918
<u>373448847</u>	16041	15998
<u>373448604</u>	15956	15913
<u>373448604</u>	16036	15993
<u>373448604</u>	182785	182828
<u>373448604</u>	182865	182908
<u>373448367</u>	15865	15822
<u>373448367</u>	15945	15902
<u>373448367</u>	182603	182646
<u>373448367</u>	182683	182726
<u>373448133</u>	15832	15789
<u>373448133</u>	15912	15869
<u>373447891</u>	15957	15914
<u>373447891</u>	16037	15994
<u>373447891</u>	182788	182831
<u>373447891</u>	182868	182911
<u>373447653</u>	15866	15823
<u>373447653</u>	15946	15903
<u>373447653</u>	182609	182652
<u>373447653</u>	182689	182732
<u>373447414</u>	15833	15790
<u>373447414</u>	15913	15870
<u>373447414</u>	182552	182595
<u>373447414</u>	182632	182675
<u>373447175</u>	15860	15817
<u>373447175</u>	15940	15897
<u>373447175</u>	182579	182622
<u>373447175</u>	182659	182702
<u>325558812</u>	28969	28926
<u>325558812</u>	28889T.....	28847
<u>325558595</u>	30006	29963
<u>325558595</u>	29924	29884
<u>325558381</u>	27900	27857
<u>325558381</u>	27817C.....	27777
<u>325558165</u>	30228	30185
<u>325558165</u>	30148T.....	30106
<u>325557951</u>	27554	27511
<u>325557951</u>	27472C.....	27432
<u>167412463</u>	12323	12280
<u>167412463</u>	12403	12360

Фиг. 8А

045254

<u>160857876</u>	13468	13425
<u>160857876</u>	13548	13505
<u>149786253</u>	9445	9402
<u>149786253</u>	9525	9482
<u>119352440</u>	15780	15737
<u>119352440</u>	15860	15817
<u>90819652</u>	18373	18330
<u>90819652</u>	18453	18410
<u>115607420</u>	9159	9116
<u>115607420</u>	9239	9196
<u>115607419</u>	9159	9116
<u>115607419</u>	9239	9196
<u>115607418</u>	9359	9316
<u>115607418</u>	9439	9396
<u>115607417</u>	9359	9316
<u>115607417</u>	9439	9396
<u>111184167</u>	24167	24124
<u>111184167</u>	24247T.....	24204
<u>109726482</u>	7441	7398
<u>109726482</u>	7517	7474
<u>109726279</u>	7443	7400
<u>109726279</u>	7519	7476
<u>109726076</u>	7652	7609
<u>109726076</u>	7728	7685
<u>109725872</u>	7441	7398
<u>109725872</u>	7517	7474
<u>109725689</u>	7441	7398
<u>109725669</u>	7517	7474
<u>109725465</u>	7441	7398
<u>109725465</u>	7517	7474
<u>109725262</u>	7511	7468
<u>109725262</u>	7587	7544
<u>109725056</u>	7650	7607
<u>109725056</u>	7726	7683
<u>109724854</u>	7371	7328
<u>109724854</u>	7447	7404
<u>109724650</u>	7785	7742
<u>109724650</u>	7861	7818
<u>109724445</u>	7649	7606
<u>109724445</u>	7725	7682
<u>109724243</u>	7579	7536
<u>109724243</u>	7655	7612
<u>109724039</u>	7441	7398
<u>109724039</u>	7517	7474
<u>94489104</u>	7441	7398
<u>94489104</u>	7517	7474
<u>94489896</u>	7422	7379
<u>94489896</u>	7498	7455
<u>94489695</u>	7441	7398
<u>94489695</u>	7517	7474
<u>94489496</u>	7441	7398
<u>94489496</u>	7517	7474

Фиг. 8В

045254

<u>94489293</u>	7372	7329
<u>94489293</u>	7448	7405
<u>94489094</u>	7581	7538
<u>94489094</u>	7657	7614
<u>94488894</u>	7443	7400
<u>94488894</u>	7519	7476
<u>94488693</u>	7722	7679
<u>94488693</u>	7798	7755
<u>94488492</u>	7653	7610
<u>94488492</u>	7729	7686
<u>94488292</u>	6666	6623
<u>94488292</u>	6742	6699
<u>94488092</u>	6666	6623
<u>94488092</u>	6742	6699
<u>94487887</u>	7441	7398
<u>94487887</u>	7517	7474
<u>94487685</u>	7444	7401
<u>94487685</u>	7520	7477
<u>94487484</u>	7443	7400
<u>94487484</u>	7519	7476
<u>94487278</u>	7449	7406
<u>94487278</u>	7373 A	7330
<u>94487078</u>	7442	7399
<u>94487078</u>	7518	7475
<u>94486875</u>	7579	7536
<u>94486875</u>	7655	7612
<u>94486673</u>	7430	7387
<u>94486673</u>	7507	7463
		\	
		A	
<u>94486471</u>	7431	7388
<u>94486471</u>	7508	7464
		\	
		A	
<u>94486268</u>	7442	7399
<u>94486268</u>	7519	7475
		\	
		A	
<u>94486065</u>	7442	7399
<u>94486065</u>	7519	7475
		\	
		A	
<u>94485863</u>	7441	7398
<u>94485863</u>	7517	7474
<u>94485659</u>	7441	7398
<u>94485659</u>	7517	7474
<u>94485457</u>	7863	7820
<u>94485457</u>	7939	7896

Фиг. 8С

045254

<u>94485254</u>	7863	7820
<u>94485254</u>	7939	7896
<u>94485053</u>	7648	7605
<u>94485053</u>	7724	7681
<u>94484855</u>	7648	7605
<u>94484855</u>	7724	7681
<u>94484657</u>	7648	7605
<u>94484657</u>	7724	7681
<u>94484460</u>	7648	7605
<u>94484460</u>	7724	7681
<u>94484252</u>	7422	7379
<u>94484252</u>	7498	7455
<u>94484050</u>	7450	7407
<u>94484050</u>	7526	7483
<u>94483847</u>	7450	7407
<u>94483847</u>	7526	7483
<u>94483641</u>	7510	7467
<u>94483641</u>	7586	7543
<u>90660453</u>	12795	12752
<u>90660453</u>	12719-.....T.....	12677
<u>90660233</u>	28919	28876
<u>90660233</u>	28837	28797
<u>38348858</u>	16052	16009
<u>38348858</u>	16132	16089
<u>38348858</u>	182942	182985
<u>38348858</u>	183022	183065
<u>37551435</u>	16065	16022
<u>37551435</u>	16145	16102
<u>88900616</u>	18618	18575
<u>88900616</u>	18698	18655
<u>88900616</u>	185511	185554
<u>88900616</u>	185591	185634
<u>44971363</u>	17722	17679
<u>44971363</u>	17802	17759
<u>47088326</u>	10008	9965
<u>47088326</u>	10088	10045
<u>56713341</u>	15689	15646
<u>56713341</u>	15769	15726
<u>56713625</u>	15689	15646
<u>56713625</u>	15769	15726
<u>56713624</u>	15612	15569
<u>56713624</u>	15692	15649
<u>18482913</u>	15989	15946
<u>18482913</u>	15911T.....	15869
<u>22123748</u>	22960-G.....	22917
<u>22123748</u>	22878	22837
<u>19717929</u>	14304	14261
<u>19717929</u>	14226T.....	14184
<u>2772662</u>	15798	15755
<u>2772662</u>	15878	15835
<u>29692106</u>	13086	13043
<u>29692106</u>	13166	13123

Фиг. 8D

045254

<u>5830555</u>	6996	6953
<u>5830555</u>	7072	7029
<u>885796</u>	7223	7180
<u>885796</u>	7299	7256
<u>885724</u>	6996	6953
<u>885724</u>	7072	7029
<u>885686</u>	7012	6969
<u>885686</u>	7088	7045
<u>456758</u>	6964	6921
<u>456758</u>	7040	6997
<u>6969640</u>	12632	12589
<u>6969640</u>	12712	12669
<u>623595</u>	7664	7621
<u>623595</u>	7740	7697
<u>335691</u>	3950	3907
<u>335691</u>	4030	3987
<u>335317</u>	16234	16191
<u>335317</u>	16154	16119
<u>325559026</u>	27934A.....	27891
<u>325559026</u>	27854	27813
<u>325514012</u>	27520C.....	27477
<u>325514012</u>	27600	27559
<u>325559238</u>	28458	28418
<u>325559238</u>	28540A.....	28500
<u>30795158</u>	29579	29539
<u>30795158</u>	29661A.....	29621
<u>325557737</u>	28302C.....	28260
<u>325557737</u>	28382	28343
<u>68449479</u>	15249C.....	15206
<u>68449479</u>	15169	15154
<u>68449280</u>	15746C.....	15703
<u>68449280</u>	15666	15651
<u>68448677</u>	15249C.....	15206
<u>68448677</u>	15169	15154
<u>59858806</u>	15322C.....	15279
<u>59858806</u>	15242	15227
<u>58220470</u>	14913C.....	14870
<u>58220470</u>	14833	14818
<u>51342166</u>	15076C.....	15033
<u>51342166</u>	14996	14981
<u>30519405</u>	29201C.....	29159
<u>30519405</u>	29282	29243
<u>323098609</u>	13319	13289
<u>323098609</u>	13398-.....	13356
<u>323098410</u>	13348	13318
<u>323098410</u>	13427-.....	13385
<u>300872625</u>	13482	13452
<u>300872625</u>	13561-.....	13519
<u>56236951</u>	7856	7826
<u>56236951</u>	7935-.....	7893
<u>68449077</u>	13480	13450
<u>68449077</u>	13559-.....	13517

Фиг. 8Е

<u>68448876</u>	13500	13470
<u>68448876</u>	13579-.....	13537
<u>17529780</u>	13356	13326
<u>17529780</u>	13435-.....	13393

Фиг. 8F

gi 383866716 JQ410350.1	Вирус оспы мышей из коллекции АКТК:VR-1431, полный геном
gi 373449558 JN654986.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP21, полный геном
gi 373449318 JN654985.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP20, полный геном
gi 373449076 JN654984.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP19, полный геном
gi 373448847 JN654983.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP17, полный геном
gi 373448604 JN654982.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP16, полный геном
gi 373448367 JN654981.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP15, полный геном
gi 373448133 JN654980.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP13, полный геном
gi 373447891 JN654979.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP12, полный геном
gi 373447653 JN654978.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP11, полный геном
gi 373447414 JN654977.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP10, полный геном
gi 373447175 JN654976.1	Штамм вируса осповакцины Druvax, клон DPP9, полный геном
gi 325558812 HQ420897.1	Вирус оспы коров Germany_2002_MKY, полный геном
gi 325558595 HQ420897.1	Вирус оспы коров Germany_1998_2, полный геном
gi 325558381 HQ420896.1	Вирус оспы коров Germany_1990_2, полный геном
gi 325558165 HQ420895.1	Вирус оспы коров Germany_1980_EP4, полный геном
gi 325557951 HQ420894.1	Вирус оспы коров France_2001_Nancy, полный геном
gi 167412463 EU410304.1	Вирус осповакцины GLV-1h68, полный геном
gi 160857876 AM501482.1	Вирус осповакцины Анкара, хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара (CVA), экзом
gi 149786253 EF675191.1	Штамм вируса осповакцины MVATGN33.1, модифицированный вирус Анкара, полный геном
gi 119352440 DQ121394.1	Штамм вируса осповакцины Lister, клон VACV107, полный геном
gi 90819652 DQ439815.1	Штамм вируса осповакцины DUKE, полный геном
gi 115607420 DQ983239.1	Штамм вируса осповакцины AGR-MVA-572, прегеномная последовательность
gi 115607419 DQ983238.1	Штамм вируса осповакцины MVA-BN, геномная последовательность
gi 115607418 DQ983237.1	Штамм вируса осповакцины MVA-572, геномная последовательность
gi 115607417 DQ983236.1	Штамм вируса осповакцины MVA-I721, геномная последовательность
gi 111184167 DQ792504.1	Изолят вируса оспы лошадей MNR-76, полный геном
gi 109726482 DQ437592.1	Штамм вируса натуральной оспы Syria 1972 V72-199, полный геном
gi 109726279 DQ437591.1	Штамм вируса натуральной оспы Sumatra 1970 V70-222, полный геном
gi 109726076 DQ437590.1	Штамм вируса натуральной оспы Somalia 1977, полный геном
gi 109725872 DQ437589.1	Штамм вируса натуральной оспы Pakistan 1969 (Rafiq Lahore), полная последовательность
gi 109725669 DQ437588.1	Штамм вируса натуральной оспы Nepal 1973, полный геном
gi 109725465 DQ437587.1	Штамм вируса натуральной оспы Iran 1972 2602 Tabriz, полный геном
gi 109725262 DQ437586.1	Штамм вируса натуральной оспы India 1964 7125 Vellore, полный геном

Фиг. 9А

gi109725056 DQ437585.1	Штамм вируса натуральной оспы India 1964 7124 Vellore, полный геном
gi109724854 DQ437584.1	Штамм вируса натуральной оспы Germany 1958 Heidelberg, полный геном
gi109724650 DQ437583.1	Штамм вируса натуральной оспы Congo 1970, полный геном
gi109724445 DQ437582.1	Штамм вируса натуральной оспы China Horn 1948, полный геном
gi109724243 DQ437581.1	Штамм вируса натуральной оспы Bangladesh 1975 v75-550 Banu, полный геном
gi109724039 DQ437580.1	Штамм вируса натуральной оспы Afghanistan 1970 Variolator 4, полный геном
gi94490104 DQ441448.1	Штамм вируса натуральной оспы Yugoslavia 1972 V72-164, полный геном
gi94489896 DQ441447.1	Штамм вируса натуральной оспы United Kingdom 1952 Butler, полный геном
gi94489695 DQ441446.1	Штамм вируса натуральной оспы United Kingdom 1947 Higgins (Staffordshire), полный геном
gi94489496 DQ441445.1	Штамм вируса натуральной оспы United Kingdom 1946 Hinden (Middlesex), полный геном
gi94489293 DQ441444.1	Штамм вируса натуральной оспы United Kingdom 1946 Harvey, полный геном
gi94489094 DQ441443.1	Штамм вируса натуральной оспы Tanzania 1965 kembula, полный геном
gi94488894 DQ441442.1	Штамм вируса натуральной оспы Sumatra 1970 V70-228, полный геном
gi94488693 DQ441441.1	Штамм вируса натуральной оспы Sudan 1947 (Rumbec), полный геном
gi94488492 DQ441440.1	Штамм вируса натуральной оспы Sudan 1947 (Juba), полный геном
gi94488292 DQ441439.1	Штамм вируса натуральной оспы Somalia 1977 (V77-1605), полный геном
gi94488092 DQ441438.1	Штамм вируса натуральной оспы Somalia 1977 (V77-1252), полный геном
gi94487887 DQ441437.1	Штамм вируса натуральной оспы Sierra Leone 1969 (V68-258), полный геном
gi94487685 DQ441436.1	Штамм вируса натуральной оспы South Africa 1965 (103 T'vaal, Nelspruit), полный геном
gi94487484 DQ441435.1	Штамм вируса натуральной оспы South Africa 1965 (102 Natal, Ingwavuma), полный геном
gi94487278 DQ441434.1	Штамм вируса натуральной оспы Niger 1969 (001, importation from Nigeria), полный геном
gi94487078 DQ441433.1	Штамм вируса натуральной оспы Kuwait 1967 (K1629), полный геном
gi94486875 DQ441432.1	Штамм вируса натуральной оспы Korea 1947 (Lee, Masterseed), полный геном
gi94486673 DQ441431.1	Штамм вируса натуральной оспы Japan 1951 (Stillwell, Masterseed), полный геном
gi94486471 DQ441430.1	Штамм вируса натуральной оспы Japan 1951 (Harper, Masterseed), полный геном
gi94486268 DQ441429.1	Штамм вируса натуральной оспы Japan 1946 (Yamada MS-2(A) Tokyo), полный геном
gi94486065 DQ441428.1	Штамм вируса натуральной оспы India 1953 (New Delhi), полный геном
gi94485863 DQ441427.1	Штамм вируса натуральной оспы India 1953 (Kali-Muthu-M50 Madras), полный геном

Фиг. 9В

gi94485659 DQ441426.1	Штамм вируса натуральной оспы Guinea 1969 (005), полный геном
gi94485457 DQ441425.1	Штамм вируса натуральной оспы Ethiopia 1972 (Eth17 R14-1X-72 Addis), полный геном
gi94485254 DQ441424.1	Штамм вируса натуральной оспы Ethiopia 1972 (Eth16 R14-1X-72 Addis), полный геном
gi94485053 DQ441423.1	Штамм вируса натуральной оспы Congo 9 1970 (v74-227 Gispem), полный геном
gi94484855 DQ441422.1	Штамм вируса натуральной оспы Bangladesh 1974 (Solaiman), полный геном
gi94484657 DQ441421.1	Штамм вируса натуральной оспы Bangladesh 1974 (Shahzaman), полный геном
gi94484460 DQ441420.1	Штамм вируса натуральной оспы Bangladesh 1974 (nur islam), полный геном
gi94484252 DQ441419.1	Штамм вируса натуральной оспы Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo), полный геном
gi94484050 DQ441418.1	Штамм вируса натуральной оспы Botswana 1973 (v73-225), полный геном
gi94483847 DQ441417.1	Штамм вируса натуральной оспы Botswana 1972 (v72-143), полный геном
gi94483641 DQ441416.1	Штамм вируса натуральной оспы Benin, Dahomey 1968 (v68-59), полный геном
gi90660453 DQ437594.1	Вирус оспы гололапых песчанок, штамм Dahomey 1968, полный геном
gi90660233 DQ437593.1	Вирус оспы коров Germanu 91-3, полный геном
gi38348858 AY313847.1	Штамм вируса осповакцины Acambis, клон 2000, полный геном
gi37551435 AY313848.1	Штамм вируса осповакцины Acambis, клон 3, полный геном
gi88900616 DQ377945.1	Штамм вируса осповакцины 3737, полный геном
gi44971363 AY484669.1	Вирус оспы кроликов, полный геном
gi47088326 AY603355.1	Штамм вируса осповакцины Acambis 3000, модифицированный вирус Анкара (MVA), полный геном
gi56713341 AY678275.1	Штамм вируса осповакцины LC16m8, полный геном
gi56713625 AY678277.1	Штамм вируса осповакцины LC16mO, полный геном
gi56713624 AY678276.1	Штамм вируса осповакцины Lister, полный геном
gi18482913 AF438165.1	Вирус оспы верблюдов M-96 Kazakhstan, полный геном
gi22123748 AF012825.2	Штамм вируса оспы мышей Moscow, полный геном
gi19717929 AY009089.1	Вирус оспы верблюдов CMS, полный геном
gi2772662 U94848.1	Штамм вируса осповакцины Анкара, полная геномная последовательность
gi29692106 AY243312.1	Вирус осповакцины WR, полный геном
gi5830555 Y16780.1	Вирус малой оспы, полный геном
gi885796 U18340.1	Вирус натуральной оспы Somalia-1977, левый вариабельный участок
gi885724 U18338.1	Вирус натуральной оспы Garcia-1966, левый околотерминальный участок
gi885686 U18337.1	Вирус натуральной оспы Congo-1965, левый околотерминальный участок
gi456758 X69198.1	Вирус натуральной оспы DNA, полный геном
gi6969640 AF095689.1	Вирус осповакцины (штамм Tian Tan), полный геном
gi623595 L22579.1	Вирус большой оспы (штамм Bangladesh-1975), полный геном

Фиг. 9C

gi335691 M22812.1	Вирус осповакцины, геном, левый участок
gi335317 M35027.1	Вирус осповакцины Copenhagen, полный геном
gi325559026 HQ420899.1	Вирус оспы коров Norway_1994_MAN, полный геном
gi325514012 HQ407377.1	Вирус оспы коров Austria 1999, полный геном
gi325559238 HQ420900.1	Вирус оспы коров UK2000_K2984, полный геном
gi30795158 AF482758.2	Вирус оспы коров Brighton Red, полный геном
gi32555773 HQ420893.1	Вирус оспы коров Finland_2000_MAN, полный геном
gi68449479 DQ011157.1	Штамм вируса оспы обезьян USA_2003_039, полный геном
gi68449280 DQ011156.1	Штамм вируса оспы обезьян Liberia_1970_184, полный геном
gi68448677 DQ011153.1	Штамм вируса оспы обезьян USA_2003_044, полный геном
gi59858806 AY753185.1	Штамм вируса оспы обезьян COP-58, полный геном
gi58220470 AY741551.1	Изолят вируса оспы обезьян Sierra Leone, полный геном
gi51342166 AY603973.1	Штамм вируса оспы обезьян MPXV-WR AIR7-61, полный геном
gi30519405 X94355.2	Вирус оспы коров GRI-90, полный геном
gi323098609 HQ857563.1	Штамм вируса оспы обезьян D14L knockout, полный геном
gi323098410 HQ857562.1	Штамм вируса оспы обезьян V79-I-005, полный геном
gi300872625 HM172544.1	Штамм вируса оспы обезьян Zaire 1979-005, полный геном
gi56236951 AY743598.1	Штамм вируса оспы обезьян Congo-8, частичная последовательность
gi68449077 DQ011155.1	Штамм вируса оспы обезьян Zaire_1979-005, полный геном
gi68448876 DQ011154.1	Штамм вируса оспы обезьян Congo_2003_358, полный геном
gi17529780 AF380138.1	Штамм вируса оспы обезьян Zaire-96-I-16, полный геном

Фиг. 9D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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