

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044315**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.16**(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)(21) Номер заявки  
**201890042**(22) Дата подачи заявки  
**2016.06.15**


---

**(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ЯЩУРА (ВЯ) НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ АНКАРА (MVA)**


---

(31) **62/175,738**(32) **2015.06.15**(33) **US**(43) **2018.05.31**(86) **PCT/EP2016/063691**(87) **WO 2016/202828 2016.12.22**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАВАРИАН НОРДИК А/С (DK)**(72) Изобретатель:  
**Штайгервальд Робин, Калла Маркус (DE)**(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-03097846**  
BERINSTEIN A. ET AL. "Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 18, no. 21, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 2231-2238, XP004191006, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00561-7, abstract, Discussion  
POLACEK C. ET AL. "Low levels of foot-and-mouth disease virus 3C protease expression are required to achieve optimal capsid protein expression

and processing in mammalian cells", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 94, no. Part 6, 1 June 2013, (2013-06-01), pages 1249-1258, XP002754915, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/VIR.0.050492-0, [retrieved on 2013-01-30], abstract, Discussion

**WO-A2-0242480**

GRUBMAN M.J. ET AL. "PROSPECTS, INCLUDING TIME-FRAMES, FOR IMPROVED FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINES", REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE - OFFICE INTERNATIONAL DESPIZOOTIES/SCIENTIFIC AND TECHNICAL REVIEW - INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS, INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS = OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, FR, vol. 21, no. 3, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 589-600, XP009046280, ISSN: 0253-1933, the whole document

T.R. SWEENEY ET AL. "Structural and Mutagenic Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Reveals the Role of the -Ribbon in Proteolysis", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 81, no. 1, 25 October 2006 (2006-10-25), pages 115-124, XP055298536, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01587-06, the whole document, In particular, Table 2

(57) Изобретение относится к модифицированным поксвирусным векторам и к способам их получения и применения. В частности, изобретение относится к вакцине против инфекции ВЯ на основе рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (на основе MVA) и связанным продуктам, способам и применению. Конкретно, изобретение относится к генно-модифицированным (рекомбинантным) векторам MVA, содержащим по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту белка ВЯ. Кроме того, изобретение относится к продуктам, способам и их применению, например, подходящим для индукции у пациента защитного иммунного ответа.

**B1****044315****044315 B1**

Изобретение было сделано при правительственной поддержке в соответствии с HSHQDC-12-C-00051, выданным Управлением материально-технического обеспечения и логистики Министерства национальной безопасности США. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

#### **Область техники**

Изобретение относится к усовершенствованной вакцине против ВЯ, содержащей вакцину против инфекции ВЯ на основе рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (на основе MVA), и связанным с ней продуктам, способам и применению. В частности, настоящее изобретение относится к генно-модифицированным (рекомбинантным) векторам MVA, содержащим гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту белка ВЯ. Кроме того, изобретение относится к продуктам, способам и их применению, например, подходящим для индукции у пациента защитного иммунного ответа.

#### **Уровень техники**

Ящур (Я) является одним из наиболее опасных и контактиозных заболеваний, поражающих сельскохозяйственных животных. Это заболевание является эндемичным для многих стран мира, особенно в Африке, Азии и Южной Америке. Кроме того, периодически могут возникать эпидемические вспышки. Присутствие этого заболевания в стране может иметь очень серьезные экономические последствия в результате снижения производительности, снижения массы тела и производства молока инфицированными стадами и торговых эмбарго, введенных в отношении таких стран. Меры, принимаемые в отношении этого заболевания, включают строгие ограничения на импорт, контроль гигиены и карантин, забой больных животных и программы осповакцины с применением инактивированных вакцин в качестве профилактической меры на национальном или региональном уровне, или периодически, когда происходит эпидемическая вспышка.

Я характеризуется коротким инкубационным периодом, его чрезвычайно контактиозной природой, образованием язв во рту и на лапах, а иногда и гибелью молодых животных. Я поражает ряд видов животных, в частности крупный рогатый скот, свиней, овец и коз. Агентом, ответственным за это заболевание, является содержащий рибонуклеиновую кислоту (РНК) вирус, принадлежащий к роду *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae* (Cooper et al., *Intervirology*, 1978, 10, 165-180). В настоящее время известно по меньшей мере семь типов вируса ящура (ВЯ): европейские типы (А, О и С), африканские типы (SAT1, SAT2 и SAT3) и азиатский тип (Asia 1). Дополнительно были отмечены многочисленные подтипы (Kleid et al. *Science* (1981), 214, 1 125-1 129).

ВЯ представляет собой "раздетый" икосаэдрический вирус диаметром около 25 нм, содержащий однонитевую молекулу РНК, состоящую из около 8500 нуклеотидов, с положительной полярностью. Эта молекула РНК содержит единственную открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую один полипептид, содержащий, среди прочего, прекурсор капсида, также известный как белок Р1 или Р88. Белок Р1 миристилирован на амино-конце. Во время процесса созревания белок Р1 расщепляется протеазой 3С на три белка, известные как VP0, VP1 и VP3 (или 1АВ, 1D и 1С, соответственно; Belsham G. J., *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1993, 60, 241-261). В вирионе белок VP0 далее расщепляется на два белка: VP4 и VP2 (или 1А и 1В, соответственно). Механизм превращения белков VP0 в VP2 и VP4, а также образования зрелых вирионов неизвестен. Молекулярная масса белков VP1, VP2 и VP3 составляет около 26000 Да, тогда как белок VP4 меньше на около 8000 Да.

Простая комбинация капсидных белков образует молекулу протомера или 5S, которая является элементарной составляющей капсида ВЯ. Этот протимер затем образует комплекс в форме пентамера с образованием молекулы 12S. Вирион возникает в результате инкапсидирования молекулы геномной РНК путем сборки двенадцати пентамеров 12S, с образованием таким образом частицы 146S. Кроме того, вирусный капсид может образовываться без молекулы РНК, присутствующей внутри него (далее "пустой капсид"). Пустой капсид дополнительно обозначается как частица 70S. Образование пустых капсидов может происходить естественным образом во время репликации вируса или может быть вызвано искусственно путем химической обработки.

Многие гипотезы, маршруты исследований и предложения были разработаны в попытке создания эффективных вакцин против Я. В настоящее время единственными вакцинами на рынке являются содержащие инактивированный вирус. Существует обеспокоенность по поводу безопасности вакцины ВЯ, поскольку вспышки ящура в Европе связаны с недочетами в производстве вакцин (King, A.M.Q. et al., (1981) *Nature* 293: 479-480). Инактивированные вакцины не дают долгосрочного иммунитета, поэтому требуются бустерные инъекции ежегодно или чаще в случае эпидемических вспышек. Кроме того, существуют риски, связанные с неполной инактивацией и/или утечкой вируса во время производства инактивированных вакцин (King, A.M.Q, там же). Задачей в данной области техники было создание конформационно правильных иммуногенов, лишенных инфекционного генома ВЯ, для создания эффективных и безопасных вакцин.

Вирус осповакцины был успешно использован для иммунизации против оспы, кульминацией которой стало всемирное уничтожение оспы в 1980 году. Таким образом, поксвирусы приобретают значение в новой роли, генетически модифицированного вектора для экспрессии чужеродных генов (Panicali and Paoletti, 1982; Paoletti et al., 1984). Гены, кодирующие гетерологичные антигены, экспрессируются в ви-

рус е осповакцины, что часто приводит к защитному иммунитету против инфицирования соответствующим патогеном (см. Tartaglia et al., 1990). В высокой степени аттенуированный штамм вакцин, обозначенный MVA, также использовали в качестве вектора для вакцин на основе поксвируса. Применение MVA описано в патенте США № 5185146.

Превосходный профиль безопасности MVA, являющийся результатом дефекта его репликации в клетках человека, был доказан во многих клинических испытаниях, включая вакцинацию лиц с ослабленным иммунитетом и во время кампании по ликвидации оспы в 1970-х годах, когда 120000 человек были вакцинированы MVA (A. Mayr et al., "The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism", Zentralbl. Bakteriол. В 167(5-6):375-390 (1978)). С тех пор было создано и протестировано множество различных рекомбинантных вакцин MVA пригодных для иммунизации животных и людей против инфекционных (например, ВИЧ, малярия) и неинфекционных (например, рак предстательной железы) заболеваний. Его доказанная безопасность и хорошая иммуногенность, таким образом, делают MVA основным кандидатом на вектор вакцины, индуцирующей Т- и В-клетки.

Дополнительные векторные системы вакцин включают использование авипоксвирусов, которые в природе представляют собой поксвирусы, ограниченные хозяином. Как поксвирус гусей (ПВГ; Taylor et al. 1988a, b), так и поксвирус канареек (ПВК; Taylor et al., 1991 & 1992) были сконструированы для экспрессии чужеродных генных продуктов. Поксвирус гусей (ПВГ) является прототипическим вирусом рода Avіroх семейства Poxviruѕ. Вирус вызывает экономически значимое заболевание домашней птицы, которое хорошо контролировалось с 1920-х годов с помощью живых аттенуированных вакцин. Репликация авипоксвирусов ограничена видом птиц (Mathews, 1982), и в литературе отсутствуют сообщения о продуктивной инфекции авипоксвирусом любых видов, не относящихся к птицам, включая человека. Это ограничение хозяина обеспечивает изначально заложенный барьер безопасности против передачи вируса другим видам и делает применение векторов вакцин на основе авипоксвируса в области ветеринарии и медицины привлекательной идеей.

Другие аттенуированные поксвирусные векторы были получены путем генетических модификаций штаммов вируса дикого типа. Вектор NYVAC, полученный путем делеции специфических генов, определяющих вирулентность и диапазон хозяев, из копенгагенского штамма осповакцины (Tartaglia et al., 1992) оказался полезным в качестве рекомбинантного вектора для индукции защитного иммунного ответа против экспрессируемого чужеродного антигена. Другой сконструированный поксвирусный вектор представляет собой ALVAC, полученный из поксвируса канареек (см. патент США № 5756103). ALVAC не реплицируется продуктивно у хозяев, которые не являются птицами, что считается характерным признаком, улучшающим его профиль безопасности (Taylor et al., 1991 и 1992). ALVAC был депонирован в соответствии с Будапештским договором в Американской Коллекции Типовых Культур под учетным номером VR-2547. Еще один модифицированный поксвирусный вектор представляет собой TROVAC, полученный из поксвируса гусей (см. патент США № 5766599).

Рекомбинантные поксвирусы могут быть сконструированы в две стадии, известные из уровня техники и аналогичные способам создания синтетических рекомбинантных поксвирусов, таких как вирус осповакцины и авипоксвирус, описанные в патентах США №№ 4769330; 4722848; 4603112; 5110587; 5174993; 5494807; и 5505941, раскрытие которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, можно понять, что создание рекомбинантного поксвируса ВЯ и композиций и продуктов на его основе, в частности, рекомбинантов ВЯ на основе ALVAC или TROVAC, а также композиций и продуктов на его основе, особенно таких рекомбинантов, содержащих гены P1 и/или ген протеазы 3С ВЯ, и композиций и продуктов на их основе, было бы весьма желательным шагом вперед по отношению к современному уровню техники.

Учитывая восприимчивость животных (в том числе людей, хотя и редко) к ВЯ, необходим способ предотвращения инфекции ВЯ и защиты животных. Соответственно, существует потребность в эффективной вакцине против ВЯ.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

В настоящем изобретении определено, что различные "прайм-буст" комбинации векторов с дефектной репликацией и/или неспособных к репликации индуцируют эффективную иммунную защиту от инфекции ВЯ.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному MVA, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту по меньшей мере одного антигена вируса ящура (ВЯ). В предпочтительном варианте осуществления изобретения MVA представляет собой MVA-BN.

Предпочтительно антиген(ы) ВЯ может(гут) представлять собой VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B и 3С. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая один или более антигенов вируса ящура (ВЯ), представляет собой кДНК, кодирующую участок P1 ВЯ, и кДНК, кодирующую протеазу 3С ВЯ из ВЯ. В одном варианте осуществления изобретения антигены ВЯ функционально связаны с последовательностью промотора, например, промотором PгMVA095R или PгI3.5-long.

Еще один аспект изобретения относится к композиции, содержащей MVA и фармацевтически или

ветеринарно приемлемый носитель, эксципиенты или основу.

Еще один аспект изобретения относится к способу индукции иммунного ответа на ВЯ у пациента, включающему введение пациенту MVA согласно настоящему изобретению.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения и/или предупреждения у пациента заболевания, вызванного ВЯ.

В еще одном аспекте изобретение относится к вакцине и клетке, содержащей MVA согласно настоящему изобретению.

Еще один аспект изобретения относится к набору, содержащему рекомбинантный MVA по изобретению и/или композицию по изобретению в первом флаконе или емкости для первого введения (примирования) и во втором флаконе или емкости для второго введения (бустинга).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного MVA по изобретению или антигенной детерминанты, экспрессированной из генома указанного MVA.

Эти и другие объекты изобретения будут описаны более подробно в связи с подробным описанием изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

Сопроводительные графические материалы, которые включены в настоящий документ и составляют его часть, показывают несколько вариантов осуществления изобретения и вместе с описанием служат цели объяснения принципов изобретения.

Фиг. 1 показывает схематическое представление двух типичных конструкций: № 7B (MVA-mBN360B) и № 8A (MVA-mBN361A).

Фиг. 2 показывает экспрессию и процессинг антигена P1-2AB с активностью протеазы 3C.

Фиг. 3 показывает со-IP капсидного материала с правильной конформацией с конформационно специфическим анти-P1 антителом и обнаружением соосажденных антигенов VP3 и VP0.

#### **Подробное описание изобретения**

Авторы настоящего изобретения определили, что вакцина, содержащая рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), который содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту ВЯ, представляет собой вакцину против ВЯ, способную индуцировать как клеточные, так и гуморальные ответы, достаточные для обеспечения защитного иммунитета к ВЯ.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модифицированному рекомбинантному вирусу MVA, экспрессирующему по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более антигенов ВЯ. Вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой вирус MVA, такой как MVA-BN. Модифицированный рекомбинантный вектор содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенный белок, например, полученный из OPC ВЯ, которые кодируются P1 (включая VP1, VP2, VP3, VP4 и 2A), 2B и/или 3C участками.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированному рекомбинантному вирусу MVA, который содержит в несущественном участке генома вируса по меньшей мере одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или более антигенов ВЯ, таких как генные продукты гена P1 (включая VP1, VP2, VP3, VP4, 2A), 2B и/или 3C.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа на ВЯ у пациента, включающим введение рекомбинантного вектора MVA согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа на ВЯ у пациента, включающим введение рекомбинантного вируса MVA согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным вирусам MVA, содержащим по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, экспрессирующую один или более антигенов ВЯ, предпочтительно в несущественном участке генома вируса MVA. Вирус MVA может быть аттенуированным вирусом MVA, таким как MVA-BN.

В соответствии с настоящим изобретением рекомбинантные вирусные векторы MVA экспрессируют по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более антигенов ВЯ. В частности, любой или все гены, или открытые рамки считывания (ORF), кодирующие антигены ВЯ, могут быть выделены, охарактеризованы и вставлены в рекомбинанты MVA. Полученный рекомбинантный вирус MVA применяется для инфицирования животного. Экспрессия в организме животного антигенов ВЯ приводит к возникновению иммунного ответа у животного на ВЯ. Таким образом, рекомбинантный вирус MVA согласно настоящему изобретению можно использовать в иммунологической композиции или вакцине, чтобы обеспечить средство для индукции иммунного ответа, который может быть, но не обязательно, защитным. Используемые методы молекулярной биологии описаны в Sambrook et al. (1969).

Изобретение также относится к антигенам ВЯ, которые могут быть доставлены в виде "раздетой" плазмиды или вектора ДНК или ДНК-вакцины, или иммунологических или иммуногенных композиций, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие и экспрессирующие *in vivo* антиген(ы) ВЯ.

Представляющий интерес антиген ВЯ может быть получен из ВЯ или может быть получен путем

рекомбинантной экспрессии гена(ов) или его(их) частей *in vitro* и/или *in vivo* ВЯ. Кроме того, представляющий интерес антиген ВЯ может быть получен с использованием синтетических последовательностей ВЯ.

Представляющий интерес антиген ВЯ может представлять собой, но не ограничиваясь этим: U, Lab, P1-2A (включая VP1, VP2, VP3, VP4 и 2A); P2 (включая 2B и 2C) и P3 (включая 3A, 3B, VPg, 3C и 3D) или их части. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антигены ВЯ представляют собой P1 и 3C. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения антигены ВЯ представляют собой P1-2A или P1-2A, 2B. В данном документе делается ссылка на Заявку на выдачу патента США серийный № 10/327481, касающийся выделения геномных последовательностей ВЯ, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ниже будет сделана ссылка на типичные варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в сопроводительных графических материалах.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному модифицированному вирусу осповакцины Анкара (MVA), содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту ВЯ. В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору MVA, содержащему гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту ВЯ.

MVA получен более чем 570 серийными пассажами на фибробластах куриного эмбриона штамма кожной осповакцины Анкара [хориоаллантоисный вирус осповакцины Анкара, CVA; обзор см. в Maug et al. (1975), *Infection* 3, 6-14], который в течение многих лет культивировался в Институте осповакцины, Анкара, Турция, и применялся в качестве основы для осповакцины человека. Однако из-за частых серьезных поствакцинационных осложнений, связанных с вирусами осповакцины, было предпринято несколько попыток получить в большей степени аттенуированную, более безопасную вакцину против оспы.

В период с 1960 по 1974 год проф. Anton Maug удалось аттенуировать CVA более чем 570 непрерывными пассажами в клетках ФКЭ [Maug et al. (1975)]. На разных моделях животных было показано, что полученный MVA был авирулентным [Maug, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-234]. В рамках ранней разработки MVA в качестве вакцины-кандидата против оспы были проведены клинические испытания с применением MVA-517 в сочетании с Lister Elstree [Stickl (1974), *Prev. Med.* 3: 97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munch. Med. Wochenschr.* 113: 114 9-1153] у пациентов, подверженных риску побочных эффектов осповакцины. В 1976 году MVA, полученный из посевного материала MVA-571 (соответствующего 571-му пассажу), был зарегистрирован в Германии в качестве праймерной вакцины в двухступенчатой программе парентеральной вакцинации против оспы. Впоследствии MVA-572 применяли у около 120000 индивидуумов кавказского происхождения, в основном детей в возрасте от 1 до 3 лет, без каких-либо серьезных побочных эффектов, хотя многие из пациентов принадлежали к популяции с высоким риском осложнений, связанных с осповакциной (Maug et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572 был депонирован в Европейской Коллекции Клеточных Культур Животных как ECACC V94012707.

В результате перевивания, применяемого для аттенуации MVA, существует множество различных штаммов или изолятов, в зависимости от количества пассажей, проведенных в клетках ФКЭ. Например, MVA-572 применяли в небольшой дозе в качестве предвакцины в Германии в ходе программы ликвидации оспы, а MVA-575 широко использовали в качестве ветеринарной вакцины. У MVA, как и MVA-BN, недостает около 15% (31 тыс. п.о. из шести участков) генома по сравнению с вирусом-предком CVA. Делеции затрагивают ряд генов, определяющих вирулентность и диапазон хозяев, а также ген телец включения типа А. MVA-575 был депонирован 7 декабря 2000 года в Европейской Коллекции Клеточных Культур Животных (ECACC) под учетным номером V00120707. Ослабленный CVA-вирус MVA (модифицированный вирус осповакцины Анкара) был получен путем серийного перевивания (более 570 пассажей) CVA на первичных фибробластах куриного эмбриона.

Хотя Maug et al. продемонстрировал в 1970-х годах, что MVA в высокой степени аттенуирован и авирулентен у людей и млекопитающих, некоторые исследователи сообщали, что MVA не полностью аттенуирован в клеточных линиях млекопитающих и человека, поскольку в этих клетках может наблюдаться остаточная репликация [Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211; патент США № 5185146; Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569]. Предполагается, что результаты, представленные в этих публикациях, были получены с применением различных известных штаммов MVA, поскольку применяемые вирусы существенно отличаются по своим свойствам, особенно в отношении их роста в различных клеточных линиях. Такая остаточная репликация нежелательна по разным причинам, включая проблемы безопасности в связи с применением у человека.

Штаммы MVA с улучшенным профилем безопасности для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были созданы Bavarian Nordic: в Bavarian Nordic осуществляли дальнейшие пассажи MVA, и полученный вирус обозначили MVA-BN. Репрезентативный образец MVA-BN был депонирован 30 августа 2000 года в Европейской Коллекции Клеточных Культур как (ECACC) под учетным номером V00083008. MVA-BN дополнительно описан в WO 02/42480 (US

2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

MVA-BN может присоединяться и входить в клетки человека, в которых гены, кодируемые вирусом, экспрессируются очень эффективно. MVA-BN в высокой степени адаптирован к клеткам первичных фибробластов куриного эмбриона (ФКЭ) и не реплицируется в клетках человека. В клетках человека экспрессируются вирусные гены, но не образуется инфекционный вирус. MVA-BN классифицируется как организм с уровнем биобезопасности 1 согласно классификации Центров контроля и профилактики заболеваний Соединенных Штатов. Препараты MVA-BN и производных вводили многим видам животных и более чем 2000 человек, включая индивидуумов с иммунодефицитом. Все прививки оказались в целом безопасными и хорошо переносились. Было показано, что, несмотря на высокую степень аттенуации и снижение вирулентности, в доклинических исследованиях MVA-BN индуцирует как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на осповакцину и гетерологичные генные продукты, кодируемые генами, которые клонированы 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, демонстрирующим по существу те же характеристики репликации, что и MVA, как описано в данном документе, но при этом демонстрирующим отличия в одной или нескольких частях генома. MVA-BN, а также производное или вариант MVA-BN неспособны к репродуктивной репликации *in vivo* у людей и мышей, даже у мышей с выраженным угнетением иммунитета. Более конкретно, MVA-BN или производное или вариант MVA-BN предпочтительно также обладают способностью к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (ФКЭ), но не обладают способностью к репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCat [Boukamp et al. (1988), *J. Cell Biol.* 106: 761-771], клеточной линии 143В остеосаркомы костной ткани человека (ECACC учетный № 91112502), линии эмбриональных клеток почки человека 293 (ECACC учетный № 85120602) и клеточной линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa (ATCC учетный № CCL-2). Кроме того, коэффициент амплификации вируса для производного или варианта MVA-BN по меньшей мере в два раза меньше, более предпочтительно в три раза меньше, чем для MVA-575 в клетках HeLa и клеточных линиях HaCaT. Тесты и анализ этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699).

Термин "неспособный к репродуктивной репликации" или "не обладающий способностью к репродуктивной репликации", например, описан в WO 02/42480, в которой также описано, как получить MVA, обладающий требуемыми свойствами, указанными выше. Этот термин применим к вирусу, коэффициент амплификации вируса которого через 4 дня после инфицирования составляет менее чем 1 с применением анализов, описанных в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893.

Термин "не способный к репродуктивной репликации" относится к вирусу, коэффициент амплификации вируса которого через 4 дня после инфицирования составляет менее чем 1. Анализы, описанные в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, применимы для определения коэффициента амплификации вируса.

Амплификацию или репликацию вируса обычно выражают как соотношение вируса, полученного из инфицированной клетки (выход), к количеству, первоначально использованному для инфицирования клетки в первый раз (вход), которое называют "коэффициентом амплификации". Коэффициент амплификации "1" определяет такое состояние амплификации, при котором количество вируса, полученного из инфицированных клеток, совпадает с количеством, первоначально использованным для инфицирования клеток, и это означает, что инфицированные клетки позволяют вирусную инфекцию и размножение. Напротив, коэффициент амплификации менее чем 1, т.е. снижение уровня на выходе по сравнению с входом, указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, аттенуацию вируса.

Преимущества вакцины на основе MVA включают ее профиль безопасности, а также доступность для широкомасштабного производства вакцин. Доклинические тесты показали, что MVA-BN демонстрирует превосходную аттенуацию и эффективность по сравнению с другими штаммами MVA (WO 02/42480). Дополнительным свойством штаммов MVA-BN является способность индуцировать практически такой же уровень иммунитета в схемах "вирус осповакцины прайм/вирус осповакцины буст" по сравнению со схемами "ДНК-прайм/вирус осповакцины буст".

Рекомбинантные вирусы MVA-BN, наиболее предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения, считаются безопасными благодаря их явно выраженному дефекту репликации в клетках млекопитающих и их хорошо доказанной авирулентности. Кроме того, в дополнение к эффективности, осуществимость промышленного производства может быть предпочтительной. Кроме того, вакцины на основе MVA могут доставлять множественные гетерологичные антигены и позволять одновременную индукцию гуморального и клеточного иммунитета.

Векторы MVA, пригодные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с применением способов, известных из уровня техники, таких как описанные в WO/2002/042480 и WO/2002/24224, обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

В другом аспекте вирусный штамм MVA, подходящий для получения рекомбинантного вируса,

может быть штаммом MVA-572, MVA-575 или любым аналогично аттенуированным штаммом MVA. Кроме того, подходящим может быть мутантный MVA, такой как вирус хориоаллантоисной осповакцины Анкара с делециями (dCVA). dCVA содержит сайты делеции del I, del II, del III, del IV, del V и del VI в геноме MVA. Эти сайты особенно пригодны для введения нескольких гетерологичных последовательностей. dCVA может репродуктивно реплицировать (с коэффициентом амплификации более 10) в клеточной линии человека (такой как, клеточные линии человека 293, 143В и MRC-5), что позволяет дальнейшую оптимизацию путем дополнительной мутации, пригодной для стратегии вакцинации на основе вируса (см. WO 2011/092029).

Антигенные детерминанты.

Любая ДНК, представляющая интерес, или чужеродный ген может быть вставлен в виде гетерологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей антигенную детерминанту, в вирусные векторы, описанные в данном изобретении. Чужеродные гены для введения в геном вируса в экспрессируемой форме могут быть получены с применением обычных методик выделения желаемого гена. Для организмов, которые содержат геном ДНК, гены, кодирующие антиген, который представляет интерес, могут быть выделены из геномной ДНК; для организмов с геномами РНК желаемый ген может быть выделен из кДНК копий генома. Кроме того, антигенная детерминанта может кодироваться рекомбинантной ДНК, модифицированной на основе природной последовательности, например, для оптимизации антигенного ответа, экспрессии гена и т.д.

Термин "антигенная детерминанта" относится к любой молекуле, которая стимулирует иммунную систему хозяина к развитию антигенспецифического иммунного ответа, будь то клеточный ответ или гуморальный ответ в форме антител. Антигенные детерминанты могут включать белки, полипептиды, антигенные фрагменты белка, антигены и эпитопы, которые все еще индуцируют иммунный ответ у хозяина и образуют часть антигена, гомологов или вариантов белков, полипептидов и антигенных фрагментов белка, антигенов и эпитопов, включая, например, гликозилированные белки, полипептиды, антигенные фрагменты белка, антигены и эпитопы и нуклеотидные последовательности, кодирующие такие молекулы. Таким образом, белки, полипептиды, антигенные фрагменты белка, антигены и эпитопы не ограничиваются конкретными нативными нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, но включают последовательности, идентичные нативной последовательности, а также модификации нативной последовательности, такие как делеции, инсерции, вставки и замены.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки, в отдельности или в сочетании с другим белком, таким как, например, основной комплекс гистосовместимости ("ОКГ") белка или Т-клеточный рецептор. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, которые сближены в результате вторичного и/или третичного свертывания белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при третичном свертывании, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот, но обычно менее 20 аминокислот, в уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, "Epitope Mapping Protocols" в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Предпочтительно, гомолог или вариант обладает идентичностью по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60 или 65%, по меньшей мере около 70 или 75%, по меньшей 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% с указанным белком, полипептидом, антигенным фрагментом белка, антигеном и эпитопом на уровне нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

Методики для определения идентичности последовательностей для нуклеиновых кислот и аминокислот известны из уровня техники. Две или более последовательностей можно сравнить путем определения их "процента идентичности". Процент идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот представляет собой количество точных совпадений между двумя выровненными последовательностями, деленное на длину более коротких последовательностей и умноженное на 100.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к белкам, полипептидам, антигенным фрагментам белка, антигенам и эпитопам, описанным в данном документе, определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в референтной последовательности (т.е. белке, полипептиде, антигенном фрагменте белка, антигене или эпитопе, из которых она получена) после выравнивания последовательностей и введения промежутков, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть осуществлено различными способами, которые входят в компетенцию специалиста в данной области, например, с применением общедоступного компьютерного программного

обеспечения, такого как ПО BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

То же самое относится к "проценту (%) идентичности нуклеотидных последовательностей", с соответствующими поправками.

Например, подходящее выравнивание для последовательностей нуклеиновых кислот обеспечивается алгоритмом локальной гомологии Smith and Waterman, (1981), *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489. Этот алгоритм может быть применен к аминокислотным последовательностям с применением матрицы подсчета 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 нормированной Gribskov (1986), *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763. Типичная реализация этого алгоритма для определения процента идентичности последовательностей представлена Genetics Computer Group (Мэдисон, штат Висконсин) в приложении "BestFit". Параметры по умолчанию для этого метода описаны в Висконсинском руководстве к пакету программ для анализа последовательностей, версия 8 (1995) (доступно в Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин). Предпочтительным способом определения процента идентичности в контексте настоящего изобретения является использование пакета программ MPSRCH, защищенного авторским правом Университета Эдинбурга, который разработан John F. Collins и Shane S. Sturrok и распространяется IntelliGenetics, Inc. (Маунтин-Вью, штат Калифорния). Из этого набора пакетов можно использовать алгоритм Smith-Waterman, в котором параметры по умолчанию используются для таблицы подсчета баллов (например, штраф на внесение делеции в размере 12, штраф на продолжение делеции в размере один и делеция в размере шесть). Среди полученных данных значение "Match" отображает "идентичность последовательностей". Другие подходящие программы для вычисления процента идентичности или сходства между последовательностями в общем известны из уровня техники, например, другой программой выравнивания является BLAST, используемая с параметрами по умолчанию. Например, BLASTN и BLASTP можно использовать со следующими параметрами по умолчанию: 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. Подробности касательно этих программ можно найти по следующему Интернет-адресу: <http://www.ncbi.nlm.gov/cqi-bin/BLAST>.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует скорее антигенные домены или антигенные фрагменты белка, чем полноразмерный антигенный белок. Длина указанных фрагментов может быть любой, которая достаточна для антигенности или иммуногенности. Длина фрагментов может составлять не менее 8 аминокислот, предпочтительно 10-20 аминокислот, но может быть больше, например, длина по меньшей мере 50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000 аминокислот или любая длина в диапазоне между указанными значениями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий фрагмент антигенного белка или его иммуногенный полипептид, вставляется в вирусный вектор по изобретению. В другом варианте осуществления изобретения около 2-6 различных нуклеиновых кислот, кодирующих разные антигенные белки, вставляют в один или более вирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно применять несколько иммуногенных фрагментов или субъединиц разных белков. Например, из векторов могут экспрессироваться несколько различных эпитопов из разных сайтов одного и того же белка или из разных белков одного и того же вида или из ортолога белка другого вида.

### Определения

Перед тем, как настоящее изобретение будет подробно описано ниже, необходимо понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в данном документе, поскольку они могут варьировать. Кроме того, необходимо понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно придает им специалист в данной области техники.

Необходимо отметить, что в настоящем описании формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иного. Так, например, ссылка на "антигенную детерминанту" включает одну или более антигенных детерминант, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные обычным специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в настоящем описании.

Если не указано иное, выражение "по меньшей мере", предшествующее ряду элементов, необходимо понимать, как относящееся к каждому элементу ряда. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, с помощью не более чем шаблонных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквивален-



ты включены в настоящее изобретение.

Во всех местах настоящего описания и следующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. При использовании в настоящем описании термин "содержащий" может быть заменен термином "включающий" или "в том числе" или иногда, при использовании в настоящем описании, термином "имеющий". Всякий раз, когда любой из вышеуказанных терминов (содержащий, включающий, в том числе и имеющий) используется в настоящем описании в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, он может быть заменен термином "состоящий из", хотя это менее предпочтительно.

При использовании в настоящем описании "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения. При использовании в настоящем описании термин "в основном состоящий из" не исключает материалов или стадий, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые признаки пункта формулы.

В настоящем описании выражение "и/или" между несколькими упомянутыми элементами необходимо понимать, как включающий индивидуальные и комбинированные варианты. Например, если два элемента объединены выражением "и/или", то первый вариант относится к применению первого элемента без второго. Второй вариант относится к применению второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Необходимо понимать, что любой из этих вариантов подпадает под значение выражения и, следовательно, удовлетворяет требованию выражения "и/или" в настоящем описании. Кроме того, необходимо понимать, что параллельное применение более чем одного из вариантов подпадает под значение выражения и, следовательно, удовлетворяет требованию выражения "и/или".

В настоящем описании термин "влияющий на иммунный ответ" включает развитие у пациента гуморального и/или клеточного иммунного ответа на белок и/или полипептид, вырабатываемый рекомбинантным MVA и/или композициями и/или вакцинами, содержащими рекомбинантный MVA согласно настоящему изобретению. "Гуморальный" иммунный ответ, как термин, хорошо известный из уровня техники, обозначает иммунный ответ, включающий антитела, тогда как "клеточный" иммунный ответ, как термин, хорошо известный из уровня техники, обозначает иммунный ответ, включающий Т-лимфоциты и другие лейкоциты, особенно иммуногенспецифический ответ с помощью HLA-ограниченных цитолитических Т-клеток, т.е. "CTL". Клеточный иммунный ответ возникает, когда процессированные иммуногены, т.е. пептидные фрагменты, отображаются вместе с основным комплексом гистосовместимости.

Термин "по существу аналогичный" в контексте антигенных белков ВЯ по изобретению указывает на то, что полипептид содержит последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% референтной последовательности в окне сравнения 10-20 аминокислот. Процент идентичности последовательности определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать инсерции или делеции (т.е. промежутки) по сравнению с референтной последовательностью (которая не содержит инсерций или делеций) с целью оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток присутствует в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательностей.

В настоящем описании термин "функционально связанный" означает, что описанные компоненты находятся во взаимоотношениях, позволяющих им функционировать по назначению.

Под "животным" подразумеваются млекопитающие, птицы и т.п. Животное или хозяин включает млекопитающих и человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из относящегося к семейству лошадиных (например, лошадь), собачьих (например, собаки, волки, лисицы, койоты, шакалы), кошачьих (например, львы, тигры, домашние кошки, дикие кошки, другие крупные кошки, и другие кошачьи, включая гепардов и рысь), овечьих (например, овцы), жвачных животных (например, крупный рогатый скот), свинообразных (например, свинья), козьих (например, коза), птиц (например, курица, утка, гусь, индейка, перепел, фазан, попугай, певчие птицы, ястреб, ворон, страус, эму и казуар), приматов (например, полуобезьяна, долгопят, мартышка, гиббон, человекообразная обезьяна) и рыб. Кроме того, термин "животное" включает индивидуальное животное на всех стадиях развития, включая стадии эмбриона и плода.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относятся к РНК или ДНК, линейной или разветвленной, однострочной или двухстрочной или их гибриду. Кроме того, данные термины включают гибриды РНК/ДНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная

РНК с любой последовательностью, зонды и праймеры нуклеиновой кислоты. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги, урацил, другие сахара и линкерные группы, такие как фторрибоза и тиолат, и нуклеотидные ветви. Последовательность нуклеотидов может быть дополнительно модифицирована после полимеризации, например, конъюгацией с компонентом метки. Другие виды модификаций, включенные в настоящее определение, представляют собой кэпы, замену одного или более природных нуклеотидов аналогом и введение средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, компонентам метки, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды могут быть получены химическим синтезом или получены из микроорганизма.

Термин "ген" широко используется для обозначения любого сегмента полинуклеотида, связанного с биологической функцией. Таким образом, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК, и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, ген также обозначает фрагмент нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК или кодирует специфический белок и который содержит регуляторные последовательности.

В настоящем описании термин "гетерологичный" ген, нуклеиновая кислота, антиген или белок необходимо понимать, как нуклеиновую кислоту или аминокислотную последовательность, которая отсутствует в поксвирусном геноме дикого типа (например, MVA или MVA-BN). Специалисту в данной области техники понятно, что "гетерологичный ген", если он присутствует в поксвирусе, таком как MVA или MVA-BN, должен быть встроен в поксвирусный геном таким образом, что после введения рекомбинантного поксвируса в клетку-хозяина он экспрессируется как соответствующий гетерологичный генный продукт, т.е. как "гетерологичный антиген" и/или "гетерологичный белок".

Экспрессия обычно достигается путем функционального связывания гетерологичного гена с регуляторными элементами, которые позволяют экспрессию в инфицированной поксвирусом клетке. Предпочтительно, регуляторные элементы включают природный или синтетический промотор поксвируса.

Изобретение дополнительно включает комплементарную нить к полинуклеотиду, кодирующему антиген, эпитоп или иммуноген ВЯ. Комплементарная нить может быть полимерной и любой длины и может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги в любой комбинации.

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "полипептидный фрагмент" используются в настоящем описании взаимозаменяемым образом для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислоты и может прерываться химическими остатками, отличными от аминокислот. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидных связей, гликозилирование, липидация, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с меченым или биоактивным компонентом. Настоящее изобретение относится к вакцинам для овечьих, жвачных животных, кошачьих и свинообразных, а также к фармацевтическим или иммунологическим композициям, которые могут содержать эффективное количество рекомбинантных антигенов ВЯ и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент или основу.

"Фармацевтически приемлемые носители", например, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975). Здесь описаны композиции и составы с использованием обычных фармацевтически приемлемых носителей, подходящих для введения раскрытых в настоящем изобретении векторов и композиций. Как правило, природа используемого носителя зависит от конкретного используемого способа введения. Например, составы для парентерального введения обычно включают жидкости для инъекций, которые содержат в качестве основы фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. Для твердых композиций (таких как порошки, пилюли, таблетки или капсулы) обычные нетоксичные твердые носители включают, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. Кроме того, фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, рН-буферные агенты и т.п., такие как, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

Термин "прайм-буст вакцинация" относится к стратегии вакцинации с применением первой, прайминговой инъекции вакцины, направленной на специфический антиген, за которой следуют с промежутками одна или более бустерных инъекций той же вакцины. Прайм-буст вакцинация может быть гомологичной или гетерологичной. При гомологичной прайм-буст вакцинации используют вакцину, содержащую один и тот же иммуноген и вектор как для прайминговой инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций. При гетерологичной прайм-буст вакцинации используют вакцину, содержащую один и тот же иммуноген как для прайминговой инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций, но различные векторы для прайминговой инъекции и одной или более бустерных инъекций. Например, при гомологичной прайм-буст вакцинации можно использовать рекомбинантный вектор MVA, содержащий

те же нуклеиновые кислоты, экспрессирующие альфавирусные антигены, как для прайминговой инъекции, так и для одной или более бустерных инъекций. Напротив, при гетерологичной прайм-буст вакцинации можно использовать рекомбинантный вектор MVA, содержащий нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один альфавирусный белок, для прайминговой инъекции и другой рекомбинантный вектор MVA, экспрессирующий второй альфавирусный белок, не содержащийся в прайминговой инъекции, или наоборот.

Гетерологичная прайм-буст вакцинация также включает различные комбинации, такие как, например, использование плазмиды, кодирующей иммуноген, для прайминговой инъекции, и использование рекомбинантного MVA, кодирующего тот же самый иммуноген, для одной или более бустерных инъекций, или использование рекомбинантного белкового иммуногена для прайминговой инъекции и использование рекомбинантного вектора MVA, кодирующего тот же белковый иммуноген, для одной или более бустерных инъекций.

"Вектор" относится к рекомбинантной ДНК- или РНК-плазмиде или вирусу, содержащему гетерологичный полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-мишень *in vitro* или *in vivo*. Гетерологичный полинуклеотид может содержать последовательность, представляющую интерес для целей предупреждения или терапии, и необязательно может быть представлен в виде экспрессионной кассеты. В настоящем описании вектор не должен быть способен к репликации в конечной клетке- или пациенте-мишени. Термин включает векторы для клонирования и вирусные векторы.

Термин "рекомбинантный" относится к полинуклеотиду полусинтетического или синтетического происхождения, который не встречается в природе или связан с другим полинуклеотидом в порядке, не обнаруженном в природе.

В настоящем описании "лечить", "процесс лечения" или "лечение" заболевания относятся к предупреждению, снижению, улучшению, частичному или полному облегчению, или излечению заболевания, например, заболевания, вызванного ВЯ. Это может быть одно или более из уменьшения тяжести заболевания, ограничения или предотвращения развития симптомов, характерных для подлежащего лечению заболевания, подавления ухудшения симптомов, характерных для подлежащего лечению заболевания, ограничения или предотвращения рецидива заболевания у пациента, у которого заболевание ранее имело место, и ограничения или предотвращения рецидива симптомов у пациентов.

В тексте настоящего описания процитировано несколько документов. Каждый из документов, процитированных в настоящем описании (включая все патенты, заявки на выдачу патентов, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), независимо от того, упоминается ли он выше или ниже, включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или несовместим с настоящим описанием, настоящее описание будет превалировать над любым таким материалом. Ничто в настоящем описании не должно толковаться как признание того, что изобретение не имеет права преподносить такое раскрытие в силу предшествующего изобретения.

Белки ВЯ.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам ВЯ из организма представителя овечьих, жвачных животных, козых или свинообразных. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду ВЯ и его варианту или фрагменту.

Кроме того, гомологи полипептидов ВЯ из организма представителя овечьих, жвачных животных, козых или свинообразных включены в настоящее изобретение. В настоящем описании термин "гомологи" включает ортологи, аналоги и паралоги. Термин "аналоги" относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые обладают одинаковой или сходной функцией, но которые эволюционировали по отдельности у неродственных организмов. Термин "ортологи" относится к двум полинуклеотидам или полипептидам из разных видов, которые эволюционировали из общего гена-предка в ходе видообразования. Обычно ортологи кодируют полипептиды, обладающие одинаковыми или сходными функциями. Термин "паралоги" относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые объединяет дублирование в пределах генома. Паралоги обычно обладают разными функциями, но эти функции могут быть родственными. Аналоги, ортологи и паралоги полипептида дикого типа ВЯ могут отличаться от полипептида дикого типа ВЯ посттрансляционными модификациями, отличиями в аминокислотных последовательностях или обоими. В частности, гомологи по изобретению в общем будут демонстрировать по меньшей мере 80-85, 85-90, 90-95 или 95, 96, 97, 98, 99% идентичность последовательности со всеми или частью последовательностей ВЯ дикого типа или полинуклеотидных последовательностей, и будут обладать сходной функцией. Варианты включают аллельные варианты. Термин "аллельный вариант" относится к полинуклеотиду или полипептиду, содержащему полиморфизмы, которые приводят к модификациям аминокислотных последовательностей белка и которые существуют в пределах естественной популяции (например, видов или разновидностей вируса). Такие естественные аллельные вариации обычно могут приводить к дисперсии 1-5% в полинуклеотиде или полипептиде. Аллельные варианты могут быть идентифицированы путем секвенирования последовательности нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, для ряда различных видов, что может быть легко осуществлено с использованием гибридационных зондов для идентификации генетического локуса одного и того же гена у этих видов. Любые и все

такие вариации нуклеиновой кислоты, и результирующие полиморфизмы или вариации аминокислоты, которые являются результатом естественной аллельной вариации и которые не изменяют функциональную активность представляющего интерес гена, включены в изобретение.

В настоящем описании термин "производное" или "вариант" относится к полипептиду или нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, которая содержит одну или более консервативных вариаций аминокислоты или других незначительных модификаций, таким образом, что (1) соответствующий полипептид обладает по существу эквивалентной функцией по сравнению с полипептидом дикого типа, или (2) антитело, выработанное против полипептида, является иммунореактивным в отношении полипептида дикого типа. Такие варианты или производные включают полипептиды, содержащие незначительные модификации первичных аминокислотных последовательностей полипептида ВЯ, которые могут приводить к образованию пептидов с по существу эквивалентной активностью по сравнению с немодифицированным полипептидом-двойником. Такие модификации могут быть осуществлены преднамеренно, например, путем сайт-направленного мутагенеза, или могут быть спонтанными. Термин "вариант" дополнительно включает делеции, инсерции и замены последовательности, при условии, что полипептид функционален с точки зрения получения иммунологического ответа, как определено в настоящем описании.

Термин "консервативная вариация" относится к замене аминокислотного остатка другим биологически подобным остатком или замене нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что кодируемый аминокислотный остаток не изменяется или представляет собой другой, подобный с биологической точки зрения остаток. В этом отношении особенно предпочтительные замены обычно будут носить консервативный характер, как описано выше.

Полинуклеотиды по изобретению включают последовательности, которые являются вырожденными в результате генетического кода, например, применения оптимизированных кодонов для конкретного хозяина. В настоящем описании термин "оптимизированный" относится к полинуклеотиду, генетически модифицированному таким образом, чтобы повысить его экспрессию у настоящего вида. Для обеспечения оптимизированных полинуклеотидов, кодирующих полипептиды ВЯ, последовательность ДНК гена белка ВЯ может быть модифицирована таким образом, чтобы 1) содержать кодоны, предпочитаемые генами с высокими уровнями экспрессии у конкретного вида; 2) содержать такое количество А+Т или G+C в составе нуклеотидных оснований, которое по существу найдено у указанных видов; 3) сформировать последовательность инициации указанных видов; или 4) устранять последовательности, которые вызывают дестабилизацию, ненадлежащее полиаденилирование, деградацию и терминацию РНК, или которые образуют шпильки вторичной структуры или сайты сплайсинга РНК. Повышенная экспрессия белка ВЯ у указанных видов может быть достигнута за счет применения частоты распределения используемых кодонов у эукариотов и прокариотов или у конкретного вида. Термин "частота предпочтительного использования кодонов" относится к предпочтению, проявляемому конкретной клеткой-хозяином с точки зрения использования нуклеотидных кодонов, кодирующих данную аминокислоту. Существует 20 природных аминокислот, большинство из которых кодируются более чем одним кодоном. Поэтому все вырожденные нуклеотидные последовательности включены в изобретение, при условии, что аминокислотная последовательность полипептида ВЯ, кодируемая нуклеотидной последовательностью, остается функционально неизменной.

Протеаза 3С.

Во время процесса созревания белок Р1 ВЯ расщепляется протеазой 3С на три белка, известные как VP0, VP1 и VP3 (или 1АВ, 1D и 1С, соответственно, Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261). В вирионе белок VP0 далее расщепляется на два белка, VP4 и VP2 (или 1А и 1В, соответственно).

Высокий уровень экспрессии протеазы 3С может приводить к токсичности в клетках. Ожидается, что остаточная активность 3С вируса в эукариотических клетках будет низкой, хотя она является дТ-3С, поскольку ожидается, что сдвиг рамки ВИЧ в направлении против хода транскрипции относительно кодирующей 3С последовательности уменьшит трансляцию в 20 раз, и это означает в равной степени меньшие количества белка 3С. Чтобы преодолеть токсичность высокого уровня экспрессии протеазы 3С, авторы настоящего изобретения нашли следующие стратегии. Одна из стратегий заключается в создании мутаций в кДНК, кодирующей протеазу 3С ВЯ, таким образом, чтобы снизить уровни экспрессии протеазы 3С по сравнению с уровнями экспрессии протеазы 3С в отсутствие мутаций. Другая стратегия заключается в создании мутаций в кДНК, кодирующей протеазу 3С ВЯ, таким образом, что уровень активности протеазы 3С изменяется по сравнению с уровнем экспрессии протеазы 3С в отсутствие мутаций.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения кДНК, кодирующая протеазу 3С, содержит следующие мутации: С147Т, С142L и/или С31А/Л47А.

Еще одна стратегия состоит в том, чтобы клонировать экспрессионные кассеты в плазмиду с малым количеством копий (pACYC177, например, коммерчески доступную от New England Biolabs). Еще одна стратегия заключается в тщательном выборе промотора, ответственного за снижение уровня экспрессии протеазы 3С. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения уровень экспрессии протеазы 3С снижают путем использования слабого промотора. Термин "слабый промотор" относится к

промотору, который ослабляет уровень экспрессии генов, представляющих интерес.

Рекомбинантный MVA.

В данном изобретении предлагаются рекомбинантные поксвирусы (например, MVA или MVA-BN), содержащие гетерологичные или чужеродные последовательности нуклеиновой кислоты, полученные из ВЯ, которые встроены в различные сайты инсерции в геноме поксвируса (например, MVA или MVA-BN). Гетерологичные нуклеиновые кислоты могут кодировать один или более чужеродных белков и/или чужеродных антигенов, включая, например, вирусные антигены.

В общем, "рекомбинантный" MVA, описанный в настоящем описании, относится к MVA, которые получены стандартными методами генной инженерии, т.е. MVA согласно настоящему изобретению являются, таким образом, генетически модифицированными или генномодифицированными MVA. Таким образом, термин "рекомбинантный MVA" включает MVA, содержащие в геноме стабильно интегрированную рекомбинантную нуклеиновую кислоту, предпочтительно в виде единицы транскрипции. Единица транскрипции может включать промотор, энхансер, терминатор и/или сайленсер. Рекомбинантные MVA согласно настоящему изобретению могут экспрессировать гетерологичные антигенные детерминанты, полипептиды или белки (антигены) при индукции регуляторных элементов.

В настоящем описании термин "гетерологичный" ген, нуклеиновая кислота, антиген или белок понимается как нуклеиновая кислота или аминокислотная последовательность, которая отсутствует в поксвирусном геноме дикого типа (например, MVA или MVA-BN). Специалисту в данной области техники понятно, что "гетерологичный ген", если он присутствует в поксвирусе, таком как MVA или MVA-BN, должен быть встроен в поксвирусный геном таким образом, что после введения рекомбинантного поксвируса в клетку-хозяина он экспрессируется как соответствующий гетерологичный генный продукт, т.е. как "гетерологичный антиген" и/или "гетерологичный белок".

Экспрессия обычно достигается путем функционального связывания гетерологичного гена с регуляторными элементами, которые позволяют экспрессию в инфицированной поксвирусом клетке. Предпочтительно, регуляторные элементы включают природный или синтетический промотор поксвируса.

В одном аспекте настоящее изобретение включает рекомбинантный вектор MVA, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту ВЯ.

Для вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании, ВЯ может быть получен из вирулентного штамма ВЯ, предпочтительно штаммов ВЯ 01 Manisa, 01 BFS или Campos, A24 Cruzeiro, Asia 1 Shamir, A Iran '96, A22 Iraq, SAT2 Saudi Arabia.

Другие штаммы могут включать штаммы ВЯА 10-61, A5, A12, A24/Cruzeiro, C3/Indaial, 01, Cl-Santa Pau, C1-C5, A22/550/Azerbaijan/65, SAT1-SAT3, A, A/TNC/71/94, A/IND/2/68, A/IND/3/77, A/IND/5/68, A/IND/7/82, A/IND/16/82, A/IND/17/77, A/IND/17/82, A/IND/19/76, A/TND/20/82, A/IND/22/82, A/IND/25/81, A/IND/26/82, A/IND/54/79, A/IND/57/79, A/TND/73/79, A/IND/85/79, A/IND/86/79, A/APA/25/84, A/APN/41/84, A/APS/44/05, A/APS/50/05, A/APS/55/05, A/APS/66/05, A/APS/68/05, A/BIM/46/95, A/GUM/33/84, A/ORS/66/84, A/ORS/75/88, A/TNAn/60/947/Asia/1, A/IRN/05, Asia/IRN/05, O/HK/2001, O/UKG/3952/2001, O/UKG/4141/2001, Asia 1/HNK/CHA/05 (учетный номер GenBank EF149010, включен в настоящее описание посредством ссылки), Asia I/XJ (Li, ZhiYong et al. Chin Sci Bull, 2007), HK/70 (Chin Sci Bull, 2006, 51(17): 2072-2078), O/UKG/7039/2001, O/UKG/9161/2001, O/UKG/7299/2001, O/UKG/4014/2001, O/UKG/4998/2001, O/UKG/9443/2001, O/UKG/5470/2001, O/UKG/5681/2001, O/ES/2001, HKN/2002, 05India, O/BKF/2/92, K/37/84/A, KEN/1/76/A, GAM/51/98/A, A10/Holland, O/KEN/1/91, O/IND49/97, O/IND65/98, O/IND64/98, O/IND48/98, O/IND47/98, O/IND82/97, O/IND81/99, O/IND81/98, O/IND79/97, O/IND78/97, O/IND75/97, O/IND74/97, O/IND70/97, O/IND66/98, O/IND63/97, O/IND61/97, O/IND57/98, O/IND56/98, O/IND55/98, O/IND54/98, O/IND469/98, O/IND465/97, O/IND464/97, O/IND424/97, O/IND423/97, O/IND420/97, O/IND414/97, O/IND411/97, O/IND410/97, O/IND409/97, O/IND407/97, O/IND399/97, O/IND39/97, O/IND391/97, O/IND38/97, O/IND384/97, O/IND380/97, O/IND37/97, O/IND352/97, O/IND33/97, O/IND31/97, O/IND296/97, O/IND23/99, O/IND463/97, O/IND461/97, O/IND427/98, O/IND28/97, O/IND287/99, O/IND285/99, O/IND282/99, O/IND281/97, O/IND27/97, O/IND278/97, O/IND256/99, O/IND249/99, O/IND210/99, O/IND208/99, O/IND207/99, O/IND205/99, O/IND185/99, O/IND175/99, O/IND170/97, O/IND164/99, O/IND160/99, O/IND153/99, O/IND148/99, O/IND146/99, O/SKR 2000, A22/India/17/77.

Дальнейшие подробности касательно указанных штаммов ВЯ можно найти на веб-страницах Европейского Института Биоинформатики (EMBL-EBI), а все связанные с ними нуклеотидные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки. Изобретатели считают, что все штаммы ВЯ, как перечисленные в настоящем описании, так и те, которые еще предстоит идентифицировать, могут быть экспрессированы в соответствии с положениями настоящего документа для получения, например, эффективных композиций вакцин. Как гомологичные, так и гетерологичные штаммы используются для тестирования эффективности вакцин. Контрольное инфицирование животного может быть осуществлено внутрикочно, подкожно, в форме спрея, интраназально, внутриглазным способом, интратрахеально и/или перорально.

В другом аспекте настоящее изобретение включает рекомбинантный вектор MVA, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту ВЯ, как

описано выше, и дополнительно содержащий гетерологичные нуклеотидные последовательности, которые кодируют дополнительные белки, необходимые для образования вирусоподобных частиц (VLP).

Сайты интеграции в MVA.

Гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты ВЯ, могут быть вставлены в один или более межгенных участков (IGR) MVA. В некоторых вариантах осуществления изобретения IGR выбран из IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и IGR 148/149. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее чем 5, 4, 3 или 2 IGR рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты ВЯ. Гетерологичные нуклеотидные последовательности могут, дополнительно или в качестве альтернативы, быть вставлены в один или более из встречающихся в природе сайтов делеции, в частности, в основные делеционные сайты I, II, III, IV, V или VI генома MVA. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее чем 5, 4, 3 или 2 встречающихся в природе сайта делеции рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты ВЯ.

Количество инсерционных сайтов MVA, содержащих гетерологичные нуклеотидные последовательности, которые кодируют антигенные детерминанты белка ВЯ, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные нуклеотидные последовательности вставляют в 4, 3, 2 или менее инсерционных сайтов. Предпочтительно используют два инсерционных сайта. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют три инсерционных сайта. Предпочтительно рекомбинантный MVA содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, вставленных в 2 или 3 инсерционных сайта.

Рекомбинантные MVA-вирусы, предложенные в настоящем изобретении, могут быть получены обычными способами, известными из уровня техники. Способы получения рекомбинантных поксвирусов или инсерции экзогенных кодирующих последовательностей в поксвирусный геном хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, методы для стандартных методик молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, анализ методом Вестерн-блоттинга, методы амплификации ОТ-ПЦР и ПЦР, описаны в *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed.)* [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], а методы обработки и манипулирования вирусами описаны в *Virology Methods Manual* [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. Подобным образом, методы и приемы обработки, манипулирования и генной инженерии MVA описаны в *Molecular Virology: A Practical Approach* [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, Главу 9: Экспрессия генов вирусными векторами осповакцины)] и *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Sons, Inc. (1998) (см., например, Главу 16, Раздел IV: Экспрессия белков в клетках млекопитающих с применением вирусного вектора осповакцины)].

Для получения различных рекомбинантных MVA, описанных в настоящем описании, могут использоваться различные методы. Последовательность ДНК, которая должна быть вставлена в вирус, может быть помещена в плазмидную конструкцию *E.coli*, в которую была вставлена ДНК, гомологичная сектору ДНК MVA. Отдельно последовательность ДНК для инсерции может быть лигирована с промотором. Связь промотора-гена может быть размещена в плазмидной конструкции таким образом, что связь промотора-гена на обоих концах фланкирована ДНК, гомологичной последовательности ДНК, которая фланкирует участок ДНК MVA, содержащей несущественный локус. Полученную плазмидную конструкцию можно амплифицировать путем размножения внутри бактерий *E.coli* и выделить. Выделенная плаزمид, содержащая ДНК последовательность гена для вставки, может быть трансфицирована в клеточную культуру, например, фибробластов куриного эмбриона (ФКЭ), и в то же время культуру инфицируют MVA. Рекомбинация между гомологичной ДНК MVA в плазмиде и вирусном геноме, соответственно, может дать MVA, модифицированный присутствием чужеродных последовательностей ДНК.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, клетка подходящей клеточной культуры, например, такая как клетки ФКЭ, может быть инфицирована поксвирусом. Затем инфицированную клетку можно трансфицировать первым плазмидным вектором, содержащим чужеродный или гетерологичный ген, или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем элемента управления экспрессией в поксвирусе. Как объяснялось выше, плазмидный вектор также содержит последовательности, способные направлять инсерцию экзогенной последовательности в выбранную часть поксвирусного генома. Кроме того, плазмидный вектор необязательно содержит кассету, содержащую маркер и/или селекционный ген, функционально связанный с поксвирусным промотором. Подходящими маркерами или селекционными генами являются, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок, β-галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Использование селекционных или маркерных кассет упрощает идентификацию и выделение полученного рекомбинантного поксвируса. Однако рекомбинантный поксвирус также может быть идентифицирован с помощью технологии ПЦР. Далее, дополнительную клетку можно инфицировать рекомбинантным поксвирусом, полученным, как описано выше, и трансфицировать вторым вектором, содержащим второй чужеродный или гетероло-

гичный ген, или гены. В случае, если указанный ген вводится в другой инсерционный сайт поксвирусного генома, второй вектор также отличается гомологичными поксвирусными последовательностями, направляющими интеграцию второго чужеродного гена или генов в геном поксвируса. После гомологичной рекомбинации может быть выделен рекомбинантный вирус, содержащий два или более чужеродных, или гетерологичных гена. Для введения дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус стадии инфицирования и трансфекции можно повторить с применением для инфицирования рекомбинантного вируса, выделенного на предыдущих стадиях, и с применением дополнительного вектора, содержащего дополнительный чужеродный ген или гены для трансфекции.

В качестве альтернативы, стадии инфицирования и трансфекции, описанные выше, являются взаимозаменяемыми, т.е. подходящую клетку можно сначала трансфицировать плазмидным вектором, содержащим чужеродный ген, а затем инфицировать поксвирусом. В качестве еще одной альтернативы, можно дополнительно ввести каждый чужеродный ген в разные вирусы, совместно инфицировать клетку всеми полученными рекомбинантными вирусами и провести скрининг на рекомбинант, содержащий все чужеродные гены. Третьей альтернативой является лигирование генома ДНК и чужеродных последовательностей *in vitro* и восстановление рекомбинантного генома ДНК вируса осповакцины с применением хелперного вируса. Четвертой альтернативой является гомологичная рекомбинация в *E.coli* или другом виде бактерий между геномом вируса осповакцины, клонированным в качестве искусственной бактериальной хромосомы (ИБХ), и линейной внешней последовательностью, фланкированной последовательностями ДНК, гомологичными последовательностям, фланкирующим желаемый сайт интеграции в геноме вируса осповакцины.

Экспрессия гетерологичных генов ВЯ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия одной, более или всех гетерологичных нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенные детерминанты белка ВЯ, находится под контролем одного или нескольких промоторов поксвируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор поксвируса является промотором Pr7.5, гибридным ранним/поздним промотором, промотором PrS, промотором PrS5E, синтетическим или природным ранним, или поздним промотором или промотором АТ1 вируса коровьей оспы. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор поксвируса выбирают из группы, состоящей из промотора PrS (SEQ ID NO: 1), промотора PrS5E (SEQ ID NO: 2), Pr7.5 (SEQ ID NO: 3), промотора PrLE1 (SEQ ID NO: 4), длинного промотора Pr13.5 (SEQ ID NO: 5) и промотора PrMVA095R. Подходящие промоторы дополнительно описаны в WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 и WO 2014/063832, которые включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту белка ВЯ, может быть экспрессирована как единая единица транскрипции. Например, гетерологичная нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенную детерминанту белка ВЯ, может быть функционально связана с промотором вируса осповакцины и/или связана с терминатором транскрипции вируса осповакцины.

В некоторых вариантах осуществления изобретения "единица транскрипции" сама по себе вставлена в инсерционный сайт в геноме MVA. В некоторых вариантах осуществления изобретения "единица транскрипции" вставлена с другой(ими) единицей(ами) транскрипции в инсерционный сайт в геноме MVA. "Единица транскрипции" не встречается в природе (т.е. она является гетерологичной, экзогенной или чужеродной) в геноме MVA и способна к транскрипции в инфицированных клетках.

Предпочтительно рекомбинантный MVA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более единиц транскрипции, вставленных в геном MVA. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный MVA стабильно экспрессирует гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты филовирального белка, которые кодируются 1, 2, 3, 4, 5 или более единицами транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный MVA содержит 2, 3, 4, 5 или более единиц транскрипции, вставленных в геном MVA в 1, 2, 3 или более инсерционных сайтах в геноме MVA.

Вакцины против ВЯ и фармацевтические/ветеринарные композиции.

Поскольку репликация описанных в настоящем описании рекомбинантных вирусов MVA в высокой степени ограничена и, таким образом, они являются в высокой степени аттенуированными, они являются идеальными кандидатами для лечения широкого круга млекопитающих, включая человека и даже людей с ослабленным иммунитетом. Следовательно, настоящее изобретение относится к фармацевтическим/ветеринарным композициям и вакцинам для индукции иммунного ответа в живом организме животного, включая человека. Кроме того, изобретение относится к рекомбинантному вектору MVA, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенную детерминанту белка ВЯ, для применения в лечении и/или профилактике заболевания, вызванного ВЯ.

Вакцина предпочтительно содержит любой из описанных в настоящем описании рекомбинантных вирусов MVA, составленных в растворе в диапазоне концентраций от  $10^4$  до  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл, от  $10^5$  до  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, от  $10^6$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл или от  $10^7$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл. Предпочтительная доза для вакцинации человека содержит от  $10^6$  до  $10^9$  TCID<sub>50</sub>, включая дозу  $10^6$  TCID<sub>50</sub>,  $10^7$  TCID<sub>50</sub> или  $10^8$  TCID<sub>50</sub>.

Фармацевтические/ветеринарные композиции согласно настоящему изобретению могут обычно содержать один или более фармацевтически/ветеринарно приемлемых и/или апробированных носителей, добавок, антибиотиков, консервантов, адъювантов, разбавителей и/или стабилизаторов. Такими вспомогательными веществами могут быть вода, физиологический раствор, глицерин, этанол, смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные вещества и т.п. Подходящие носители обычно представляют собой медленно метаболизирующиеся молекулы большого размера, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, аминокислотные полимеры, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты и т.п.

Для получения вакцин рекомбинантные вирусы MVA согласно настоящему изобретению могут быть превращены в физиологически приемлемую форму. Это можно сделать на основе опыта получения поксвирусных вакцин, используемых для вакцинации против оспы, как описано Н. Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974).

Например, очищенные вирусы можно хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$  с титром  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, составленными в около 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, рН 7,4. Для приготовления доз вакцины, например,  $10^2$ - $10^8$  или  $10^2$ - $10^9$  частиц вируса можно лиофилизировать в 100 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в присутствии 2% пептона и 1% альбумина человека в ампуле, предпочтительно в стеклянной ампуле. В качестве альтернативы, дозы вакцины могут быть получены путем ступенчатой сублимационной сушки вируса в препарате. Такая композиция может содержать дополнительные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактоза или поливинилпирролидон, или другие эксципиенты, такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, сывороточный альбумин человека), подходящие для введения *in vivo*. Затем стеклянную ампулу герметизируют и ее можно хранить в диапазоне от  $4^{\circ}\text{C}$  до комнатной температуры в течение нескольких месяцев.

Однако до тех пор, пока нет необходимости в обратном, ампулу предпочтительно хранить при температуре ниже  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для вакцинации или терапии лиофилизат может быть растворен в водном растворе, предпочтительно физиологическом растворе или Трис-буфере, и вводиться системно или местно, т.е. парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или любым другим способом введения, известным специалисту. Способ введения, доза и количество введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области техники известным образом.

Вакцины для применения в гомологичных/гетерологичных прайм-буст схемах.

Вакцины и способы, описанные в настоящем описании, также можно применять как часть гомологичной прайм-буст схемы. При гомологичной прайм-буст проводится первая праймирующая вакцинация, а затем одна или более последующих бустерных вакцинаций. Бустерные вакцинации сконфигурированы для усиления иммунного ответа, полученного в результате первой вакцинации, путем введения того же рекомбинантного поксвируса, который использовался для первой вакцинации.

В одном типичном варианте осуществления изобретения может быть использована гомологичная прайм-буст схема, в которой вектор вируса MVA, как определено в настоящем описании, вводят в первой дозе. Одно или более последующих введений вирусного вектора MVA, как определено в настоящем описании, могут быть осуществлены с целью усиления иммунного ответа, полученного при первом введении. Предпочтительно, одна или более антигенных детерминант являются такими же или сходными с введенными в первый раз.

Рекомбинантные вирусные векторы MVA в соответствии с настоящим изобретением дополнительно можно использовать в гетерологичных прайм-буст схемах в комбинации с другим поксвирусным вектором, причем одну или более первичных праймерных вакцинаций проводят с применением MVA или другого поксвирусного вектора, как определено в настоящем описании, и одну или более последующих бустерных вакцинаций проводят с использованием поксвирусного вектора, не используемого в праймерной вакцинации, например, если вектор MVA, определенный в настоящем описании, вводят в прайм-буст, то последующие бустерные вакцинации будут проводиться с использованием других поксвирусных векторов, и наоборот.

Вакцины и наборы, содержащие рекомбинантные вирусы MVA.

Настоящее изобретение также относится к вакцинам и наборам, содержащим любой один или более рекомбинантных MVA, описанных в настоящем описании. Набор может содержать одну или более емкостей, или флаконов с рекомбинантным MVA вместе с инструкциями по введению рекомбинантного MVA пациенту, подверженному риску инфицирования ВЯ. В некоторых вариантах осуществления изобретения в инструкции указано, что рекомбинантный MVA вводят пациенту в виде одной дозы или нескольких (т.е. 2, 3, 4 и т.д.) доз. В некоторых вариантах осуществления изобретения в инструкции указано, что рекомбинантный вирус MVA вводят при первом (прайминговом) и втором (бустерном) введении наивным или не наивным пациентам. Предпочтительно набор содержит по меньшей мере два флакона для прайм/буст иммунизации, содержащие рекомбинантные MVA, как описано в настоящем описании, для первой прививки ("прайминговая прививка") в первом флаконе/емкости и для по меньшей мере второй и/или третьей и/или последующей прививки ("бустерная прививка") во втором и/или последующем флаконе/емкости.



Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания и практики изобретения, раскрытого в настоящем описании. Предполагается, что описание и примеры следует рассматривать только как типичные, при этом истинный объем и сущность изобретения определяются прилагаемой формулой изобретения.

### Примеры

Подробные примеры, которые приведены ниже, предназначены для содействия лучшему пониманию настоящего изобретения. Однако изобретение не ограничивается примерами. Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания и практики изобретения, раскрытого в настоящем описании.

Пример 1. Конструирование рекомбинантного MVA.

В следующих разделах описана конструкция двух рекомбинантных MVA, содержащих одну или более гетерологичных нуклеиновых кислот, которые экспрессируют антигенную детерминанту белка ВЯ. Все другие конструкции, описанные в настоящем описании, получены с использованием аналогичных способов.

1.1. Клонирование и генерация двух рекомбинантных конструкций MVA-BN®-ВЯ.

Для введения чужеродных генов в геном MVA-BN®, BN был сконструирован набор плазмид. Указанные базовые плазмиды содержат специфические участки генома MVA-BN®, охватывающие делеционные сайты или межгенные участки скелета вируса MVA, промоторы и различные селекционные кассеты. С целью клонирования кандидата для рекомбинантной вакцины MVA-BN®-ВЯ трансгены были вставлены в одну из этих базовых плазмид, в результате чего была получена окончательная рекомбинационная плазида, которую применяли для содействия введению трансгенов в конкретный сайт в геноме MVA посредством гомологичной рекомбинации. Чтобы обеспечить гомологичную рекомбинацию между плазмидой и геномом MVA, первичные клетки ФКЭ были инфицированы MVA-BN®, а затем трансфицированы соответствующими рекомбинационными плазмидами. Во время гомологичной рекомбинации фланкирующие последовательности плазмид рекомбинируют с гомологичными последовательностями инсерционных сайтов в геноме вируса MVA-BN® и направляют плазмидные последовательности в соответствующий сайт. Присутствие селекционных кассет во вставленной последовательности позволяет обеспечить положительную селекцию рекомбинантных вирусов MVA-BN®. После начальной амплификации и 3-4 стадий очистки бляшек в условиях селекции получали рекомбинантный продукт, содержащий трансгены, полученные из ВЯ, и селекционную кассету. С применением дополнительных стадий амплификации и очистки бляшек в условиях без селекции селекционную кассету вырезали и окончательного кандидата для вакцины выделяли. Очищенные клоны из бляшки отбирали и амплифицировали в 2-3 колбах для культуры тканей T175 с целью получения предэталонного вирусного материала, который будет подробно охарактеризован, как описано в разделе 1.2.

Два рекомбинантных кандидата MVA-BN®-ВЯ, в которых протеазу 3С экспрессировали *in trans* с применением отдельных промоторов. 7 трансгенов были вставлены в одну базовую плазмиду, поддерживающую гомологичную рекомбинацию в один из хорошо известных инсерционных сайтов MVA-BN®, описанных выше.

Оптимизация кодонов нуклеотидных последовательностей в предлагаемых конструкциях включает идентификацию и удаление гомологичных последовательностей, которые могут повлиять на стабильность конструкции, и оптимизацию использования кодонов для оптимальной экспрессии трансгенов в соответствующем хозяине. Это было выполнено в сотрудничестве с высококвалифицированной КИО (GeneArt AG, Регенсбург, Германия).

1.2. Генетический анализ рекомбинантного MVA-BN®-ВЯ.

После получения рекомбинантных конструкций MVA-BN®-ВЯ путем гомологичной рекомбинации и очистки бляшек конечные клоны отбирали и амплифицировали в колбах для культуры тканей T175 для получения предэталонного вирусного материала. Наличие рекомбинантных инсерций, правильность инсерции в целевые сайты генома и отсутствие родительского вируса MVA-BN® в предэталонном вирусном материале подтверждали анализом методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Правильная последовательность рекомбинантных вставок была подтверждена анализом последовательности. Секвенирование выполняли для рекомбинантных вставок, включая фланкирующие участки (более 600 п.о. каждая, охватывающие участки гомологичной рекомбинации, содержащиеся в рекомбинационных плазмидах). Вложенную ПЦР проводили для проверки отсутствия селекционных кассет, применяемых в ходе гомологичной рекомбинации.

1.3. Анализ экспрессии и процессинга вставленных белков ВЯ.

После генерации двух жизнеспособных вирусов MVA-BN®-ВЯ их функциональность была доказана путем анализа экспрессированных ими рекомбинантных белков. Экспрессия и процессинг белков ВЯ необходимы для надежной индукции иммунного ответа. BN будет анализировать экспрессию и процессинг методом Вестерн-блоттинга, а способность процессированных белков к взаимодействию - с помощью анализов методом ко-иммунопреципитации. Дальнейший анализ образования VLP оценивали в Центре изучения заболеваний животных Плам-Айленд (ЦИЗЖПА) с применением электронной микро-

скопии. Основывались на этих анализах.

### 1.3.1. Экспрессия и процессинг антигенов: Вестерн-блот.

Вестерн-блоттинг для анализа рекомбинантных белков, экспрессируемых MVA-BN® в различных типах клеток, применяли для обнаружения белков ВЯ по их размеру, а также для относительной оценки уровней экспрессии из соответствующих рекомбинантных векторов MVA-BN®. В зависимости от природы специфического для ВЯ антитела, может быть обнаружена экспрессия нативных или денатурированных белков ВЯ. Поскольку антитела, специфические для неструктурных белков, а также для вирусного ВЯ, коммерчески доступны только для серотипа 01, BN рекомендует применять ВЯ-антитела (серотип A24), поставляемые ЦИЗЖПА. Что касается практического применения, клетки будут инфицированы MVA-B@I-ВЯ при определенном значении множественности заражения (МЗ) и собраны через 24 ч. Экстракты клеток будут подготовлены и проанализированы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Результат анализа подтвердит экспрессию рекомбинантных белков ВЯ и их правильный размер (что указывает на правильный процессинг).

### 1.3.2. Взаимодействие белков: иммунопреципитация (ИП)-Вестерн-блот.

Взаимодействие структурных белков в ходе инфекционного цикла ВЯ имеет важное значение для образования инфекционных, высоко иммуногенных вирусных частиц. Таким образом, желательно образование неинфекционных вирусоподобных частиц (VLP) из экспрессированных MVA-BN® белков ВЯ и требует уточненного технического задания для специфической конструкции и оценки белка для рекомбинантных кандидатов MVA-BN® ВЯ.

Пример 2. Конструирование двух рекомбинантных конструкций MVA-BN-ВЯ (MVA-mBN360B и mBN361A).

Две конструкции, проиллюстрированные на фиг. 1, были получены в качестве кандидатов для экспериментов на животных. Конструкция № 7B была выбрана в качестве кандидата, и было выполнено производство мультивезикулярных телец (МВТ) и продукта деградации фибрина (ПДФ). Рекомбинантные конструкции MVA-BN были получены, как описано в разделе 1.1 выше.

Банк эталонного вируса конструкции № 7B был получен в трех роллер-флаконах в соответствии с СОП Bavarian Nordic. Клетки лизировали, продукт делили на аликвоты и хранили при -80°C до последующего использования. Генетический анализ идентичности, чистоты и отсутствия пустого вектора и селекционной кассеты был подтвержден методами на основе ПЦР и секвенированием. Затем проводили тест на стерильность и тест на основе ПЦР на отсутствие микоплазмы. МВТ MVA-mBN360B (№ 7B) прошел все тесты. Было определено, что титр МВТ-материала составляет  $8,25 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/мл, что считается достаточным для перехода к производству ин-балк субстанции лекарственного средства (БСЛ).

Были завершены испытания качества на материале ПДФ, включая анализ экспрессии (фиг. 2), ко-ИП титрование (фиг. 3), причем результатом последнего был титр  $1,47 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл.

Протеаза 3С и Р1-2АВ экспрессировались MVA-mBN3 60B (конструкция № 7) в клетках HeLa, и лизаты использовали для Вестерн-блоттинга. Специфический для VP2 Вестерн-блоттинг показал, что Р1 процессируется до VP0, что является показателем активности протеазы 3С, а специфический WB-индикатор для VP3 показал, что VP3 эффективно высвобождается из прекурсора Р1 под действием 3С (фиг. 2).

Материал ПДФ конструкции MVA-BN3 60B № 7 использовали для ко-преципитации с конформационно-специфическим антителом против Р1. Специфическая для VP3 полоса была обнаружена с помощью антитела против VP3, что указывает на взаимодействие несвязанного белка VP3 в "надлежащей" конформационной структуре капсида. Обнаружение специфической для VP0 полосы с помощью антитела VP2 указывает на взаимодействие незрелого белка Р0 в "надлежащей" конформационной структуре (фиг. 3).

Пример 3. MVA-BN-ВЯ (MVA-mBN360B) у телят.

Телят иммунизировали в 0 день и на 21 день дозами  $10^9$  TCID<sub>50</sub> MVA-mBN360B. На 4 день животным ввели  $10^4$  БОЕ штамма A24 Cruzeiro и проводили анализ наличия признаков инфекции (язык) и общего заболевания на основе баллов по количеству инфицированных лап на животное.

Баллы заболевания телят, иммунизированных или не иммунизированных вакциной MVA-mBN360B

Группа	Вакцина	№	Генерализованное заболевание (дни после антигенной нагрузки) <sup>В</sup>			
			3	7	10	14
01	Нет	1	2	4	4	4
		2	2	3	3	3
02	MVA-mBN360B	3 <sup>а</sup>	0	0	0	0
		4	0	0	0	0
		5	0	0	0	0

Все вакцинированные животные были полностью защищены от инфекции ВЯ, в то время как ни одно из невакцинированных животных не было защищено.

<sup>а</sup> Животное без поражения языка.

<sup>b</sup> Генерализованное заболевание определяли, как количество лап, инфицированных ВЯ (максимальный балл=4).

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 [последовательность ДНК промотора PrS].

SEQ ID NO: 2 [последовательность ДНК промотора PrS5E: 1x (PrS)+5x (Pr7.5e)].

SEQ ID NO: 3 [последовательность ДНК промотора Pr7.5].

SEQ ID NO: 4 [последовательность ДНК промотора PrLEI-5X-ATI+Pr7.5e].

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту по меньшей мере одного антигена вируса ящура (ВЯ), причем один антиген представляет собой Р1 ВЯ, и другой антиген представляет собой ЗС ВЯ, и причем кДНК, кодирующая ЗС ВЯ, содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из С147Т, С142L, С31А/Л47А и С142Т.

2. Рекомбинантный MVA по п.1, отличающийся тем, что MVA представляет собой вирус MVA-BN или производное, обладающее способностью к репродуктивной репликации *in vitro* в клетках фибробластов куриного эмбриона (ФКЭ), но не обладает способностью к репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCat, клеточной линии остеосаркомы костной ткани человека 143В, линии клеток почки эмбриона человека 293 и клеточной линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa.

3. Рекомбинантный MVA по пп.1, 2, отличающийся тем, что MVA представляет собой MVA-BN, который депонирован в Европейской Коллекции Клеточных Культур Животных (ЕСАСС) под учетным номером V00083008.

4. Рекомбинантный MVA по п.1, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген(ы) ВЯ, представляет собой кДНК, которая кодирует участок Р1 ВЯ, и кДНК, которая кодирует протеазу ЗС ВЯ.

5. Рекомбинантный MVA по пп.1-4, отличающийся тем, что антиген(ы) функционально связан(ы) с последовательностью промотора.

6. Рекомбинантный MVA по п.5, отличающийся тем, что промотор является слабым промотором.

7. Рекомбинантный MVA по пп.5, 6, отличающийся тем, что промотор выбран из группы, состоящей из PrS, PrS5E, Pr7.5, PrLEI, Pr13.5 и PrMVA095R.

8. Композиция для лечения или профилактики заболевания, вызванного ВЯ, содержащая рекомбинантный MVA по пп.1-7 и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент или основу.

9. Применение рекомбинантного MVA по пп.1-7 в лечении или профилактике заболевания, вызванного ВЯ.

10. Применение композиции по п.8 в лечении или профилактике заболевания, вызванного ВЯ.

11. Применение рекомбинантного MVA по пп.1-7 для воздействия на иммунный ответ у пациента.

12. Применение композиции по п.8 для воздействия на иммунный ответ у пациента.

13. Вакцина для профилактики заболевания, вызванного ВЯ, содержащая рекомбинантный MVA по пп.1-7.

14. Клетка, содержащая рекомбинантный MVA по пп.1-7.

15. Применение рекомбинантного MVA по пп.1-7 в качестве вакцины для лечения или профилактики у пациента заболевания, вызванного ВЯ.

16. Применение композиции по п.8 в качестве вакцины для лечения или профилактики у пациента заболевания, вызванного ВЯ.

17. Способ воздействия на иммунный ответ у пациента, включающий введение пациенту рекомбинантного MVA по пп.1-7 и/или композиции по п.8.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что рекомбинантный MVA по пп.1-7 и/или композиция по п.8 предназначены для введения один, два, три или четыре раза.

19. Набор для лечения или профилактики заболевания, вызванного ВЯ, содержащий рекомбинантный MVA по пп.1-7 и/или композицию по п.8 в первом флаконе или емкости для первого введения (праймингового) и во втором флаконе или емкости для второго введения (бустерного).

20. Набор по п.19, содержащий в третьем, четвертом или последующем флаконе или емкости рекомбинантный MVA для третьего, четвертого или последующего введения.

21. Способ получения рекомбинантного вируса MVA по любому из пп.1-7, включающий стадии:

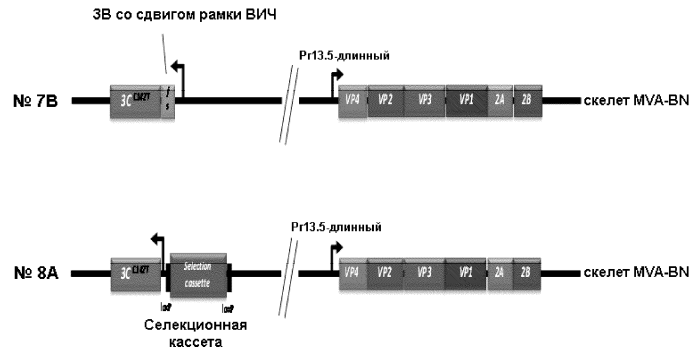
(a) инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным вирусом MVA по пп.1-7,

(b) культивирование инфицированной клетки, и

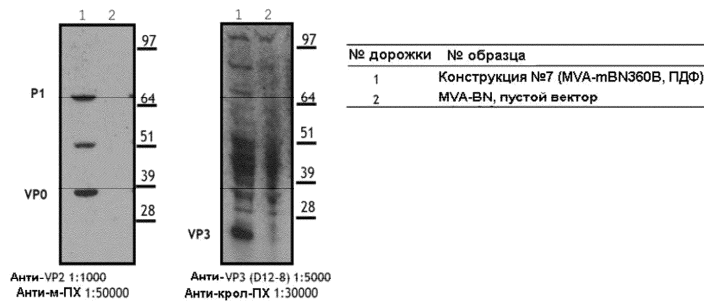
(c) выделение вируса MVA из указанной клетки.

22. Рекомбинантный вирус MVA, полученный способом по п.21.

23. Способ получения рекомбинантного вектора MVA, включающий стадии:
- (а) инфицирование клетки-хозяина вирусом MVA,
  - (б) трансфицирование инфицированной клетки рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту любого из белков по пп.1-7, причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит геномную последовательность вируса MVA, способную направлять интеграцию по меньшей мере одной указанной нуклеотидной последовательности в геном вируса MVA, и
  - (с) идентификация, выделение и необязательная очистка полученного рекомбинантного вируса MVA.
24. Способ получения рекомбинантного вируса MVA, включающий стадии:
- (а) инфицирование клетки-хозяина вирусом MVA,
  - (б) трансфицирование инфицированной клетки рекомбинантным вектором, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенную детерминанту любого из белков ВЯ по пп.1-7, причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит геномную последовательность вируса MVA, способную направлять интеграцию по меньшей мере одной указанной нуклеотидной последовательности в геном вируса MVA, и
  - (с) идентификация, выделение и необязательная очистка полученного рекомбинантного вируса MVA.

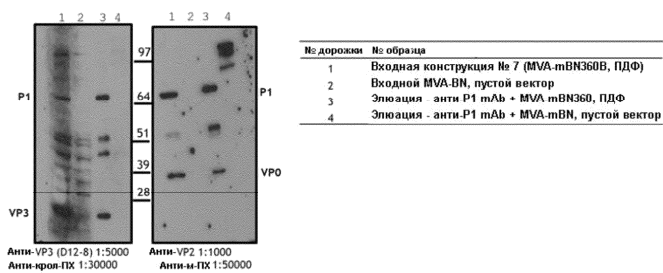


Фиг. 1



Клеточная линия: клетки HeLa  
 Условия инфицирования:  
 MVA-mBN360B № 141, PROD49A13, ПДФ  
 MVA-BN 5PPC MVB17A10  
 МЗ МЗ 10; собраны через 16 час п.и.  
 нанесено 40 мкг/дорожку

Фиг. 2



Клеточная линия: клетки HeLa  
 Условия инфицирования:  
 MVA-mBN360B № 141, PROD49A13, ПДФ  
 MVA-BN 5PPC MVB17A10  
 МЗ МЗ 10; собраны через 16 час п.и.

Условия ИП (инкубация н/н при 4°C)  
 Гранулы: магнитные гранулы 50 мкл белка A/G  
 Антитела: 20 мкг P1Ab (10 мкг на 25 мкл)  
 Лизат: четыре по 6 лунок на ИП лизировали с помощью  
 1 мл 0,5X лизисного буфера; использовали 1 мл лизата на ИП

Фиг. 3

