

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392207 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/76* (2015.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.05.05

(54) КОНСЕНСУСНЫЕ АНТИГЕНЫ ФИЛОВИРУСА, КОНСТРУКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/332,372; 62/402,519; 62/483,979

(32) 2016.05.05; 2016.09.30; 2017.04.11

(33) US

(62) 201892526; 2017.05.05

(71) Заявитель:

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ДЗЕ УИСТАР  
ИНСТИТЮТ ОФ ЭНЭТОМИ  
ЭНД БАЙОЛОДЖИ; ИНОВИО  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Уэйнер Дэвид Б., Пател Ами, Янь  
Цзянь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты молекулы нуклеиновых кислот и композиции, содержащие одну или более нуклеотидных последовательностей, которые кодируют консенсусный гликопротеиновый иммуноген Ebolavirus. Кодирующие последовательности необязательно содержат функционально связанную кодирующую последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Раскрыты способы иммуномодуляции и способы, индуцирующие иммунный ответ против Ebolavirus. Раскрыт способ предупреждения заболевания Ebolavirus и способы лечения индивидов, инфицированных Ebolavirus. Раскрыты консенсусные белки Ebolavirus.

A1

202392207

202392207

A1

**КОНСЕНСУСНЫЕ АНТИГЕНЫ ФИЛОВИРУСА, КОНСТРУКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ  
И ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**  
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/332 372, поданной 5 мая 2016 г.; предварительной заявке США № 62/402 519, поданной 30 сентября 2016 г.; и предварительной заявке США № 62/483 979, поданной 11 апреля 2017 г.; каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к вакцинам для индукции иммунных ответов и предупреждения филовиральной инфекции и/или лечения индивидов, инфицированных филовиралом, в частности инфекцией эболавирусом. Настоящее изобретение относится к консенсусным белкам эболавируса и молекулам нуклеиновых кислот, которые их кодируют.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

*Filoviridae* представляют собой вирусы с несегментированной одноцепочечной РНК, которые включают два различных рода, *Marburgvirus* (MARV) и *Ebolavirus* (EBOV). Члены каждого рода могут вызвать тяжелое и смертельно опасное заболевание геморрагической лихорадкой, от которой не существует лечения или лицензированной вакцины (Bradfute S.B., et al. (2011) *Filovirus vaccines*. *Hum Vaccin* 7: 701-711; Falzarano D., et al. (2011) *Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use*. *Expert Rev Vaccines* 10: 63-77; Fields B.N., et al. (2007) *Fields' virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2 v. (xix, 3091, I-3086 p.); Richardson J.S., et al. (2009) *Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine*. *PLoS One* 4: e5308; and Towner J.S., et al. (2006) *Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola*. *J Virol* 80: 6497-6516).

В связи с уровнями смертности до 90% они были описаны

Всемирной организацией здравоохранения как «одни из наиболее вирулентных вирусных заболеваний, известных человечеству». Центр по профилактике и контролю заболеваемости США классифицировал их как «Агенты биологического терроризма категории А» частично вследствие их потенциальной угрозы для национальной безопасности при создании оружия на их основе (Burki T.K. (2011) USA focuses on Ebola vaccine but research gaps remain. *Lancet* 378: 389). Данные агенты с «высоким приоритетом» теоретически легко могут передаваться, что обеспечивает в результате высокие уровни смертности, вызывать масштабное влияние на общественное здоровье и панику, и требуют особых действий для подготовленности общественного здоровья (CDC (2011) *Bioterrorism Agents/Diseases*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention).

Заболевания геморрагической лихорадки представляют собой острые инфекционные заболевания без состояния носительства, несмотря на то, что они легко передаются между людьми и приматами кроме человека при непосредственном контакте с зараженными биологическими жидкостями, кровью и тканью (Feldmann H., et al. (2003) Ebola virus: from discovery to vaccine. *Nat Rev Immunol* 3: 677-685). В ходе вспышек повторное применение медицинского оборудования, учреждений здравоохранения с ограниченными ресурсами и несвоевременное применения профилактических мероприятий обеспечивают повышение передачи заболевания, что обеспечивает распространение инфекций в медицинских учреждениях.

Поскольку природными резервуарами данных зоонозных патогенов вероятнее всего являются африканские летучие мыши и свиньи (Kobinger G.P., et al. (2011) Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs. *J Infect Dis* 204: 200-208), последние, вероятно, являются более распространяющими хозяевами, и считается, что способ, при помощи которого вирус впервые возникает в начале вспышки, заключается в контакте человека с инфицированным животным. Непредсказуемое эндемическое распространение данного заболевания на Филиппинах, потенциально в Европе и прежде всего в Африке дополнительно составляет основную проблему для общественного здоровья

(Outbreak news. (2009) Ebola Reston in pigs and humans, Philippines. *Wkly Epidemiol Rec* 84: 49-50).

Для определения способности вакцины индуцировать защитную эффективность и CTL широкого спектра проводили эксперименты, в том числе эксперименты в доклинических исследованиях на грызунах. (Fenimore PW, et al. (2012). Designing and testing broadly-protective filoviral vaccines optimized for cytotoxic T-lymphocyte epitope coverage. *PLoS ONE* 7: e44769; Hensley LE, et al. (2010). Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog* 6: e1000904; Zahn R, et al (2012). Ad35 and ad26 vaccine vectors induce potent and cross-reactive antibody and T-cell responses to multiple filovirus species. *PLoS ONE* 7: e44115; Geisbert TW, Feldmann H (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis* 204 Suppl 3: S1075-1081; and Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS (2012). A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother* 8; Grant-Klein RJ, Altamura LA, Schmaljohn CS (2011). Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Res* 162: 148-161).

Индуцированные вакциной адаптивные иммунные ответы были описаны на многочисленных доклинических животных моделях. (Blaney JE, et al. (2011). Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol* 85: 10605-10616; Dowling W, et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* 81: 1821-1837; Jones SM, et al. (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11: 786-790; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. *Virol J* 6: 132; Kobinger GP, et al. (2006). Chimpanzee

adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* **346**: 394-401; Olinger GG, et al. (2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by Venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. *J Virol* **79**: 14189-14196; Rao M, Bray M, Alving CR, Jahrling P, Matyas GR (2002). Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J Virol* **76**: 9176-9185; Rao M, Matyas GR, Grieder F, Anderson K, Jahrling PB, Alving CR (1999). Cytotoxic T lymphocytes to Ebola Zaire virus are induced in mice by immunization with liposomes containing lipid A. *Vaccine* **17**: 2991-2998; Richardson JS, et al. (2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One* **4**: e5308; Vanderzanden L, et al (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **246**: 134-144; Warfield KL, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **175**: 1184-1191; Jones SM, et al. (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **196 Suppl2**: S404-412 Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS (2012). A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother* **8**.; Geisbert TW, et al. (2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. *J Virol* **84**: 10386-10394.)

Вирусные вакцины были перспективными и они в основном включали рекомбинантные аденовирусы и вирусы везикулярного стоматита. Неинфекционные стратегии, например вакцины на основе рекомбинантной ДНК и Ag-связанных вирусоподобных частиц (VLP), также продемонстрировали уровни доклинической эффективности и в целом считались более безопасными, чем платформы на основе вируса. Вирус-специфические Ab, при применении в пассивном

лечении, могут иметь защитные свойства при применении либо до, либо сразу после инфицирования (Gupta M, Mahanty S, Bray M, Ahmed R, Rollin PE (2001). Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola virus infection without complete inhibition of viral replication. *J Virol* **75**: 4649-4654; Marzi A, et al. (2012). Protective efficacy of neutralizing monoclonal antibodies in a nonhuman primate model of Ebola hemorrhagic fever. *PLoS ONE* **7**: e36192; Parren PW, Geisbert TW, Maruyama T, Jahrling PB, Burton DR (2002). Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *J Virol* **76**: 6408-6412; Qiu X, et al. (2012). Ebola GP-Specific Monoclonal Antibodies Protect Mice and Guinea Pigs from Lethal Ebola Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1575; Wilson JA, et al. (2000). Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* **287**: 1664-1666; Sullivan NJ, et al. (2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med* **17**: 1128-1131; Bradfute SB, Warfield KL, Bavari S (2008). Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **180**: 4058-4066; Warfield KL, Olinger GG (2011). Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 984241). Также было показано, что Т-клетки обеспечивают защиту на основании исследований, осуществляемых на нокаутированных мышах, исследованиях истощения в NHP и исследований адоптивного переноса на мышах, в которых эффективность была в значительной степени связана с литической функцией адоптивно переносимых CD8+ Т-клеток. Тем не менее, сообщалось о недостаточно подробном анализе данного ответа, обеспечиваемого защитной вакциной.

Разработка мер противодействия в конечном итоге требует улучшенного понимания защитных иммунных корреляций и того, каким образом они модулируются в ходе инфекции. Это оказывается сложным при инфицирования индивидов, которые поддаются филловирусному заболеванию и не в состоянии установить ранний

иммунный ответ. Данные быстро развивающиеся заболевания геморрагической лихорадки обеспечивают иммунную дисрегуляцию, что показано отсутствием вирус-специфического ответа Ab и значительным снижением общего количества Т-клеток, что приводит к неконтролируемой репликации вируса, инфицированию и полиорганной недостаточности. С другой стороны, выжившие после заболевания вирусом Эбола (EBOV) организмы демонстрируют ранний и временный ответ IgM, за которым стремительно следуют повышенные уровни вирус-специфических IgG и CTL. Данные наблюдения дают основание предполагать, что гуморальный и клеточно-опосредованный иммунные ответы играют определенную роль в обеспечении защиты от заболевания. Эти данные также поддерживаются многочисленными доклиническими исследованиями эффективности, демонстрирующими вклад индуцированного вакциной адаптивного иммунитета в защиту от смертельного контрольного заражения. Тем не менее, растущее количество доказательств продемонстрировало критическую роль Т-клеток в обеспечении защиты, когда эффективность была в значительной степени связана с функциональным фенотипом CD8+ Т-клеток. Хотя эти недавние исследования подчеркивают важность Т-клеток в обеспечении защиты, их точный вклад остается не охарактеризованным и противоречивым. Кроме того, сообщалось о недостаточно подробном анализе данного ответа, обеспечиваемого защитной вакциной.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Представлены выделенные молекулы нуклеиновых кислот, содержащие одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген эболовируса Заир (ZEBOVCON), нуклеиновую кислоту, кодирующую второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген эболовируса Заир (ZEBOVCON2), или нуклеиновую кислоту, кодирующую оболочечный гликопротеиновый иммуноген ZEBOV (ZEBOVGUI) вспышки в Гвинее в 2014.

В одном варианте осуществления ZEBOVCON содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична SEQ ID NO:1, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 95% гомологичен

SEQ ID NO:1, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% гомологична SEQ ID NO:1, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 99% гомологичен SEQ ID NO:1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или фрагмент SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления ZEBOVCON2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична SEQ ID NO:68, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 95% гомологичен SEQ ID NO:68, аминокислотную последовательность которая по меньшей мере на 99% гомологична SEQ ID NO: 68, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 99% гомологичен SEQ ID NO: 68, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или фрагмент SEQ ID NO: 68.

В одном варианте осуществления ZEBOVGUI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична SEQ ID NO:67, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 95% гомологичен SEQ ID NO:67, аминокислотную последовательность которая по меньшей мере на 99% гомологична SEQ ID NO: 67, фрагмент аминокислотной последовательности, который по меньшей мере на 99% гомологичен SEQ ID NO: 67, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или фрагмент SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления фрагменты содержат по меньшей мере 600 аминокислот, по меньшей мере 630 аминокислот или по меньшей мере 660 аминокислот.

В одном варианте осуществления ZEBOVCON соединен с сигнальным пептидом IgE. В одном варианте осуществления ZEBOVCON2 соединен с сигнальным пептидом IgE. В одном варианте осуществления ZEBOVGUI соединен с сигнальным пептидом IgE.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVCON, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% гомологичную SEQ ID NO:64, или ее фрагмент. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVGUI, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% гомологичную SEQ ID NO:69 или SEQ ID

NO:72, или ее фрагмент. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVCON2, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% гомологичную SEQ ID NO:70, или ее фрагмент.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVCON, содержит нуклеиновую кислоту, транскрибируемую из последовательности ДНК, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO:64, или ее фрагмент. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVGUI, содержит нуклеиновую кислоту, транскрибируемую из последовательности ДНК, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO:69 или SEQ ID NO:72, или ее фрагмент. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ZEBOVCON2, содержит нуклеиновую кислоту, транскрибируемую из последовательности ДНК, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO:70, или ее фрагмент.

Также представлена композиция, содержащая одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих один или более из ZEBOVCON, ZEBOVCON2 и ZEBOVGUI. В одном варианте осуществления композиция содержит две или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих два или более из ZEBOVCON, ZEBOVCON2 и ZEBOVGUI. В одном варианте осуществления композиция содержит две молекулы нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления композиция содержит три или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих ZEBOVCON, ZEBOVCON2 и ZEBOVGUI. В одном варианте осуществления композиция содержит три молекулы нуклеиновой кислоты.

В настоящем изобретении также представлена новая последовательность для получения иммуногенов в клетках млекопитающего или вирусных векторах.

Представлена композиция, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005

года. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON), фрагмент SEQ ID NO:1, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:1, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:1. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:1. Фрагменты SEQ ID NO:1 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:2 (SUDV CON), фрагмент SEQ ID NO:2, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:2, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:2. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:2. Фрагменты SEQ ID NO:2 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:2, как правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года может представлять собой SEQ ID NO:3 (MARV ANG), фрагмент SEQ ID NO:3, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:3, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:3. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:3, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:3. Фрагменты SEQ ID NO:3 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:3, как правило, составляют 600 или более, 637 или более, или 670 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность

может необязательно содержать лидерные последовательности, например лидерную последовательность IgE.

Также представлена композиция, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON), фрагмент SEQ ID NO:1, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:1, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:1. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:1. Фрагменты SEQ ID NO:1 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:2 (SUDV CON), фрагмент SEQ ID NO:2, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:2, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:2. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:2. Фрагменты SEQ ID NO:2 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:2, как

правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность первого консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* может представлять собой SEQ ID NO:4 (MARV RAV), фрагмент SEQ ID NO:4, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:4, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:4. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:4, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:4. Фрагменты SEQ ID NO:4 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:4, как правило, составляют 600 или более, 637 или более, или 670 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность второго консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* может представлять собой SEQ ID NO:5 (MARV OZO), фрагмент SEQ ID NO:5, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:5, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:5. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:5, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:4. Фрагменты SEQ ID NO:5 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:5, как правило, составляют 600 или более, 637 или более, или 670 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность третьего консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* может представлять собой SEQ ID NO:6 (MARV MUS), фрагмент SEQ ID NO:6, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:6, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:6. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:6, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:6. Фрагменты SEQ ID NO:6 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:6, как

правило, составляют 600 или более, 637 или более, или 670 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность может необязательно содержать лидерные последовательности, например лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года может представлять собой SEQ ID NO:3 (MARV ANG), фрагмент SEQ ID NO:3, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:3, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:3. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:3, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:3. Фрагменты SEQ ID NO:3 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:3, как правило, составляют 600 или более, 637 или более, или 670 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность может необязательно содержать лидерные последовательности, например лидерную последовательность IgE.

Также представлена композиция, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON), фрагмент SEQ ID NO:1, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:1, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:1. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:1. Фрагменты SEQ ID NO:1 или фрагменты

аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus* может представлять собой SEQ ID NO:2 (SUDV CON), фрагмент SEQ ID NO:2, аминокислотную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:2, или фрагмент аминокислотной последовательности, который гомологичен SEQ ID NO:2. Аминокислотные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:1, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:2. Фрагменты SEQ ID NO:2 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:2, как правило, составляют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот. Аминокислотная последовательность может необязательно содержать лидерные последовательности, например лидерную последовательность IgE.

Представлена композиция, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, может представлять собой SEQ ID NO:64, фрагмент SEQ ID NO:64, нуклеотидную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:64, или фрагмент нуклеотидной последовательности, которая гомологична SEQ ID NO:64. Нуклеотидные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:64, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:64. Фрагменты SEQ ID NO:64 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:64, как правило, кодируют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот

консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus*, кодированного SEQ ID NO:64. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, может представлять собой SEQ ID NO:65, фрагмент SEQ ID NO:65, нуклеотидную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:65, или фрагмент нуклеотидной последовательности, которая гомологична SEQ ID NO:65. Нуклеотидные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:65, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:65. Фрагменты SEQ ID NO:65 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:65, как правило, кодируют 600 или более, 630 или более, или 660 или более аминокислот консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus*, кодированного SEQ ID NO:65. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, может представлять собой SEQ ID NO:66, фрагмент SEQ ID NO:66, нуклеотидную последовательность, которая гомологична SEQ ID NO:66, или фрагмент нуклеотидной последовательности, которая гомологична SEQ ID NO:66. Нуклеотидные последовательности, которые гомологичны SEQ ID NO:66, как правило, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 99% или более, или 99% или более гомологичны SEQ ID NO:66. Фрагменты SEQ ID NO:66 или фрагменты аминокислотных последовательностей, которые гомологичны SEQ ID NO:66, как правило, кодируют 600 или более, 630 или более, или 670 или более аминокислот консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, кодированного SEQ ID NO:66. Нуклеотидные последовательности могут необязательно включать последовательности, которые кодируют лидерные последовательности, например лидерную последовательность IgE, связанную с последовательностями, кодирующими иммуногены.

Каждая из различных нуклеотидных последовательностей может находиться на одной молекуле нуклеиновой кислоты, может

находиться на отдельных молекулах нуклеиновых кислот или различных пермутациях. Молекулы нуклеиновых кислот могут представлять собой плазмиды.

Композиция может быть составлена для доставки индивиду с использованием электропорации.

Композиция может дополнительно содержать нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: IL-12, IL-15 и IL-28.

Композицию можно применять в способах индуцирования иммунного ответа в отношении филовirusа. Филовirus может быть выбран из группы, состоящей из: Марбургvirusа, Эболавirusа Судан и Эболавirusа Заир.

Представлены способы лечения индивида, у которого был диагностирован филовirus, включающие введение индивиду терапевтически эффективного количества композиции. Филовirus может быть выбран из группы, состоящей из: Марбургvirusа, Эболавirusа Судан и Эболавirusа Заир.

Представлен способ предупреждения инфекции филовirusа у индивида. Способы включают введение индивиду профилактически эффективного количества композиции. Филовirus может быть выбран из группы, состоящей из: Марбургvirusа, Эболавirusа Судан и Эболавirusа Заир.

Представлены композиции, содержащие два или более белков, выбранных из группы, состоящей из: консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А-1С относятся к стратегии с конструкцией поливалентной вакцины и экспериментам по экспрессии в примере 1. На фиг. 1А показаны филогенетические схемы для MGP (сверху), SGP

(внизу справа) и ZGP (внизу слева). Показаны значимые поддерживающие значения (\*), что подтверждается бутстреп-анализом. Для иммуногенов ZGP и SGP (CON VACCINE) была принята консенсусная стратегия. Масштабные шкалы обозначают удаление аминокислот на область, и анализы проводили с использованием программного обеспечения *MEGA* версии 5. Трансгены GP были коммерчески синтезированы, генетически оптимизированы и субклонированы в модифицированные pVAX1 векторы экспрессии млекопитающих. Экспрессию антигена анализировали после трансфекции клеток НЕК 293Т посредством Вестерн-иммуоблоттинга и FACS. Результаты Вестерн-иммуоблоттинга показаны на фиг. 1B, а результаты FACS показаны на фиг. 1C. Для сравнительного контроля последовательно анализировали rVSV, эспрессирующий MGP, SGP или ZGP, с каждым образцом GP, и для определения применяли видоспецифичные mAb к GP1. Указан размер (кДа). Для FACS трансфицированные клетки опосредованно окрашивали с помощью полученных из мышей GP-специфических сывороточных реагентов с последующим длительным промыванием и антител козы к мышиным IgG и МНС класса I. Эксперименты Вестерн-иммуоблоттинга и FACS повторяли по меньшей мере трижды со сходными результатами. Значимость для некорневых филогенетических схем определяли посредством способа максимального правдоподобия и подтверждали посредством бутстреп-анализа, а значения значимой поддержки ( $\geq 80\%$ ; 1000 бутстреп-репликатов) определяли посредством программного обеспечения *MEGA* версии 5.

На фиг. 2A-2H показаны результаты экспериментов в примере 1, в котором наблюдается полная защита от контрольного заражения MARV и ZEBOV. Данные выживаемости животных показаны на фиг. 2A и фиг. 2E. На фиг. 2A показаны результаты вакцинированных трехвалентной вакциной животных, выживших после контрольного заражения MARV, тогда как все контрольные животные погибали до дня 10. На фиг. 2E показаны результаты вакцинированных трехвалентной вакциной животных, выживших после контрольного заражения ZEBOV, тогда как все контрольные животные погибали до дня 7. Данные для % изменения веса тела для вакцинированного и

контрольного животного показаны на фиг. 2В для вакцинированных животных, зараженных MARV. Ось у указывает изменение веса тела, как показано на фиг. 2Г. Светлая сплошная линия обозначает вакцинированных трехвалентной вакциной животных. Светлая пунктирная линия обозначает TriAVE, средние результаты для вакцинированных трехвалентной вакциной животных. Темная сплошная линия обозначает контрольных животных. Темная пунктирная линия обозначает контрольные AVE, средние результаты для контрольных животных. Светлые сплошные линии и светлые пунктирные линии остаются постоянными на графике в дни после контрольного заражения, что указывает на отсутствие значимой потери веса среди вакцинированных животных. Темные сплошные линии и темные пунктирные линии снижаются на графике от дней 0-9 после контрольного заражения, заканчиваясь крестиком, который указывает на животных, которые погибли вследствие заболевания до дня 10. Данные для % изменения веса тела для вакцинированного и контрольного животного показаны на фиг. 2Г для вакцинированных животных, зараженных ZEBOV. Ось у показывает изменение веса тела в процентах. Светлая сплошная линия обозначает вакцинированных трехвалентной вакциной животных. Светлая пунктирная линия обозначает TriAVE, средние результаты для вакцинированных трехвалентной вакциной животных. Темная сплошная линия обозначает контрольных животных. Темная пунктирная линия обозначает контрольные AVE, средние результаты для контрольных животных. Светлые сплошные линии и светлые пунктирные линии остаются постоянными на графике в дни после контрольного заражения, что указывает на отсутствие значимой потери веса среди вакцинированных животных. Темные сплошные линии и темные пунктирные линии снижаются на графике от дней 0-6 после контрольного заражения, заканчиваясь крестиком, который указывает на животных, которые погибли вследствие заболевания до дня 8. ( $n=3$  для grMARV и  $n=6$  для grZEBOV). Связывающие Ab (фиг. 2С и фиг. 2Г) и NAb (фиг. 2D и фиг. 2H) измеряли в сыворотке, полученной от вакцинированных животных, до (Pre) и после первой (1X) и второй (2X) иммунизаций. Анализ проводили на смешанной сыворотке (фиг. 2H).  $*p < 0,1$ ;  $***p < 0,001$ ;  $****p <$

0,0001.

На фиг. 3А-3С показаны результаты примера 1, демонстрирующие индукцию нейтрализующих Ab. В-клеточные ответы оценивали у мышей (n=5/группу) через 20 дней после каждой из двух вакцинаций с трехнедельным перерывом между инъекциями 40 мкг при вакцинациях E-DNA. На фиг. 3А показаны сывороточные GP-специфические IgG-ответы от вакцинированных мышей (сплошные линии) или мышей до иммунизации (точечные линии), измеренные посредством ELISA. Данные обобщены на фиг. 3В. Все ответы от иммунизированных с помощью pEBOS и pEBOZ животных измеряли в отношении очищенных на сахарозе ZGP, поскольку SGP был недоступен для данного исследования. IgG-ответы от иммунизированных pMARV мышей измеряли в отношении MARV-Ozolin GP или с отрицательным контролем очищенного на сахарозе белка Nipah G, нейтрализационную активность образцов сыворотки измеряли в отношении ZEBOV-EGFP, SUDV-Boniface и MARV-Angola в отделении BSL-4 и титры NAb показаны на фиг. 3С. NAb в отношении SUDV-Boniface анализировали на основании цитопатического эффекта (CPE) для клеток CV-1, и цитопатический эффект относительно MARV-Angola анализировали с использованием иммунофлуоресцентного анализа. Средние значения показаны на фиг. 3В и фиг. 3С и столбики ошибок представляют стандартные ошибки среднего (SEM). Анализы групп завершали посредством связанного двустороннего критерия Стьюдента для одной выборки. Эксперименты повторяли по меньшей мере дважды со сходными результатами и \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

На фиг. 4А-4D показано отношение к Т-клеточным ответам широким спектром, обеспечиваемым посредством вакцинации. На фиг. 4А мышей H-2<sup>b</sup> (светлые столбики) и H-2<sup>d</sup> (темные столбики) (n=5/группу) дважды иммунизировали одной из ДНК pMARV, pEBOS или pEBOZ, и ответы IFN $\gamma$  измеряли посредством анализа IFN $\gamma$  ELISPOT. Спленоциты, собранные через 8 дней после второй иммунизации, инкубировали в присутствии отдельных пептидов GP (15-меры, перекрывающиеся по 9 аминокислотам), и результаты показаны в виде графиков из составных прямоугольников. Содержащие эпитопы

пептиды идентифицировали ( $\geq 10$  бляшек AVE и частота ответа  $\geq 80\%$ ), подтверждали посредством проточной трифторметил и характеризовали в популяции общих активированных IFN $\gamma$ + и CD44+ CD4+ и/или CD8+ Т-клеток (таблицы 1-6), а количества пептидов положительных индуцирующих факторов указаны над столбиками. Пептиды, содержащие только эпитопы CD4+, только эпитопы CD8+ (\*) и двойные эпитопы CD4+ и CD8+ (\*\*), пронумерованы. Предполагаемые общие и/или частичные эпитопы были исследованы в отношении последовательных положительных пептидных ответов (таблицы 1-6). На фиг. 4B показаны графики аминокислотного сходства, в которых сравниваются последовательности GP от вирусов MARV, SUDV и ZEBOV, показанных на фиг. 1A. Фиг. 4C представляет собой диаграмму, демонстрирующую предполагаемые домены внутри ZEBOV GP (GenBank №VGP\_EBOZM). SP, сигнальный пептид; RB, рецепторное связывание; MUC, муциноподобная область; FC, участок отщепления фурина; TM, трансмембранная область. На фиг. 4D общие субдоминантные (более темный оттенок) и иммунодоминантные (более светлый оттенок) Т-клеточные эпитопные ответы изображены в виде процентного соотношения общего IFN $\gamma$  ответа, образованного каждой вакциной. Эксперименты повторяли по меньшей мере дважды со сходными результатами.

На фиг. 5A-5D показаны данные из эксперимента для оценки индуцированных защитной «однодозовой» вакцинацией нейтрализующих Ab и CTL. Мышей H-2<sup>k</sup> (n=10/группу) вакцинировали один раз внутримышечно с помощью pEBOZ E-DNA, а затем через 28 дней заражали с помощью 1000 LD<sub>50</sub> mZEBOV в отделении BSL-4. Мышей взвешивали каждый день и наблюдали за прогрессированием заболевания. Данные о выживаемости животных представлены на фиг. 5A. Вакцинированные животные выживали после контрольного заражения, тогда как контрольные животные погибали до дня 7. На фиг. 5B показаны данные для % изменения веса тела у зараженных животных. Данные об иммунизированных животных показаны в виде сплошной светлой линии; средние данные для иммунизированных животных показаны в виде пунктирной светлой линии. Данные о контрольных животных показаны в виде сплошной темной линии;

средние данные для контрольных животных показаны в виде пунктирной темной линии. Светлые сплошные линии и светлые пунктирные линии остаются неизменными в диапазоне от приблизительно 85%-120% на графике в дни после контрольного заражения, что указывает на отсутствие значительной потери веса среди вакцинированных животных. Темные сплошные линии и темные пунктирные линии снижаются на графике от дней 0-6 после контрольного заражения, заканчиваясь крестиком, который указывает на животных, которые погибли вследствие заболевания до дня 7. NAb измеряли до заражения; данные показаны на фиг. 5C. Т-клеточные ответы после одной иммунизации pEBOZ, измеренные посредством FACS, обобщены в виде AVE % от общего показателя CD44+/IFN $\gamma$ + CD4+ (темные) или CD8+ (светлые) клеток на фиг. 5D. Оценивали эффекторные маркеры типа T<sub>h</sub>1 (TNF и T-bet) и данные для CD44+/IFN $\gamma$ + CD4+ и CD8+ Т-клеток сравнивали с общими данными для Т-клеток, которые были следующими: Для всех клеток: TNF 2,9 $\pm$ 0,8, T-bet 13,0 $\pm$ 1,1. Для CD4+/CD44+/IFN $\gamma$ + клеток: TNF 61,4 $\pm$ 3,1, T-bet 72,6 $\pm$ 2,0. Для CD8+/CD44+/IFN $\gamma$ + клеток: TNF 33,0 $\pm$ 3,3, T-bet 99,2 $\pm$ 1,4 (\* $p$  < 0,1; \*\*\* $p$  < 0,001; \*\*\*\* $p$  < 0,0001). Анализы групп завершали посредством связанного двустороннего критерия Стьюдента для одной выборки и кривые выживаемости анализировали посредством логарифмического рангового теста (Мантеля-Кокса). Эксперименты осуществляли дважды со сходными результатами и столбики ошибок представляют SEM.

На фиг. 6 показано GP-специфическое гейтирование Т-клеток, раскрытое в примере 1.

На фиг. 7А и 7В показано, что эксперименты по вакцинации в примере 1 обеспечивали возникновение устойчивых Т-клетки.

На фиг. 8А и 8В показана индукция образования Т-клеток посредством «однодозовой» вакцинации, раскрытой в примере 1.

На фиг. 9 изображена стратегия вакцинации против вируса Эбола. Гликопротеины вируса Эбола представляют собой основную мишень для вакцин. В настоящее время на клинических испытаниях находятся три вакцины, которые являются иммуногенно защищающими для приматов кроме человека (NHP) и характеризуются однодозовой

защитой. Тем не менее, данные вакцины обеспечивают иммунитет против векторов, демонстрируют побочные реакции в клинических исследованиях с привлечением людей, имеют неопределенную длительность вторичного иммунного ответа и могут быть непригодны для всех популяций.

Фиг. 10 относится стратегии с конструкцией и составом вакцины на основе гликопротеина EBOV и экспериментов по экспрессии в примере 7.

На фиг. 11 показаны результаты экспериментов в примере 7, демонстрирующие, что одна иммунизация ДНК-вакциной является иммуногенной для мышей.

На фиг. 12 показаны результаты примера 7, демонстрирующие, что одна иммунизация полностью защищает мышей от смертельного контрольного заражения адаптированным к мышам вирусом Эбола.

На фиг. 13 показаны результаты примера 7, демонстрирующие, что отдельные конструкции GP ДНК-вакцины индуцируют устойчивые вторичные иммунные ответы у мышей.

На фиг. 14 показаны результаты примера 7, демонстрирующие эффективность GP ДНК-вакцин у приматов кроме человека.

На фиг. 15 показаны результаты примера 7, демонстрирующие, что составы GP ДНК-вакцин являются иммуногенными для NHP.

На фиг. 16 показаны результаты примера 7, демонстрирующие, что составы GP ДНК-вакцин защищают от смертельного контрольного заражения вирусом Эбола Заир (Makona).

На фиг. 17 показана стратегия клинического исследования EBOV-001 фазы I (NCT02464670).

На фиг. 18 показаны результаты примера 7, демонстрирующие сероконверсию EBOV-001 в клиническом исследовании фазы I.

На фиг. 19 показаны результаты примера 7, демонстрирующие индукцию GP-специфических Т-клеточных ответов против вируса Эбола (ELISpot) у показательных пациентов.

На фиг. 20 показаны результаты примера 7, демонстрирующие сравнение с другими платформами вакцин против вируса Эбола, в данный момент находящихся на клинических испытаниях.

На фиг. 21 показаны описания когорт и демографические данные когорт для экспериментов ELISA в примере 8.

На фиг. 22 показаны результаты примера 8, демонстрирующие титры ELISA по когортам и временным точка для когорт 1-3.

На фиг. 23 показаны результаты примера 8, демонстрирующие титры ELISA по когортам и временным точка для когорт 4 и 5.

На фиг. 24 показаны результаты примера 8, демонстрирующие сводные данные по ELISA для всех когорт.

На фиг. 25 показаны описания когорт и демографические данные когорт для экспериментов ELISpot в примере 8.

На фиг. 26 показаны результаты примера 8, демонстрирующие ответы субъектов по пептидным пулам для когорты 1.

На фиг. 27 показаны результаты примера 8, демонстрирующие ответы субъектов по пептидным пулам для когорты 2.

На фиг. 28 показаны результаты примера 8, демонстрирующие ответы субъектов по пептидным пулам для когорты 3.

На фиг. 29 показаны результаты примера 8, демонстрирующие ответы субъектов по пептидным пулам для когорты 4.

На фиг. 30 показаны результаты примера 8, демонстрирующие ответы субъектов по пептидным пулам для когорты 5.

На фиг. 31 показаны результаты примера 8, демонстрирующие сводные данные ELISpot по когортам.

На фиг. 32 показаны результаты примера 8, демонстрирующие сводные данные ELISpot по когортам.

На фиг. 33 показаны результаты примера 8, демонстрирующие анализ пациентов, ответивших на лечение вакциной, для всех субъектов.

На фиг. 34 показаны результаты примера 8, демонстрирующие анализ пациентов, ответивших на лечение, для субъектов с удаленными резко отличающимися от начального уровня значениями.

На фиг. 35 показаны описания когорт и демографические данные когорт для экспериментов ICS в примере 8.

На фиг. 36 показаны результаты примера 8, демонстрирующие анализ Вилкоксона для двух выборок на основании когорты для эксперимента ICS.

На фиг. 37 показаны результаты примера 8, демонстрирующие анализ ICS цитокинов в CD4+ Т-клетках для когорты 3 (INO4201 ID).

На фиг. 38 показаны результаты примера 8, демонстрирующие анализ ICS цитокинов в CD8+ Т-клетках для когорты 3.

На фиг. 39 показаны результаты примера 8, демонстрирующие подробный анализ пациентов, ответивших на лечение вакциной, для каждого субъекта в когортах 1-3.

На фиг. 40 показаны результаты примера 8, демонстрирующие подробный анализ пациентов, ответивших на лечение вакциной, для каждого субъекта в когортах 4-5.

На фиг. 41 показаны результаты примера 8, демонстрирующие медианные ответы по когортам и пулам.

На фиг. 42 показаны результаты примера 8, демонстрирующие средние ответы по когортам и пулам.

На фиг. 43 показаны результаты, демонстрирующие, что двухвалентные и трехвалентные ДНК-вакцины обеспечивают длительные иммунные ответы *in vivo* у яванских макаков. Сыворотку и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) собирали через 2 недели после каждой инъекции ДНК и через месяц после конечной инъекции. Общие конечные титры IgG против Guinea-GP и Mayinga-GP анализировали посредством ELISA. Клеточные иммунные ответы против GP вируса Эбола после иммунизации ДНК. PBMC собирали от NHP и анализировали посредством ELISPOT-IFN $\gamma$  для Т-клеточных ответов после стимуляции пулами пептидов GP.

На фиг. 44, включающей фиг. 44А-фиг. 44С, показаны результаты, демонстрирующие защиту у яванских макаков с помощью двухвалентных и трехвалентных ДНК-вакцин против смертельного контрольного заражения EBOV. Фиг. 44А) Выживаемость. Животных заражали 1000 TCID<sub>50</sub> смертельного Guinea Makona C07 EBOV, и выживаемость наблюдали в течение 28 дней после контрольного заражения, фиг. 44В) Клиническая оценка. Клинические проявления заболевания наблюдали в течение всего курса инфицирования. Фиг. 44С) Вирусная нагрузка. Вирусемию в течение курса инфицирования анализировали в крови посредством анализа TCID<sub>50</sub>.

На фиг. 45 показано количественное определение посредством ELISA с использованием набора ADI с IgG человека против гликопротеина вируса Эбола Заир для оценки количества ZEBOV-

специфического антитела IgG в сыворотке каждого вакцинированного субъекта при включении в исследование и через 2 недели после каждой иммунизации. Статистические анализы осуществляли с использованием двухстороннего рангового критерия Вилкоксона.

На фиг. 46 показан ответ в виде интерферон гамма по ELISpot. РВМС выделяли из вакцинированных субъектов при включении в исследование и через 2 недели после каждой иммунизации и стимулировали пептидами вируса Эбола, охватывающими полноразмерный GP в анализе IFN $\gamma$  ELISpot. График представляет EBOV-GP-специфические бляшкообразующие единицы на миллион РВМС. Линии внутри прямоугольников представляют медианный ответ. Отдельные точки представляют резко отличающиеся данные.

На фиг. 47 изображены результаты эксперимента, демонстрирующие длительную иммуногенность, обеспечиваемую составами ДНК-вакцин против GP вируса Эбола у приматов кроме человека (NHP). Устойчивые ответы антител наблюдаются более чем через 6 месяцев после вакцинации.

На фиг. 48 изображено исследование вторичного иммунного ответа при внутримышечной доставке GP ДНК-вакцины против EBOV. NHP иммунизировали в течение периода 3 месяцев с помощью составов двухвалентной или трехвалентной GP ДНК-вакцины против EBOV. Иммунные ответы наблюдались в течение 12 месяцев после конечной дозы. Бустерную иммунизацию по прошествии 1 года осуществляли на месяц 13.

На фиг. 49 изображены общие конечные титры IgG животных, получавших трехвалентный состав ДНК GP. Повышение общего ответа антител IgG наблюдали после бустерной иммунизации по прошествии 1 года.

На фиг. 50 изображены общие конечные титры IgG животных, получавших двухвалентный или трехвалентный состав ДНК GP. Повышение общего ответа антител IgG наблюдали после бустерной иммунизации по прошествии 1 года.

На фиг. 51 изображены данные ELISPOT для трехвалентных составов ДНК GP. Повышение ответов IFN $\gamma$  по ELISPOT после

бустерной иммунизации по прошествии 1 года. Величина бустерной иммунизации была не такой высокой в 3-й инъекционной группе.

На фиг. 52 изображены данные ELISPOT для двухвалентных или трехвалентных составов ДНК GP. Повышение ответов IFN $\gamma$  по ELISPOT после бустерной иммунизации по прошествии 1 года. Наблюдалась удивительно высокая бустерная иммунизация в группе с одной иммунизацией.

На фиг. 53 обобщены результаты IFN $\gamma$  ELISPOT. У 17/19 животных наблюдались повышенные Т-клеточные ответы после бустерной иммунизации. У 1/19 животных сохранялся тот же уровень Т-клеточных ответов. У 1/19 животных наблюдались более низкие Т-клеточные ответы после бустерной иммунизации, тем не менее Т-клеточные ответы у данного животного были неизменно высокими в течение прошедшего года в 3-й инъекционной группе.

На фиг. 54 изображен иллюстративный IFN $\gamma$  ELISPOT для животных в группе одной иммунизации в момент времени 12 месяцев, до бустерной иммунизации по прошествии 1 года.

На фиг. 55 изображен иллюстративный IFN $\gamma$  ELISPOT для животных в группе одной иммунизации после бустерной иммунизации по прошествии 1 года.

На фиг. 56 изображены результаты исследования вторичного иммунного ответа после ВМ. GP ДНК-вакцины против EBOV обеспечивают длительный иммунный ответ с сильным вторичным иммунным ответом после бустерной иммунизации по прошествии 1 года. Исследования внутрикожной доставки осуществляли для исследования иммунного ответа с внутрикожными GP ДНК-вакцинами против EBOV.

На фиг. 57 обобщено клиническое испытание ДНК-вакцины против EBOV (EBOV-001). Здоровые добровольцы получали 3-дозовую схему приема INO-4201, INO-4202, INO-4212 или INO-4212 и INO-9021.

На фиг. 58 изображено сравнение связывающих антител в EBOV-001 к rVSV EBOV. Во всех когортах EBOV-001 наблюдались значительные повышения как в неделю 6, так и в неделю 14 по сравнению с неделей 0.

На фиг. 59 обобщены результаты исследования внутрикожной доставки GP ДНК-вакцины против EBOV. Когорты добавляли для исследования дозирования, схем дозирования и применения ДНК IL-12 в качестве иммуноадъюванта.

На фиг. 60 изображены результаты когорт ID на неделе 14. Серореактивность наблюдали у 125/127 (98,4%) субъектов во всех когортах ID.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

В одном аспекте настоящего изобретения необходимо, чтобы консенсусный антиген обеспечивал улучшенную транскрипцию и трансляцию, в том числе с одним или несколькими из следующего: лидерная последовательность с низким содержанием GC для повышения транскрипции; стабильность мРНК и оптимизация кодонов; удаление до степени, при которой возможны действующие в цис-положении мотивы последовательностей (т. е., внутренние ТАТА-боксы).

В некоторых аспектах настоящего изобретения необходимо образование консенсусного антигена, при котором возникает полиспецифический иммунный ответ в отношении нескольких штаммов, в том числе с одним или несколькими из следующего: введение всех доступных полноразмерных последовательностей; компьютерная генерация последовательностей, в которых используется наиболее часто встречающаяся аминокислота по каждому положению; и повышение перекрестной реактивности между штаммами.

Разнообразие между *Filoviridae* является относительно высоким. Интенсивные усилия были направлены на разработку универсальной и действующей в широком спектре вакцины против филовируса, что теоретически может обеспечить защиту против нескольких видов, ответственных за наиболее высокие проценты смертности людей в результате болезни. Тем не менее, это сложно вследствие относительного высокого уровня разнообразия среди *Filovirida*. В настоящее время EBOV классифицируют на пять отдельных видов, *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV) и *Tai Forest ebolavirus* (TAFV; ранее *Cote d'Ivoire ebolavirus*),

первые два отвечают за наиболее высокие уровни смертности и являются наиболее вероятными кандидатами для создания оружия на их основе. Среди вирусов Marburg (MARV) разнообразие является более низким, и среди них до 90% могут быть смертельными. В настоящее время существует один классифицированный вид, *Marburg marburgvirus* (ранее *Lake Victoria marburgvirus*), несмотря на то, что в недавних поправках предполагается, что он содержит два вируса, в том числе вирус Ravn (RAVV). Помимо сложности разработки поливалентной вакцины, MARV и EBOV сильно различаются, при этом наблюдается приблизительно 67% различия на нуклеотидном уровне. Более того, филогенетическое разнообразие среди филовирального GP также является очень высоким (в общем 82%). Это подразумевает потенциал филовирусов к эволюционированию, что показано недавним появлением VDBV в 2007 году. Поэтому, вследствие относительного разнообразия среди *Filoviridae*, авторы настоящего изобретения предполагают, что разработка эффективной поливалентной вакцины против филовируса вероятно потребует смеси иммуногенных компонентов.

Была разработана синтетическая поливалентная ДНК-вакцина против филовируса против *Marburg marburgvirus* (MARV), *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) и *Sudan ebolavirus* (SUDV). Новая поливалентная вакцина против филовируса, состоящая из трех ДНК-плазмид, кодирующих гены оболочечного гликопротеина (GP) *Marburg marburgvirus* (MARV), *Sudan ebolavirus* (SUDV) или *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), с использованием многокомпонентного подхода. В качестве кандидата для вакцины против филовируса усиленная ДНК-платформа (на основе ДНК) демонстрирует множество преимуществ, учитывая последние достижения в области генетической оптимизации и методик доставки (Bagarazzi ML, et al. (2012). Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. *Sci Transl Med* **4**: 155ral38; Kee ST, Gehl J, W. LE (2011). *Clinical Aspects of Electroporation*, Springer, New York, NY.; Hirao LA, et al. (2011). Multivalent smallpox DNA vaccine delivered by intradermal electroporation drives protective immunity in nonhuman primates against lethal monkeypox challenge. *J Infect*

*Dis 203*: 95-102). В связи с этим, каждый GP был генетически оптимизирован, субклонирован до модифицированных векторов экспрессии млекопитающего, а затем доставлен с использованием электропорации (EP) *in vivo*.

Доклинические исследования эффективности осуществляли на морских свинках и мышах с использованием адаптированных к грызунам вирусов, при этом ответы мышиных Т-клеток тщательно анализировали с использованием нового модифицированного анализа, описанного в данном документе. Ответы Т-клеток тщательно анализировали, включая применение нового способа идентификации и определения характеристик эпитопов, описанного в данном документе. Данная модель обеспечивает важный доклинический инструмент для исследования защитных иммунных взаимосвязей, который можно применять для существующих платформ.

Вакцинация в доклинических исследованиях на грызунах была высоко эффективной, вызывала образование устойчивых нейтрализующих антител (NAb) и CTL, экспрессирующих маркеры типа Th1, и полностью защищала против контрольного заражения MARV и ZEBOV. Проведен комплексный анализ Т-клеток в виде тщательно исследования с использованием нового модифицированного анализа, описанного в данном документе (Shedlock DJ, et al. (2012). Vaccination with synthetic constructs expressing cytomegalovirus immunogens is highly T cell immunogenic in mice. *Hum Vaccin Immunother* **8**: 1668-1681), выявлены цитотоксические Т-лимфоциты большого размера с эпитопным охватом и экспрессией маркеров Th1-типа. В целом были идентифицированы 52 новых Т-клеточных эпитопов из двух различных фоновых генотипов мышей (19 из 20 эпитопов MARV, 15 из 16 SUDV, и 18 из 22 ZEBOV), и они возникли прежде всего в высоко консервативных областях их соответствующих гликопротеинов (GP). Эти данные представляют собой наиболее комплексный отчет о доклинических гликопротеиновых эпитопах, известных до настоящего времени.

При разработке стратегии для обеспечения защиты против нескольких видов, отвечающих за наиболее высокие проценты смертности людей в результате болезни, авторы настоящего изобретения фокусировались на MARV, SUDV и ZEBOV. Вследствие их

относительного разнообразия авторы настоящего изобретения предположили, что разработка поливалентной вакцины против филовируса может потребовать смеси компонентов, которые могут быть быстро и легко адаптированы к ответу на штаммы и/или виды будущих вспышек заболеваний. Несмотря на то, что общее разнообразие среди EBOV составляет приблизительно 33%, аминокислотная идентичность существенно повышается, если SUDV и ZEBOV анализируют отдельно (идентичность ~94% в пределах каждого вида). Следовательно, как показано на фиг. 1А, была разработана двухкомпонентная стратегия для охвата наиболее смертельного EBOV, одна вакцина на основе плазмиды GP для SUDV, а другая - для ZEBOV. Поскольку разнообразие GP в рамках каждого вида была относительно низкой (5,6% для SUDV и 7,1% для ZEBOV), разработанные консенсусные иммуногены повышали межвидовой охват, ранее было показано, что стратегия усиливает защиту среди разных штаммов вируса гриппа и HIV. Данные последовательности GP были консенсусными для всех последовательностей в зарегистрированных вспышках (GenBank), что определено посредством выравнивания с использованием программного обеспечения Vector NTI (Invitrogen, штат Калифорния, США). Неконсенсусные остатки, по 4 аминокислоты каждый в SUDV (95, 203, 261 и 472) и ZEBOV (314, 377, 430 и 440), взвешивали в отношении Gulu и Mbomo/Mbanza, соответственно. Штамм Gulu выбран, поскольку он отвечал за наиболее высокий процент смертности людей любой вспышки *Filoviridae* (n=425), тогда как штамм Mbomo/Mbanza выбран, поскольку он обеспечил наиболее недавние и смертельные вспышки с опубликованными данными последовательности. Консенсусные GP для SUDV (SUDV CON VACCINE) и ZEBOV (ZEBOV CON VACCINE) были филогенетически промежуточными по отношению к их родительским линиям.

Идентификация белков на фиг. 1А была следующей: MARV Durba (05DRC99) '99: ABE27085; Uganda (01Uga07) '07: ACT79229; Durba (07DRC99) '99: ABE27078; Ozolin '75: VGP\_MABVO; Musoke '80: VGP\_MABVM; Popp '67: VGP\_MABVP; Leiden '08: AEW11937; Angola '05: VGP\_MABVA; Ravn '87: VGP\_MABVR; Durba (09DRC99) '99: ABE27092; Uganda (02Uga07) '07: ACT79201. SUDV: Boniface '76:

VGP\_EBOSB; Maleo '79: VGP\_EBOSM; Yambio '04: ABY75325; Gulu '00: VGP\_EBOSU. ZEBOV: Booue '96: AAL25818; Mayibout '96: AEK25495; Mekouka '94: AAC57989, VGP\_EBOG4; Kikwit '95: VGP\_EBOZ5; Yambuku (Ekron) '76: VGP\_EBOEC; Yambuku (Mayinga) '76: VGP\_EBOZM; Kasai '08: AER59712; Kassai '07: AER59718; Etoumbi '05: ABW34742; Mbomo/Mbandza '03: ABW34743.

Перечень последовательностей, предоставленный с данным документом, содержит перечень из 72 последовательностей, в том числе следующих:

SEQ ID NO:1 представляет собой аминокислотную последовательность ZEBOV CON (CONGP1), которая представляет собой консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:2 представляет собой аминокислотную последовательность SUDV CON, которая представляет собой консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*.

SEQ ID NO:3 представляет собой аминокислотную последовательность MARV или MARV ANG, которая представляла собой аминокислотную последовательность оболочечного гликопротеина *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года и оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года.

SEQ ID NO:4 представляет собой аминокислотную последовательность MARV CON1, которая представляет собой первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

SEQ ID NO:5 представляет собой аминокислотную последовательность MARV CON2, которая представляет собой второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

SEQ ID NO:6 представляет собой аминокислотную последовательность MARV CON3, которая представляет собой третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

SEQ ID NO:7-25 представляют собой пептиды, полученные из

MARV ANG.

SEQ ID NO:26-41 представляют собой пептиды, полученные из SUDV CON.

SEQ ID NO: 42-62 представляют собой пептиды, полученные из ZEBOV CON.

SEQ ID NO:63 представляет собой последовательность сигнального пептида IgE: MDWTWILFLVAAATRVHS.

SEQ ID NO:64 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOZ, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:65 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOS, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*.

SEQ ID NO:66 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pMARZ ANG, которая кодирует оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года.

SEQ ID NO:67 представляет собой аминокислотную последовательность ZEBOVGUI (GuineaGP), которая представляет собой консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, выделенного при вспышке в Гвинее в 2014 году.

SEQ ID NO:68 представляет собой аминокислотную последовательность ZEBOVCON2 (CONGP2), которая представляет собой второй консенсусный оболочечный гликопротеин *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:69 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pZEBOVGUI, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, выделенный при вспышке в Гвинее в 2014 году.

SEQ ID NO:70 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOZCON2, которая кодирует второй консенсусный оболочечный гликопротеин *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:71 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды pEBOZCON2, которая кодирует второй консенсусный оболочечный гликопротеин *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:72 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pZEBOVGUI, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, выделенный при вспышке в Гвинее в 2014 году.

В некоторых вариантах осуществления в стратегии применяются кодирующие последовательности для трех иммуногенов филовируса, выбранных из следующего: MARV, SUDV, ZEBOV, ZEBOVGUI и ZEBOVCON2. Иммуноген MARV представляет собой гликопротеин изолята Анголы 2005 года. Для SUDV ZEBOV, ZEBOVGUI и ZEBOVCON2 были разработаны консенсусные последовательности гликопротеина.

В некоторых вариантах осуществления в стратегии применяются кодирующие последовательности для пяти иммуногенов филовируса. Представлены три иммуногена MARV. Были разработаны консенсусные гликопротеины Ozolin, Musoke или Ravn, образованные из трех кластеров. Данные три иммуногена MARV представляют собой мишени для иммунных ответов вместе с консенсусными последовательностями гликопротеинов SUDV, ZEBOV или ZEBOVCON2, ZEBOVGUI, которые были разработаны.

В некоторых вариантах осуществления в стратегии применяются кодирующие последовательности для шести иммуногенов филовирусов. Представлено четыре иммуногена MARV: было разработано три консенсусных гликопротеина, образованных из трех кластеров. Данные три иммуногена MARV представляют собой мишени для иммунных ответов вместе с консенсусными последовательностями гликопротеинов SUDV, ZEBOV и ZEBOVCON2, ZEBOVGUI, которые были разработаны, при этом иммуноген MARV представляет собой гликопротеин изолята Анголы 2005 года.

В качестве кандидата для вакцин против филовируса ДНК-вакцины демонстрируют множество преимуществ, в том числе быстрое и незатратное крупномасштабное производство, стабильность при комнатной температуре и легкость транспортировки, при этом все из которых дополнительно усиливают данную платформу с экономической и географической точки зрения. Вследствие синтетической природы плазмид последовательности Ag могут быть быстро и легко модифицированы для ответа на новые возникающие виды и/или расширены для включения дополнительных компонентов

вакцины и/или схемы для быстрого ответа в ходе установления вспышки. Например, стратегии по MARV в данном документе могут быть легко расширены для большего охвата посредством совместного введения дополнительных плазмид, кодирующих консенсусные иммуногены MARV GP (MGP) для других филогенетических кластеров.

Несмотря на то, что ДНК-вакцины «первого поколения» были слабо иммуногенными, недавние достижения в данной технологии значительно улучшили их иммуногенность в клинических испытаниях. Оптимизация векторов плазмидных ДНК и кодированных ними генов Ag обеспечили повышение иммуногенности *in vivo*. Клеточный захват и последующая экспрессия Ag являются по сути усиливаются, если высококонцентрированные составы вакцин на основе плазмид вводят с помощью электропорации *in vivo*, методики, в которой применяют короткие электрические импульсы прямоугольной формы в зоне вакцинации для направления плазмид во временно пермеабиллизированные клетки. Теоретически, смесь ДНК-плазмид может быть собрана для направления высоко специализированного иммунного ответа против любого количества переменных Ag. Иммунитет может быть дополнительно направлен посредством совместной доставки с плазмидными молекулярными адъювантами, кодирующими видоспецифичные гены цитокинов, а также «консенсусного конструирования» аминокислотных последовательностей Ag для обеспечения смещения индуцированного вакциной иммунитета в направлении конкретных штаммов. Было показано, что данная стратегия усиливает защиту среди различных штаммов вируса гриппа и HIV. Частично вследствие данных технологических достижений, схемы иммунизации, включающие данные ДНК-вакцины, являются высоко универсальными и чрезвычайно приспособляемыми.

### **Определения**

Используемая в данном документе терминология применяется только для описания конкретных вариантов и не подразумевает ограничения. Использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

В случае указания в данном документе числовых диапазонов, с

той же степенью точности явным образом подразумевается и каждое промежуточное число в них. Например, для диапазона 6–9 подразумеваются числа 7 и 8 в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0–7,0 явным образом подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

#### **Адъювант**

Применяемое в данном документе «адъювант» может означать любую молекулу, добавляемую к вакцинам на основе ДНК-плазмид, описанных в данном документе, для усиления антигенности одного или нескольких консенсусных иммуногенов филовируса, кодированных ДНК-плазмидами и кодирующих нуклеотидные последовательности, описанные далее в данном документе.

#### **Антитело**

«Антитело» может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или фрагменты, или их фрагменты или производные, в том числе Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифические антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, прошедшее аффинную очистку антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с необходимым эпитопом или полученной из него последовательностью.

#### **Кодирующая последовательность**

Применяемая в данном документе «кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» может означать нуклеиновую кислоту (молекулу РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодирующая последовательность также может содержать последовательность ДНК, которая кодирует последовательность РНК. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность может необязательно дополнительно содержать

старт-кодон, который кодирует N-концевой метионин, или сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

#### **Генетическая конструкция**

Применяемая в данном документе «генетическая конструкция» относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, например иммуноген. Генетическая конструкция также может относиться к молекуле ДНК, которая транскрибирует РНК. Кодирующая последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа термин «форма с возможностью экспрессии» относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок так, что в случае присутствия в клетке индивида будет происходить экспрессия кодирующей последовательности.

#### **Комплементарный**

В контексте данного документа термин «комплементарный» может означать нуклеиновую кислоту, характеризующуюся Уотсон-Криковским (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстиновским спариванием оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

#### **Консенсусный или консенсусная последовательность**

Применяемые в данном документе «консенсусный» или «консенсусная последовательность» может означать синтетическую нуклеотидную последовательность, или соответствующую полипептидную последовательность, сконструированную на основании анализа выравнивания нескольких подтипов конкретного антигена филовируса, которые можно применять для индукции общего иммунитета против нескольких подтипов или серотипов конкретного антигена филовируса.

Консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* относится к SEQ ID NO:1, фрагментам SEQ ID NO:1, вариантам SEQ ID NO:1 и фрагмента вариантов SEQ ID NO:1. (ZEBOV

или ZEBOV CON или ZEBOV CON VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:1, могут называться рZEBOV или рEBOZ. Кодирующие последовательности для консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus* включают SEQ ID NO:64, фрагменты SEQ ID NO:64, варианты SEQ ID NO:64 и фрагмент вариантов SEQ ID NO:64. Плазмида рEBOZ содержит SEQ ID NO:64.

Консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* относится к SEQ ID NO:2, фрагментам SEQ ID NO:2, вариантам SEQ ID NO:2 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:2. (SUDV или SUDV CON или SUDV CON VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:2, могут называться рSUDV или рEBOS. Кодирующие последовательности для консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus* включают SEQ ID NO:65, фрагменты SEQ ID NO:65, варианты SEQ ID NO:65 и фрагмент вариантов SEQ ID NO:65. Плазмида рEBOS содержит SEQ ID NO:65.

Оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года не является консенсусным, но представляет собой белковую последовательность, полученную из изолята. Он имеет последовательность SEQ ID NO:3. Оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года относится к SEQ ID NO:3, фрагментам SEQ ID NO:3, вариантам SEQ ID NO:3 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:3. (MARV или MARV ANG или MARV ANG или MARV ANG VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:3, могут называться рMARV или рMARV-ANG. Кодирующие последовательности для оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года включают SEQ ID NO:66, фрагменты SEQ ID NO:66, варианты SEQ ID NO:66 и фрагмент вариантов SEQ ID NO:66. Плазмида рMARV ANG содержит SEQ ID NO:66.

Первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* относится к SEQ ID NO:4, фрагментам SEQ ID NO:4, вариантам SEQ ID NO:4 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:4. SEQ ID NO:4 представляет собой консенсусную последовательность *Marburg marburgvirus* из кластерного консенсуса Ravn (Ravn, Durba

(09DRC99) и Uganda (02Uga07Y)). (MARV CON1 или MARV-RAV CON или MARV-RAV CON VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:4 могут называться pMARV-RAV.

Второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* относится к SEQ ID NO:5, фрагментам SEQ ID NO:5, вариантам SEQ ID NO:5 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:5. SEQ ID NO:5 представляет собой консенсусную последовательность *Marburg marburgvirus* из кластерного консенсуса Ozolin (Ozolin, Uganda (01Uga07) и Durba (05 и 07DRC99)). (MARV CON2 или MARV-OZO CON или MARV-OZO CON VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:5 могут называться pMARV-OZO.

Третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* относится к SEQ ID NO:6, фрагментам SEQ ID NO:6, вариантам SEQ ID NO:6 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:6. SEQ ID NO:6 представляет собой консенсусную последовательность *Marburg marburgvirus* из кластерного консенсуса Musoke (Musoke, Popp, и Leiden). (MARV CON1 или MARV-MUS CON или MARV-MUS CON VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:6 могут называться pMARV-MUS.

Консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus GP* относится к SEQ ID NO:67, фрагментам SEQ ID NO:67, вариантам SEQ ID NO:67 и фрагменту вариантов SEQ ID NO:67. (ZEBOVGUI или ZEBOVGUI VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO:67, могут называться pZEBOVGUI или pEBOZGUI. Кодирующие последовательности для консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus Guinea 2014* включают SEQ ID NO:69, фрагменты SEQ ID NO:69, варианты SEQ ID NO:69 и фрагмент вариантов SEQ ID NO:69. Плазида pEBOZGUI содержит SEQ ID NO:69.

Второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* относится к SEQ ID NO:68, фрагментам SEQ ID NO:68, вариантам SEQ ID NO:68 и фрагмента вариантов SEQ ID NO:68. (ZEBOV2 или ZEBOVCON2 или ZEBOVCON2 VACCINE). Плазмиды, содержащие кодирующие последовательности SEQ ID NO: 68, могут называться pEBOVCON2. Кодирующие последовательности для второго

консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus* включают SEQ ID NO:70, фрагменты SEQ ID NO:70, варианты SEQ ID NO:70 и фрагмент вариантов SEQ ID NO:70. Плазмида pEBOVCON2 содержит SEQ ID NO:70.

#### **Постоянный ток**

В контексте данного документа термин «постоянный ток» используется для определения тока, проходящего или воздействующего на ткань или клетки, образующие указанную ткань, в течение длительности электрического импульса, подаваемого на ту же самую ткань. Электрический импульс подается из описанных в данном документе устройств для электропорации. Ток сохраняет постоянную силу в указанной ткани в течение действия электрического импульса, так как предложенное в данном документе устройство для электропорации имеет цепь обратной связи, предпочтительно характеризующуюся мгновенной обратной связью. Цепь обратной связи может измерять сопротивление ткани (или клеток) во время длительности импульса и давать команду устройству для электропорации для изменения вырабатываемой электрической энергии (например, повышения напряжения) так, чтобы ток в этой же ткани оставался постоянным в течение электрического импульса (порядка микросекунд) и от импульса к импульсу. В некоторых вариантах реализации цепь обратной связи содержит контроллер.

#### **Обратная связь по току или обратная связь**

В контексте данного документа термины «обратная связь по току» или «обратная связь» могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активный ответ предложенных устройств для электропорации, который включает измерение тока в ткани между электродами и соответствующее изменение вырабатываемой устройством ЭП энергии, чтобы поддерживать ток на постоянном уровне. Этот постоянный уровень задается пользователем до инициации последовательности импульсов или электрической обработки. Обратная связь может осуществляться электропорационным компонентом, например контроллером устройства для электропорации, так как электрический контур в нем может непрерывно отслеживать ток в ткани между электродами и

сравнивать этот отслеживаемый ток (или ток в ткани) с заданным током и непрерывно проводить корректировку вырабатываемой энергии для поддержания отслеживаемого тока на заданном уровне. Контур обратной связи может характеризоваться мгновенным действием, так как он является аналоговым замкнутым контуром обратной связи.

#### **Децентрализованный ток**

В контексте данного документа термин «децентрализованный ток» может означать профиль электрических токов, подаваемых из различных матриц с игольчатыми электродами, описанных в данном документе устройств для электропорации, при этом профили минимизируют или, предпочтительно, устраняют появление связанного с электропорацией теплового стресса в любой области электропорлируемой ткани.

#### **Электропорация**

В контексте данного документа взаимозаменяемые термины «электропорация», «электропермеабилитация» или «электрокинетическое усиление» (ЭП) могут относиться к применению трансмембранных электрических импульсов для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране; их наличие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

#### **Механизм обратной связи**

В контексте данного документа термин «механизм обратной связи» может относиться к процессу, осуществляемому программным обеспечением или аппаратным обеспечением (или встроенным программным обеспечением), который заключается в получении и сравнении импеданса необходимой ткани (до, во время и/или после подачи импульса энергии) с заданным значением, предпочтительно током, и коррекции подаваемого импульса энергии для достижения заданного значения. Механизм обратной связи может осуществляться аналоговым замкнутым контуром.

#### **Фрагмент**

«Фрагмент» может означать полипептидный фрагмент иммуногена филовируса, который способен инициировать иммунный ответ у

млекопитающего против филовируса посредством распознавания конкретного антигена филовируса. Филовирусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген может необязательно включать сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, белки, на 98% или более гомологичные консенсусным последовательностям, приведенным в данном документе, белки, на 99% или более гомологичны консенсусным последовательностям, приведенным в данном документе, и белки, на 100% идентичные консенсусным последовательностям, приведенным в данном документе, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагмент может содержать или может не содержать, например, фрагмент иммуногена филовируса, связанный с сигнальным пептидом, например сигнальным пептидом иммуноглобулина, например сигнальным пептидом IgE или сигнальным пептидом IgG.

Фрагменты любого из ZEBOV CON, SUDV CON, MARV ANG, MARV-RAV CON, MARV-OZO CON, MARV-MUS CON, ZEBOVGUI или ZEBOVCON2 или их вариантов, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них, могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более длины конкретных полноразмерных ZEBOV CON, SUDV CON, MARV ANG, MARV-RAV CON, MARV-OZO CON, MARV-MUS CON, ZEBOVGUI или ZEBOVCON2 или их вариантов. Фрагменты относятся к фрагментам полипептидов, на 100% идентичным последовательностям ZEBOV CON, SUDV CON, MARV ANG, MARV-RAV CON, MARV-OZO CON, MARV-MUS CON, ZEBOVGUI или ZEBOVCON2, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты также относятся к фрагментам вариантов, т. е. полипептидам, которые на 95% или более, на 98% или более, или на 99% или более гомологичны последовательностям ZEBOV CON, SUDV CON, MARV ANG, MARV-RAV CON, MARV-OZO CON, MARV-MUS CON, ZEBOVGUI или ZEBOVCON2, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1

или без них. Фрагмент может включать фрагмент полипептида, который на 98% или более гомологичен, на 99% или более гомологичен, или на 100% идентичен иммуногенам филовируса, приведенным в SEQ ID NO: 1-6, 67-68, и дополнительно содержать сигнальный пептид, например сигнальный пептид иммуноглобулина, который не включен в расчет процента гомологичности. В некоторых вариантах осуществления фрагмент SEQ ID NO: 1-6, 67-68 связан с сигнальным пептидом, например сигнальным пептидом иммуноглобулина, например сигнальным пептидом IgE или сигнальным пептидом IgG. Фрагмент может содержать фрагменты SEQ ID NO: 1-6, 67-68, в том числе N-концевой метионин. Фрагменты также могут относиться к фрагментам полипептида, который на 95% или более, на 98% или более, или на 99% или более гомологичен последовательности, раскрытой в SEQ ID NO: 1-6, 67-68. Если присутствует сигнальный пептид, то он не включен в расчет процента гомологичности.

В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 1-6, 67-68 или их варианты могут содержать 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670 или более последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO:1-6 или их вариантов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO:1-6 или их варианты могут содержать 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 675 или менее последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO: 1-6, 67-68 или их вариантов.

«Фрагмент» также может означать фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует иммуноген филовируса, фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий фрагмент иммуногена филовируса, который способен инициировать иммунный ответ у млекопитающего против филовируса посредством распознавания конкретного антигена филовируса. Фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуноген филовируса или его варианты, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них, могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или

более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретной полноразмерной нуклеотидной последовательности, которая кодирует иммуноген филовируса или его варианты. Фрагмент может содержать фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, который на 98% или более гомологичен, на 99% или более гомологичен, или на 100% идентичен иммуногенам филовируса, приведенным в SEQ ID NO: 1-6, 67-68, и дополнительно содержать сигнальный пептид, например сигнальный пептид иммуноглобулина, который не включен в расчет процента гомологичности. В некоторых вариантах осуществления фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует фрагмент SEQ ID NO: 1-6, 67-68 связан с сигнальным пептидом, например сигнальным пептидом иммуноглобулина, например сигнальным пептидом IgE или сигнальным пептидом IgG. Если присутствуют кодирующие последовательности сигнального пептида, то они не включены в расчет процента гомологичности. В некоторых вариантах осуществления фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует фрагменты SEQ ID NO:1-6 или их варианты, может содержать последовательности, которые кодируют 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670 или более последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO: 1-6, 67-68 или их вариантов. В некоторых вариантах осуществления фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует фрагменты SEQ ID NO:1-6, 67-68 или их варианты, может содержать последовательности, которые кодируют 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 675 или менее последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO:1-6, 67-68 или их вариантов.

В некоторых вариантах осуществления фрагменты представляют собой фрагменты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72. Фрагменты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ

ID NO:72, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них, могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретной полноразмерной нуклеотидной последовательности, которая кодирует иммуноген филловируса или его варианты. Фрагмент SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, или SEQ ID NO:72 может содержать фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, который на 98% или более гомологичен, на 99% или более гомологичен, или на 100% идентичен иммуногенам филловируса, кодированным SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, или SEQ ID NO:72, и дополнительно содержать сигнальный пептид, например сигнальный пептид иммуноглобулина, который не включен в расчет процента гомологичности. Фрагменты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72 могут содержать последовательности, которые кодируют 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670 или более последовательных аминокислот из SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, или их вариантов. Фрагменты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72 могут содержать последовательности, которые кодируют 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 675 или менее последовательных аминокислот из SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, или их вариантов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты представляют собой фрагменты РНК, транскрибированной из или кодированной SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72.

### **Идентичный**

Употребляемые в данном документа термины «идентичный» или «идентичность» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов могут означать, что последовательности имеют заданный процент остатков, являющихся одинаковыми на протяжении заданной области. Процент можно рассчитывать путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей на протяжении заданной области, определения числа позиций, в которых в обеих последовательностях находится идентичный остаток, для получения числа совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее число позиций в заданной области и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случае, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к получению одного или более ступенчатых концов и заданная область сравнения включает только одну последовательность, при расчете остатки этой одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) могут считаться эквивалентными. Идентичность можно оценивать вручную, или используя компьютерный алгоритм выравнивания последовательностей, такой как BLAST или BLAST 2.0.

### **Импеданс**

В контексте данного документа термин «импеданс» может использоваться при обсуждении механизма обратной связи и может быть преобразован в значение силы тока по закону Ома, делая возможным сравнение с текущим значением силы тока.

### **Иммунный ответ**

Применяемый в данном документе «иммунный ответ» может означать активацию иммунного ответа хозяина, например иммунного ответа млекопитающего, в ответ на введение одного или нескольких консенсусных антигенов филовируса посредством представленных вакцин на основе ДНК-плазмид. Иммунный ответ может иметь форму клеточного или гуморального ответа или их обоих.

### **Нуклеиновая кислота**

В контексте данного документа термины «нуклеиновая кислота»

или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид» могут означать по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных вместе. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь описанной одной цепи. Много вариантов нуклеиновой кислоты можно использовать в тех же целях, что и заданную нуклеиновую кислоту. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает по существу идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Одна цепь обеспечивает зонд, который может гибридизироваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными или могут содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид, в котором нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты можно получать методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

#### **Функционально связанный**

В контексте данного документа выражение «функционально связанный» может означать, что экспрессия гена находится под управлением промотора, с которым он пространственно соединен. Промотор может располагаться в направлении 5' (выше) или 3' (ниже) гена, находящегося под его управлением. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же самым, что и расстояние между этим промотором и геном, которым он управляет, в гене, из которого получен промотор. Как известно в данной области техники это расстояние можно варьировать без потери функциональности промотора.

#### **Промотор**

В контексте данного документа термин «промотор» может

означать синтетическую или полученную из природного источника молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических транскрипционных регуляторных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии. Промотор также может содержать удаленные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промотор может быть получен из разных источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивным или дифференциальным образом по отношению к клетке, ткани или органу, в которых происходит экспрессия, или по отношению к стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологический стресс, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типовые примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

#### **Жесткие условия гибридизации**

В контексте данного документа «жесткие условия гибридизации» могут означать условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизироваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в комплексной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия можно выбирать так, что они были на приблизительно 5–10°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH.  $T_m$  может представлять собой температуру (при определенных ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50%

зондов, комплементарных мишени, гибридизируются с последовательностью-мишенью в равновесном состоянии (так как последовательности-мишени присутствуют в избытке, при  $T_m$ , 50% зондов оказываются занятыми в равновесном состоянии). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,0 М ионов натрия, например приблизительно концентрация с 0,01–1,0 М ионов натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, около 10–50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более чем около 50 нуклеотидов). Жесткие условия также можно обеспечивать путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал может по меньшей мере в 2–10 раз превышать фоновую гибридизацию. Примеры жестких условий гибридизации включает следующие: 50% формамид, 5x SSC и 1% ДСН, инкубация при 42 °C, или 5x SSC, 1% ДСН, инкубация при 65°C с промывкой в 0,2x SSC и 0,1% ДСН при 65 °C.

#### **По существу комплементарный**

В контексте данного документа выражение «по существу комплементарный» может означать, что первая последовательность по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична комплементарной цепи второй последовательности на протяжении 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации.

#### **Практически идентичный**

В контексте данного документа выражение «по существу идентичный» может означать, что первая и вторая последовательность по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны на протяжении 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или

более нуклеотидов или аминокислот, или относительно нуклеиновых кислот, если первая последовательность по сути комплементарна комплементарной цепи второй последовательности.

### **Вариант**

Термин «вариант», используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, может означать (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную цепь указанной нуклеотидной последовательности или ее часть; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является по существу идентичной указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной цепи; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизируется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной цепью или последовательностями, по существу идентичными ей.

Термин «вариант» применяется в отношении пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вследствие вставки, делеции или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является по существу идентичной указанному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Консервативные замены аминокислот, т. е. замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), известны в данной области техники как включающие, как правило, незначительные изменения. Эти незначительные изменения можно частично определять на основании индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на оценке ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности можно взаимно заменять с сохранением функции белка. В одном аспекте проводят замену аминокислот, имеющих индексы гидропатичности  $\pm 2$ .

Гидрофильность аминокислот также можно использовать для определения замен, которые бы привели к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным показателем, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может приводить к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены можно проводить с аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$  относительно друг друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретный тип боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, сочетаемые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности боковых цепей этих аминокислот, проявляемого в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах. Варианты предпочтительно гомологичны SEQ ID NO:1-6, 67-68 на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более.

«Вариант» относительно нуклеотидной последовательности, которая кодирует ту же специфическую нуклеотидную последовательность, отличается по нуклеотидной последовательности посредством использования отличных кодонов. Варианты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, которые кодируют ту же аминокислотную последовательность, что и варианты, закодированные посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, могут иметь любую степень гомологичности, предпочтительно 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более. Варианты РНК, транскрибированные

посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, которые кодируют ту же аминокислотную последовательность, что и варианты, кодированные посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, могут иметь любую степень гомологичности, предпочтительно 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более. Вариант также может включать варианты SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, которые кодируют белки, представляющие собой варианты белков, кодированных посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, с аминокислотной последовательностью, которая по сути идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность, как правило, аминокислотные последовательности гомологичны на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более. Вариант также может включать варианты РНК, транскрибированные посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, которые кодируют белки, представляющие собой варианты белков, кодированных РНК, транскрибированной посредством SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72, с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность, как правило, аминокислотные последовательности гомологичны на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более

### **Вектор**

В контексте данного документа термин «вектор» может означать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальный, вирусный вектор, искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК- или РНК-вектор. Вектор

может представлять собой как самореплицирующийся внехромосомный вектор, так и вектор, который интегрируется в геном организма-хозяина.

### **Белки**

В данном документе представлены иммуногены филовируса, которые можно применять для индукции общего иммунитета против нескольких подтипов или серотипов конкретного антигена филовируса. Консенсусные антигены филовируса могут включать консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена MARV RAV гликопротеина филовируса Марбург, консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена MARV OZO гликопротеина филовируса Марбург, консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена MARV MUS гликопротеина филовируса Марбург, выделенные аминокислотные последовательности иммуногена MARV ANG гликопротеина филовируса Марбург, консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена ZEBOV гликопротеина вируса Эбола Заир, консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена ZEBOV2014 гликопротеина вируса Эбола Заир, выделенные аминокислотные последовательности иммуногена ZEBOVCON2 гликопротеина вируса Эбола Заир и консенсусные аминокислотные последовательности иммуногена SUDV гликопротеина вируса Эбола Судан, соответственно. В некоторых вариантах осуществления иммуногены могут содержать сигнальный пептид из различных белков, например белок иммуноглобулин, например сигнальный пептид IgE или сигнальный пептид IgG.

Аминокислотные последовательности для иммуногенов включают SEQ ID NO:1-6, 67-68 и их варианты и фрагменты SEQ ID NO:1-6, 67-68 и их варианты, необязательно содержащие сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

### **Кодирующие последовательности, кодирующие белки**

Кодирующие последовательности, кодирующие белки, представленные в данном документе, могут быть образованы с использованием обычных способов. Представлена композиция, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, содержащая нуклеотидную последовательность, которая

кодирует второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, нуклеотидную последовательность, которая кодирует оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, представленные в данном документе, и нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, нуклеотидная последовательность, которая кодирует второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, и нуклеотидная последовательность, которая кодирует третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* могут быть образованы на основе раскрытых нуклеотидных последовательностей.

Нуклеотидная последовательность может кодировать полноразмерный консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, полноразмерный второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, полноразмерный консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, полноразмерный консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, полноразмерный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, полноразмерный первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, полноразмерный второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* или полноразмерный третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Нуклеотидные последовательности могут включать в себя последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:68. Нуклеотидная последовательность может включать в себя SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69 SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72.

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК, описанной в данном документе. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать последовательности РНК, транскрибированные последовательностью ДНК с SEQ ID NO: 64, 65, 66, 69, 70 или 72, их фрагментом или вариантом. Нуклеотидная последовательность может необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

Нуклеотидная последовательность может кодировать фрагмент полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus*, фрагмент полноразмерного второго консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus*, фрагмент полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus Guinea*, фрагмент полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus*, фрагмент полноразмерного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, фрагмент полноразмерного первого консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*, фрагмент полноразмерного второго консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus* или фрагмент полноразмерного третьего консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*. Нуклеотидная последовательность может включать в себя последовательность, которая кодирует фрагмент SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:68. Нуклеотидная последовательность может содержать фрагмент SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69 SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72. Размеры фрагментов раскрыты в данном документе, как указано в разделе под названием «Фрагменты». Нуклеотидная последовательность может необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

Нуклеотидные последовательности могут кодировать белок, гомологичный полноразмерному консенсусному оболочечному

гликопротеиновому иммуногену *Zaire ebolavirus*, полноразмерному второму консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Zaire ebolavirus*, полноразмерному консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Zaire ebolavirus Guinea*, белок, гомологичный полноразмерному консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Sudan ebolavirus*, белок, гомологичный полноразмерному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, белок, гомологичный полноразмерному первому консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Marburg marburgvirus*, белок, гомологичный полноразмерному второму консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Marburg marburgvirus*, или белок, гомологичный полноразмерному третьему консенсусному оболочечному гликопротеиновому иммуногену *Marburg marburgvirus*. Нуклеотидная последовательность может включать в себя последовательность, которая кодирует белок, гомологичный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:68. Нуклеотидная последовательность может быть гомологична SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69 SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72. Степени гомологии, обсуждаемые в данном документе, являются такими, например как у названных в этом разделе вариантов. Нуклеотидная последовательность может необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

Нуклеотидная последовательность может кодировать белок, гомологичный фрагменту полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus*, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного второго консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus*, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Zaire ebolavirus Guinea*, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Sudan ebolavirus*, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*

Анголы 2005 года, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного первого консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*, белок, гомологичный фрагменту полноразмерного второго консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*, или белок, гомологичный фрагменту полноразмерного третьего консенсусного оболочечного гликопротеинового иммуногена *Marburg marburgvirus*. Нуклеотидная последовательность может включать в себя последовательность, которая кодирует белок, гомологичный фрагменту SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:68. Нуклеотидная последовательность может содержать фрагмент, гомологичный SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:69 SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO:72. Степени гомологии, обсуждаемые в данном документе, являются такими, например как у названных в этом разделе вариантов. Нуклеотидная последовательность может необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, например сигнальный пептид IgE или IgG.

SEQ ID NO:64 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOZ, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:65 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOS, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*.

SEQ ID NO:66 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pMARZ ANG, которая кодирует оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года.

SEQ ID NO:69 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOZGUI, которая кодирует консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *GP Zaire ebolavirus*.

SEQ ID NO:70 представляет собой вставку нуклеотидной последовательности в плазмиде pEBOZCON2, которая кодирует второй

консенсусный оболочечный гликопротеин *Zaire ebolavirus*.

### **Векторы**

Векторы включают в себя, но не ограничиваются этим, плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, любую форму рекомбинантного вектора «голой ДНК» и т. п. «Вектор» содержит нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Следует понимать, что вектор может представлять собой «голую» нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор необязательно содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты и/или белки, и/или мембраны (например, клеточную мембрану, вирусную липидную оболочку и т. д.). Векторы включают, но не ограничиваются этим, репликоны (например, репликоны РНК, бактериофаги), к которым могут быть прикреплены и становиться реплицируемыми фрагменты ДНК. Таким образом, векторы включают, но не ограничиваются этим, РНК, автономную самореплицирующуюся кольцевую или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и т. п., см., например, патент США. № 5 217 879), и включают как экспрессионные, так и не экспрессионные плазмиды. Когда рекомбинантный микроорганизм или клеточная культура описывается как хозяин «вектора экспрессии», это означает, что они включают как внехромосомную кольцевую, так и линейную ДНК, а также ДНК, которые были внедрены в хромосому (-ы) хозяина. Когда вектор поддерживается в клетке-хозяине, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза как автономная структура, либо может быть внедрен в геном хозяина.

### **Плазида**

Плазида может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более различных иммуногенов, раскрытых выше, в том числе кодирующие последовательности, которые кодируют синтетический консенсусный антиген, способный инициировать иммунный ответ против белков филовирусов.

Одна плазида может содержать кодирующую последовательность для одного иммуногена белка филовируса, кодирующую последовательность для двух иммуногенов белков филовируса,

кодирующую последовательность для трех иммуногенов белков филовируса, кодирующую последовательность для четырех иммуногенов белков филовируса, кодирующую последовательность для пяти иммуногенов белков филовируса или кодирующую последовательность для шести иммуногенов белков филовируса. Одна плазида может содержать кодирующую последовательность для одного иммуногена белка филовируса, причем она может вводиться в состав вместе с другими. В некоторых вариантах осуществления плазида может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует IL-12, IL-15 и/или IL-28.

Плазида может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может располагаться выше кодирующей последовательности, и стоп-кодон, который может располагаться ниже кодирующей последовательности. Иницирующий и терминирующий коды могут находиться в рамке считывания с кодирующей последовательностью.

Плазида также может содержать промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью антигена, может представлять собой промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинных концевых повторов (ДКП) бычьего вируса иммунодефицита (БВИ), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ВЛП), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как предранний промотор ЦМВ, промотор вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) или промотор вируса саркомы Рауса (ВСП). Промотор также может представлять собой промотор из человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатинин или человеческий металлотioneин. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как промотор, специфический в отношении мышц или кожи, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US20040175727, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Плазида также может содержать сигнал полиаденилирования,

который может располагаться ниже кодирующей последовательности. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования человеческого  $\beta$ -глобина. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из плазмиды pCER4 (Invitrogen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США).

Плазмида также может содержать энхансер, расположенный выше кодирующей последовательности. Энхансер может представлять собой энхансер человеческого актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатинина или вирусный энхансер, например, из ЦМВ, FMDV, РСВ или ВЭБ. Энхансеры полинуклеотидной функции описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и W094/016737, содержание которых в полном объеме включено посредством ссылки.

Плазмида также может содержать точку начала репликации млекопитающего для внехромосомной поддержки плазмиды и выработки множества копий плазмиды в клетке. Плазмида может представлять собой pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр и область, кодирующую ядерный антиген EBNA-1, которая может обеспечивать многокопийную эписомальную репликацию без интеграции. Скелет плазмиды может представлять собой pAV0242. Плазмида может быть дефективной по репликации плазмидой аденовируса типа 5 (Ad5).

Плазмида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для генной экспрессии в клетке, в которую внесена плазмида. Кодирующая последовательность может содержать кодон, который может обеспечивать более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

Кодирующая последовательность также может содержать лидерную последовательность Ig. Лидерная последовательность

может располагаться в направлении 5'-конца кодирующей последовательности. Консенсусные антигены, кодированные данной последовательностью, могут содержать N-концевой лидер Ig, а затем белок консенсусного антигена. N-концевой лидер Ig может быть IgE или IgG.

Плазмида может представлять собой pSE420 (Invitrogen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), которую можно использовать для выработки белка в *Escherichia coli* (E. coli). Плазмида также может представлять собой pYES2 (Invitrogen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), которую можно использовать для выработки белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазмида также может принадлежать к полной бакуловирусной системе экспрессии MAXVAC™ (Invitrogen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), которую можно использовать для выработки белка в клетках насекомых. Плазмида также может представлять собой pCDNA I или pCDNA3 (Invitrogen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), которые можно использовать для выработки белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO).

### **РНК-векторы**

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. Соответственно, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлена молекула РНК, кодирующая один или более генов оболочечных гликопротеинов (GP) *Marburg marburgvirus* (MARV), *Sudan ebolavirus* (SUDV) или *Zaire ebolavirus* (ZEBOV). РНК может быть смысловой (плюс-цепь). Соответственно, в некоторых вариантах реализации молекула РНК может быть транслирована клетками без необходимости каких-либо промежуточных этапов репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, подходящая для использования в изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп может усиливать трансляцию РНК in vivo. 5'-Нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь группу трифосфата на 5'-конце. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через мостик 5'-к-5'. Молекула РНК может иметь поли-А хвост на 3'-конце. Около своего

3'-конца она может также содержать последовательность, отвечающую за распознавание поли-А полимеразы (например, AAUAAA). Молекула РНК, используемая в изобретении, обычно является одноцепочечной.

### **Линейные векторы**

Также в данном документе представлена вакцина на основе линейной нуклеиновой кислоты или линейной экспрессионной кассеты (ЛЭК), которая может быть эффективно доставлена субъекту посредством электропорации и экспрессировать один или более необходимых антигенов. ЛЭК может представлять собой любую линейную ДНК, в которой отсутствует какой-либо фосфатный остов. ДНК может кодировать один или более антигенов. ЛЭК может содержать промотор, интрон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования. Экспрессия антигена может контролироваться промотором. ЛЭК может не содержать каких-либо генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатный остов. ЛЭК может не содержать другие последовательности нуклеиновых кислот, не связанные с экспрессией необходимого гена антигена.

ЛЭК может быть получена из любой плазмиды, которую возможно линеаризовать. Плазида может быть способна экспрессировать антиген. Плазида может представлять собой pVAX, pcDNA3.0 или pGroach, или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК и обеспечивать клеточную трансляцию последовательности к антигену, который распознается иммунной системой.

ЛЭК может быть получена из любой плазмиды, которую возможно линеаризовать. Плазида может быть способна экспрессировать антиген. Плазида может представлять собой pVAX, pcDNA3.0 или pGroach, или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК и обеспечивать возможность клетке транслировать последовательность в антиген, который распознается иммунной системой.

### **Вирусные векторы**

В одном варианте реализации предложены вирусные векторы, способные доставлять нуклеиновую кислоту настоящего изобретения в клетку. Вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме

вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области и описаны, например, у Sambrook et al. (2001), и у Ausubel et al. (1997), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров. (См., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6 326 193). Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом переноса генов в клетки млекопитающих, например клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патент США №№ 5 350 674 и 5 585 362.

#### **Композиции**

Представлены композиции, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот. Композиции могут содержать множество копий одной молекулы нуклеиновой кислоты, например одну плазмиду, множество копий двух или более различных молекул нуклеиновых кислот, например две или более различных плазмид. Например, композиция может содержать множество из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более различных молекул нуклеиновых кислот. Такие композиции могут содержать множество из двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных плазмид.

Композиции могут содержать молекулы нуклеиновых кислот, например плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность для одного иммуногена белка филловируса, выбранного из группы, включающей один или несколько из следующего: консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный

оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

Композиция содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует комбинацию из следующего: консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire*



консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*.

Каждая кодирующая последовательность для каждого из иммуногенов белков филловирuсов предпочтительно включена в отдельную плазмиду.

Соответственно, композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*; консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, могут находиться на одной плазмиде, но предпочтительно на двух отдельных плаزمидах.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*; или консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*; могут находиться на одной плазмиде или на двух плаزمидах в любой пермутации, но предпочтительно на трех отдельных плазмидах.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg*

*marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плаزمидях в любой пермутации, или на трех плазмидях в любой пермутации, или на четырех плазмидях в любой пермутации, но предпочтительно находятся на пяти отдельных плазмидях.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидях в любой пермутации, или на трех плазмидях в любой пермутации, или на четырех плазмидях в любой пермутации, но предпочтительно находятся на пяти отдельных плазмидях.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидях в любой пермутации, или на трех плазмидях в любой пермутации, или на четырех плазмидях в любой пермутации, но предпочтительно находятся на пяти отдельных плазмидях.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы

2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плаزمидах в любой пермутации, или на трех плазмидах в любой пермутации, или на четырех плазмидах в любой пермутации, или на пяти плазмидах в любой пермутации, но предпочтительно находятся на шести отдельных плазмидах.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидах в любой пермутации, или на трех плазмидах в любой пермутации, или на четырех плазмидах в любой пермутации, или на пяти плазмидах в любой пермутации, но предпочтительно находятся на шести отдельных плазмидах.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидах в любой пермутации, или на трех плазмидах в любой пермутации, или на четырех плазмидах в любой пермутации, или на

пяти плаزمидах в любой пермутации, но предпочтительно находятся на шести отдельных плазмидях.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный *Zaire ebolavirus* оболочечный гликопротеиновый иммуноген, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидях в любой пермутации, или на трех плазмидях в любой пермутации, или на четырех плазмидях в любой пермутации, или на пяти плазмидях в любой пермутации, или на шести плазмидях в любой пермутации, но предпочтительно находятся на семи отдельных плазмидях.

Композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидях в любой пермутации, или на трех плазмидях в любой пермутации, или на четырех плазмидях в любой пермутации, или на пяти плазмидях в любой пермутации, или на шести плазмидях в любой пермутации, но предпочтительно находятся на семи отдельных плазмидях.

Подобным образом, композиции, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный оболочечный

гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, могут находиться на одной плазмиде или на двух плазмидах в любой пермутации, или на трех плазмидах в любой пермутации, или на четырех плазмидах в любой пермутации, или на пяти плазмидах в любой пермутации, или на шести плазмидах в любой пермутации, или на семи плазмидах в любой пермутации, но предпочтительно находятся на восьми отдельных плазмидах.

### **Вакцина**

В данном документе представлена вакцина, способная вызывать у млекопитающего иммунный ответ против филовируса, в частности *Marburgvirus*, *Ebolavirus Sudan* и/или *Ebolavirus Zaire*. Вакцина может содержать каждую плазмиду, как описано выше. Вакцина может содержать множество плазмид или их комбинации. Вакцина может быть представлена для индукции терапевтического или профилактического иммунного ответа.

Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*. Вакцины можно применять для доставки

молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus* и оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus* и оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea* и оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген вируса Эбола Заир, первый консенсусный оболочечный

гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus 2014*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea*, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй

консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, консенсусный *Zaire ebolavirus Guinea* оболочечный гликопротеиновый иммуноген, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины можно применять для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Zaire ebolavirus Guinea* оболочечный гликопротеиновый иммуноген, консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Sudan ebolavirus*, оболочечный гликопротеин *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, первый консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*, второй консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* и третий консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus*. Вакцины предпочтительно представляют собой композиции, содержащие плазмиды.

Вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство может представлять собой функциональные молекулы в качестве несущих сред, адъювантов, носителей или разбавителей. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой облегчающий трансфекцию агент, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКОМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как из сквалена и сквалена, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию агенты.

Облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Облегчающее трансфекцию средство представляет собой поли-L-глутамат, и более предпочтительно поли-L-глутамат присутствует в вакцине в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент, который также может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКОМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как из сквалена и сквалена, и гиалуроновую кислоту, также можно использовать для введения в сочетании с генетической конструкцией. В некоторых вариантах осуществления вакцины на основе ДНК-плазмид также может включать облегчающее трансфекцию средство, например липиды, липосомы, в том числе липосомы на основе лецитина или другие липосомы, известные в данной области техники, в качестве смеси ДНК-липосом (см., например, W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию средства. Предпочтительно, облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация трансфекционного агента в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1

мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство может представлять собой одно или несколько адъювантов. Адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются из той же или из альтернативной плазмиды, или доставляются в вакцине в качестве белков в комбинации с указанной выше плазмидой. Один или более адъювантов могут представлять собой белки и/или молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, выбранные из группы, состоящей из следующего: CCL20,  $\alpha$ -интерферон (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферон (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, фактор роста эпидермиса (EGF), кожный привлекающий Т-клетки хемокин (СТACK), эпителиальный экспрессируемый вилочковой железой хемокин (ТЕСК), мукозальный эпителиальный хемокин (МЕС), IL-12, IL-15, в том числе IL-15 с сигнальной последовательностью или кодирующей последовательностью, которая кодирует сигнальную последовательность, удаленную и необязательно содержащую другой сигнальный пептид, например сигнальный пептид из IgE, или кодирующей последовательностью, которая кодирует другой сигнальный пептид, например сигнальный пептид из IgE, IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста сосудистого эндотелия, Fas, TNF-рецептор, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспаза ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, неактивная NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферонового ответа, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\times$ 40, O $\times$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты или их комбинация. В

некоторых вариантах осуществления адъювант может представлять собой один или более белков и/или молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, выбранные из группы, состоящей из: ССL-20, IL-12, IL-15, IL-28, СТАСК, ТЕСК, МЕС или RANTES. Примеры конструкций и последовательностей IL-12 раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US1997/019502 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 08/956 865, и предварительной заявке на патент США с серийным № 61/569600, поданной 12 декабря 2011 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Примеры конструкций и последовательностей IL-15 раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US04/18962 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 10/560650, и в заявке РСТ № РСТ/US07/00886 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 12/160 766, и в заявке РСТ № РСТ/US10/048827, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Примеры конструкций и последовательностей IL-28 раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US09/039648 и соответствующей заявке на патент США с серийным номером № 12/936 192, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Примеры RANTES и других конструкций и последовательностей раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US1999/004332 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 09/622452, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US11/024098, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры RANTES и других конструкций и последовательностей раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US1999/004332 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 09/622452, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US11/024098, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры конструкций и последовательностей хемокинов СТАСК, ТЕСК и МЕС раскрыты в заявке РСТ № РСТ/US2005/042231 и соответствующей заявке на патент США с серийным № 11/719 646, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Примеры OX40 и других иммуномодуляторов раскрыты в заявке на патент США с серийным №

10/560 653, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры DR5 и других иммуномодуляторов раскрыты в заявке на патент США с серийным № 09/622452, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Вакцина может дополнительно содержать генетическое облегчающее перенос средство для вакцины, как описано в заявке на патент США № 021 579, поданной 1 апреля 1994 г., содержание которой в полном объеме включено посредством ссылки.

Вакцина может содержать консенсусные антигены и плазмиды в количестве от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или предпочтительно от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или более предпочтительно от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграммов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от приблизительно 10 нанограмм до приблизительно 800 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограмм, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограмм, от приблизительно 1 нанограмм до 100 миллиграмм; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграмм; от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграмм; от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграмм, от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограмм, от приблизительно 10 нанограмм до приблизительно 800 микрограмм, от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограмм, от приблизительно 1 до

приблизительно 350 микрограмм, от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограмм, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограмм консенсусного антигена или его плазмиды.

Вакцина может быть приготовлена в соответствии с применяемым режимом введения. Инъекционная фармацевтическая композиция вакцины может быть стерильной, апиrogenной и не содержать частиц. Можно использовать изотонический состав или раствор. Добавки для придания изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Вакцина может содержать сосудосуживающее средство. Изотонические растворы могут включать забуференный фосфатом солевой буфер. Вакцина может дополнительно содержать стабилизаторы, в том числе желатин и альбумин. Стабилизация может обеспечивать для состава вакцины стабильность состава при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение длительных периодов времени, например LGS или поликатионы, или полианионы.

Вакцина может быть стабильна при комнатной температуре (25 °C) в течение более 1 недели, в некоторых вариантах осуществления в течение более 2 недель, в некоторых вариантах осуществления в течение более 3 недель, в некоторых вариантах осуществления в течение более 4 недель, в некоторых вариантах осуществления в течение более 5 недель и в некоторых вариантах осуществления в течение более 6 недель. В некоторых вариантах осуществления вакцина стабильна в течение более одного месяца, более 2 месяцев, более 3 месяцев, более 4 месяцев, более 5 месяцев, более 6 месяцев, более 7 месяцев, более 8 месяцев, более 9 месяцев, более 10 месяцев, более 11 месяцев или более 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления вакцина стабильна в течение более 1 года, более 2 лет, более лет, или более 5 лет. В одном варианте осуществления вакцина стабильна при хранении в холодильнике (2–8 °C). Соответственно, в одном варианте осуществления вакцина не требует холодовой цепи с замораживанием. Вакцина стабильна, если она сохраняет свою биологическую активность в течение достаточного периода для

обеспечения ее предполагаемого применения (например, для обеспечения иммунного ответа у субъекта). Например, для вакцин, предназначенных для хранения, транспортировки и т. д., может быть необходимо, чтобы вакцины оставались стабильными от нескольких месяцев до нескольких лет.

#### **Способы доставки вакцины**

В данном документе представлен способ доставки вакцины для обеспечения генетических конструкций и белков консенсусного антигена, которые содержат эпитопы, которые делают их особенно эффективными против иммуногенов филовируса, в частности Marburgvirus, Ebolavirus Sudan и/или Ebolavirus Zaire, против которых может индуцироваться иммунный ответ. Способ доставки вакцины или вакцинацию можно осуществлять с целью индуцировать терапевтический и профилактический иммунный ответ. Процесс вакцинации может вызывать иммунный ответ у млекопитающего против филовируса, в частности Marburgvirus, Ebolavirus Sudan и/или Ebolavirus Zaire. Вакцину можно доставлять индивиду с целью модулировать активность иммунной системы млекопитающего и усиливать иммунный ответ. Доставка вакцины может представлять собой трансфекцию консенсусного антигена в виде молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и доставляется на поверхность клетки, после чего иммунная система распознает ее и индуцирует клеточный, гуморальный или и клеточный и гуморальный ответы. Доставка вакцины можно применять для индукции или обеспечения иммунного ответа у млекопитающих против филовируса, в частности Marburgvirus, Ebolavirus Sudan и/или Ebolavirus Zaire, посредством введения млекопитающим вакцины, как описано выше.

При доставке вакцины и плазмиды в клетки млекопитающего трансфицированные клетки будут экспрессировать и секретировать консенсусные антигены для каждой плазмиды, инъекционной из вакцины. Данные белки будут распознаваться иммунной системой как чужеродные и против них будут образовываться антитела. Данные антитела будут поддерживаться иммунной системой и будут обеспечивать эффективный ответ к последующим инфицированиям филовирусом, в частности Marburgvirus, Ebolavirus Sudan и/или

Ebolavirus Zaire.

Вакцину можно вводить млекопитающему для обеспечения иммунного ответа у млекопитающего. Млекопитающее может представлять собой человека, примата, отличного от человека примата, корову, крупный рогатый скот, овцу, козу, антилопу, бизона, буйвола, бизона, жвачных животных, оленя, ежей, слонов, ламу, альпаку, мышей, крыс и кур.

#### **Комбинированное лечение**

Вакцину можно вводить в комбинации с другими белками и/или генами, кодирующими CCL20,  $\alpha$ -интерферон,  $\gamma$ -интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, фактор роста эпидермиса (EGF), кожный привлекающий Т-клетки хемокин (СТАСК), эпителиальный экспрессируемый вилочковой железой хемокин (ТЕСК), мукозальный эпителиальный хемокин (МЕС), IL-12, IL-15, в том числе IL-15 с сигнальной последовательностью, удаленной и необязательно содержащей другой сигнальный пептид, например IgE сигнальный пептид, MHC, CD80, CD86, IL-28, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста сосудистого эндотелия, Fas, TNF-рецептор, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, неактивную NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферонового ответа, NF $\kappa$ B, Вах, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\alpha$ 40, O $\alpha$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят в комбинации с одним или более из следующих молекул нуклеиновых кислот и/или белков: молекулы нуклеиновых кислот, выбранные из группы, содержащей молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность, которая кодирует одно

или более из CCL20, IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TЕСK, MЕС и RANTES или их функциональные фрагменты, и белки, выбранные из группы, состоящей из следующего: CCL02, белок IL-12, белок IL-15, белок IL-28, белок STACK, белок TЕСK, белок MЕС или белок RANTES, или их функциональные фрагменты.

Вакцину можно вводить разными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, ингаляционный, буккальный, интраплевральный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный и внутрисуставной или их комбинацию. В случае ветеринарного применения композицию можно вводить в подходящем приемлемом составе в соответствии с общепринятой ветеринарной практикой. Ветеринар может без труда определять режим дозирования и путь введения, которые наиболее подходит для конкретного животного. Вакцину можно вводить с помощью традиционных шприцов, безыгольных устройств для инъекций, «пушек для бомбардировки микрочастицами» или других физических способов, таких как электропорация (ЭП), «гидродинамический способ» или ультразвук.

Плазида вакцины может быть доставлена млекопитающему посредством нескольких хорошо известных методик, в том числе, инъекции ДНК (также называемой вакцинацией ДНК) с электропорацией *in vivo* или без нее, опосредованным липосомами, облегчаемым наночастицами, введением с рекомбинантными векторами, например рекомбинантным аденовирусом, рекомбинантным аденоассоциированным вирусом и рекомбинантной вакциной. Консенсусный антиген может быть доставлен посредством инъекции ДНК и вместе с электропорацией *in vivo*.

### **Электропорация**

Введение вакцины посредством электропорации плазмид вакцины можно осуществлять, используя устройства для электропорации, которые могут быть выполнены с возможностью подачи в необходимые ткани млекопитающего импульса энергии, эффективного для стимуляции образования обратимых пор в клеточных мембранах, и предпочтительно импульс энергии представляет собой постоянный

ток, аналогичный предварительно заданному пользователем входному току. Устройство для электропорации может содержать электропорационный компонент и комплект электродов или комплект держателя. Электропорационный компонент может содержать и включать в себя один или более различных элементов устройств для электропорации, включая: контроллер, генератор формы тока, тестер импеданса, устройство регистрации формы сигнала, элемент ввода, элемент отчета о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и переключатель питания. Электропорацию можно осуществлять с использованием устройства для электропорации *in vivo*, например системы CELLECTRA EP (VGX Pharmaceuticals, г. Блу Белл, штат Пенсильвания, США) или электропоратора Elgen (Genetronics, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Электропорационный компонент может функционировать как один элемент устройств для электропорации, а другие элементы являются отдельными элементами (или компонентами), связанными с электропорационным компонентом. Электропорационный компонент может функционировать как более чем один элемент устройств для электропорации, который может быть связан с другими элементами устройств для электропорации, отдельными от электропорационного компонента. Элементы и устройства для электропорации, являющиеся частями одного электромеханического или механического устройства, могут не ограничиваться, так как эти элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, связанные друг с другом. Электропорационный компонент может подавать импульс энергии, который обеспечивает постоянный ток в необходимой ткани, и содержит механизм обратной связи. Комплект электродов может включать матрицу из электродов, содержащую некоторое количество пространственно упорядоченных электродов, при этом комплект электродов получает импульс энергии от электропорационного компонента и доставляет его в необходимую ткань через электроды. По меньшей мере один из некоторого количества электродов является нейтральным во время подачи импульса энергии, измеряет импеданс в необходимой ткани и передает значение импеданса на электропорационный компонент.

Механизм обратной связи может получать измеренное значение импеданса и может корректировать импульс энергии, подаваемый электропорационным компонентом, для поддержания постоянного тока.

Некоторое количество электродов могут подавать импульс энергии децентрализованным образом. Некоторое количество электродов могут подавать импульс энергии децентрализованным образом посредством управления электродами согласно программируемой последовательности, а программируемая последовательность вводится пользователем в электропорационный компонент. Программируемая последовательность может содержать некоторое количество импульсов, подаваемых в последовательности, причем каждый импульс из некоторого количества импульсов подается по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, а следующий импульс из некоторого количества импульсов подается другим из по меньшей мере двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи может осуществляться аппаратным или программным обеспечением. Механизм обратной связи может осуществляться аналоговым замкнутым контуром. Обратная связь происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительно представляет собой обратную связь в режиме реального времени или мгновенную (т. е. по существу мгновенную по определению доступными методами определения времени ответа). Нейтральный электрод может измерять значение импеданса в необходимой ткани и передавать значение импеданса на механизм обратной связи, а механизм обратной связи в ответ на значение импеданса корректирует импульс энергии для поддержания значения постоянного тока, аналогичного предварительно заданному току. Механизм обратной связи может поддерживать постоянный ток непрерывно и мгновенно во время подачи импульса энергии.

Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчать доставку ДНК-вакцин по настоящему изобретению, включают описанные в патенте США № 7245963 авторства Draghia-Akli, с соавт., публикации патента США

2005/0052630, поданной Smith, с соавт., содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Другие устройства для электропорации и способы электропорации, которые можно использовать для облегчения доставки ДНК-вакцин, включают предложенные в одновременно находящейся на рассмотрении заявке тех же заявителей на патент США, серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 г., которая заявляет приоритет согласно 35 USC 119(e) по предварительным заявкам США № 60/852 149, поданной 17 октября 2006 г., и 60/978 982, поданной 10 октября 2007 г., которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В патенте США № 7 245 963 авторства Draghia-Akli, с соавт., описаны модульные системы электродов и их применение для облегчения введения биомолекул в клетки выбранной ткани в организме или растении. Модульные системы электродов могут содержать некоторое количество игольчатых электродов; гиподермическую иглу; электрический соединитель, который обеспечивает проводящее соединение программируемого контроллера импульсов постоянного тока с некоторым количеством игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может брать некоторое количество игольчатых электродов, которые находятся на опорной конструкции и плотно вставлять их в выбранную ткань в организме или растении. Затем происходит доставка биомолекул в выбранную ткань через гиподермическую иглу. Происходит активация программируемого импульсного контроллера постоянного тока и применение электрического импульса постоянного тока к некоторому количеству игольчатых электродов. Применяемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекулы в клетку между некоторым количеством электродов. Полное содержание патента США № 7245963 включено в данный документ посредством ссылки.

В публикации патента США 2005/0052630, поданной Smith, с соавт., описано устройство для электропорации, которое можно использовать, чтобы эффективным образом облегчать введение биомолекул в клетки выбранной ткани в организме или растении. Устройство для электропорации содержит электрокинетическое

устройство (ЭКУ устройство), чья работа определяется программным или встроенным программным обеспечением. ЭКУ устройство создает ряд программируемых профилей импульсов постоянного тока между электродами в матрице под управлением пользователем и на основании введенных параметров импульсов, и позволяет хранить и получать данные о форме тока. Устройство для электропорации также содержит сменный электродный диск, содержащий матрицу из игольчатых электродов, центральный инъекционный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Полное содержание публикации патента США 2005/0052630 включено в данный документ посредством ссылки.

Электродные матрицы и способы, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/0052630, можно адаптировать для глубокого проникновения не только в ткани, такие как мышцы, но также в другие ткани или органы. Вследствие конфигурации электродной матрицы инъекционная игла (для доставки биомолекулы по выбору) также полностью вставляется в целевой орган, а инъекция проводится перпендикулярно целевой ткани в области, которая заранее намечена электродами. Электроды, описанные в патенте США № 7 245 963 и публикации патента США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и калибр 21.

Кроме того, подразумевается, что в некоторых вариантах реализации, которые включают в себя устройства для электропорации и их применение, используются устройства для электропорации, описанные в следующих патентах: патент США 5 273 525, выданный 28 декабря 1993 г., патенты США 6 110 161, выданный 29 августа 2000 г., 6 261 281, выданный 17 июля 2001 г., и 6 958 060, выданный 25 октября 2005 г., и патент США 6 939 862, выданный 6 сентября 2005 г. Кроме того, в данном документе предусмотрено применение объектов изобретений из патентов, таких как патент США 6 697 669, выданный 24 февраля 2004 г., который относится к доставке ДНК с помощью различных устройств, и патент США 7 328 064, выданный 5 февраля 2008, относящийся к способу инъекции ДНК. Вышеуказанные патенты в полном объеме включены посредством ссылки.

**Способ получения ДНК-плазмид**

В данном документе представлены способы получения ДНК-плазмид, которые содержат ДНК-вакцины, описанные в данном документе. ДНК-плазмиды, после конечной стадии субклонирования до экспрессионной плазмиды млекопитающего, можно применять для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментационном реакторе, с использованием известных в данной области техники способов.

ДНК-плазмиды для применения в устройствах ЭП по настоящему изобретению могут быть составлены или произведены с использованием комбинации известных устройств и методик, но предпочтительно их изготавливают с использованием оптимизированной методики получения плазмид, которая описана в лицензированной одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявке на патент США с серийным № 60/939 792, которая была подана 23 мая 2007 года. В некоторых примерах ДНК-плазмиды, применяемые в данных исследованиях, могут быть составлены в концентрациях не менее 10 мг/мл. Технологические методики также включают применение различных устройств и протоколов, которые являются общеизвестными для специалистов в данной области техники, в дополнение к описанным в заявке на патент США, серийный № 60/939792, включая описанные в лицензированном патенте США № 7,238,522, выданном 3 июля 2007 года. Вышеуказанные заявка и патент, серийный № 60/939 792 и патент США № 7 238 522, соответственно, в полном объеме включены в данный документ.

#### **ПРИМЕРЫ**

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, хотя в них и указаны предпочтительные варианты реализации изобретения, приведены исключительно в иллюстративных целях. Из приведенного выше обсуждения и этих примеров специалист в данной области техники может установить важные характеристики этого изобретения и, не выходя за рамки его сущности и объема, может осуществлять различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его под различные потребности и условия. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение к

показанным и описанным в данном документе станут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания. Также подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

### **Пример 1**

#### **СПОСОБЫ**

##### **Конструкция вакцины на основе плазмид**

ДНК-конструкции на основе плазмид pMARV, pEBOS и pEBOZ кодируют полноразмерные белки GP. Стратегию аминокислотного консенсуса применяли для pEBOS и pEBOZ, тогда как соответствующая типу последовательность из штамма вспышки в Анголе в 2005 году (GenBank № VGP\_MABVR) применяли для pMARV (Towner JS, et al. (2006). Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol* **80**: 6497-6516). Консенсусные последовательности определяли путем выравнивания преобладающих аминокислотных последовательностей ZEBOV и SUDV GP и образования консенсуса для каждой из них. Каждый ген GP в вакцине был генетически оптимизирован для экспрессии у людей (в том числе кодон- и РНК-оптимизация для усиления экспрессии белка (GenScript, г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США)), синтезирован коммерчески, а затем субклонирован (GenScript, г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США) до модифицированных векторов экспрессии pVAX1 млекопитающих (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США) под контролем предраннего промотора цитомегаловируса (CMV); модификации включают 2A>C, 3C>T, 4T>G, 241C>G, 1,942C>T, 2,876A>-, 3,277C>T, и 3,753G>C. Филогенетический анализ осуществляли посредством множественного выравнивания с ClustalW с использованием программного обеспечения MEGA версии 5. В качестве альтернативы, при сравнении разнообразия GP среди MARV было значительно больше (идентичность на ~70%), так что стратегия консенсуса не была принята. Для охвата MARV авторы настоящего изобретения выбрали применение последовательности MGP из штамма вспышки в Анголе 2005 года (GenBank № VGP\_MABVR), поскольку только он отвечал за наибольшую и наиболее смертельную вспышку MARV в настоящее время. Данная последовательность более чем на 10% отличалась от

ее любого наиболее близкого кластера родственных штаммов, в том числе Musoke, Popp и Leiden (отличие на 10,6%), или Uganda (01Uga07), Durba (05DRC99 и 07DRC99) и Ozolin (отличие на 10,3%). В общей сложности, стратегия с тремя плазмидами образовала основу для данной новой стратегии с трехвалентной или поливалентной вакциной против филовируса.

#### **Трансфекции и иммуноблоттинг**

Клетки почек эмбриона человека (HEK) 293Т культивировали, трансфицировали и собирали. Вкратце, клетки выращивали в DMEM с 10% FBS, 1% пенициллина-стрептомицина, пируватом натрия и L-глутамином. Клетки культивировали в 150 мм чашках Corning и выращивали до 70% конфлюэнтности в течение ночи при 37° инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Планшеты трансфицировали с 10-25 мкг pDNA *Filoviridae* с использованием либо протокола набора для трансфекции млекопитающих Calphos™ (Clonetech) или реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя, а затем инкубировали в течение 24-48 ч. Клетки собирали с ледяным PBS, центрифугировали и промывали, а затем осаждали для Вестрен-иммуноблоттинга или анализа FACS. Применяли стандартный Вестерн-блоттинг и были получены GP-специфические МАб для обнаружения GP1. Данные экспериментов Вестерн-иммуноблоттинга показаны на фиг. 1B. Данные анализа FACS показаны на фиг. 1C.

#### **Животные, вакцинации и контрольное заражение**

Взрослых самок мышей C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), BALB/cJ (H-2<sup>d</sup>), и B10.Br (H-2<sup>k</sup>) получали от Jackson Laboratory (г. Бар Харбор, штат Мэн, США), а морских свинок линии Хартли от Charles River (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США). Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением указаний Комитета по содержанию и использованию лабораторных животных Пенсильванского университета и вивария медицинского факультета, или Комитета по уходу за животными института NML PHAS и руководства Канадского совета по вопросу об уходе за животными в отношении содержания и ухода за лабораторными животными, и они были проведены в соответствии с рекомендациями Руководство по содержанию и использованию

лабораторных животных NIH после надлежащего рассмотрения и одобрения указанными выше органами. Пенсильванский университет и NML соответствуют требованиям политики NIH о надлежащих условиях содержания животных, Закону о благополучии животных и всем другим пригодным федеральным государственным и местным законам.

Мышей иммунизировали внутримышечно (в.м.) посредством инъекции через иглу 40 мкг плазмиды, ресуспендированной в воде, а морских свинок иммунизировали внутрикожно (в.к.) по 200 мкг на каждую морскую свинку в три отдельные места вакцинации. Сразу же после вакцинаций проводили ЭП в той же области. Вкратце, трехзубчатое адаптивное малоинвазивное устройство CELLECTRA® с постоянным током вводили примерно на 2 мм внутрикожно (в.к.) (Inovio Pharmaceuticals, Inc., г. Блу Белл, штат Пенсильвания, США). Прямоугольные импульсы подавали посредством треугольной 3-электродной матрицы, состоящей из выполненных из твердой нержавеющей стали электродов 26 калибра, а два импульса постоянного тока по 0,1 А подавали в течение 52 мкс/импульс, разделенными задержкой в 1 с.

Для исследований контрольного смертельного заражения контрольные заражения были ограничены адаптированными к грызунам ZEBOV и MARV. Морских свинок заражали через 28 дней после конечной вакцинации посредством внутрибрюшинной (в.б.) инъекции 1000 LD<sub>50</sub> адаптированного к морским свинкам ZEBOV (21,3 ФФЕ/животное) (Richardson JS, Abou MC, Tran KN, Kumar A, Sahai VM, Kobinger GP (2011). Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis* **204 Suppl 3**: S1032-1042) или 1000 LD<sub>50</sub> MARV-Angola (681 TCID<sub>50</sub>/животное). Вкратце, адаптированный к морским свинкам MARV получали посредством серийных пассажей MARV-Angola дикого типа на аутбредных взрослых самках морских свинок линии Хартли. Через семь дней после инокуляции животных умерщвляли и печени собирали и гомогенизировали. Затем данный гомогенат инъецировали в.б. интактным взрослым морским свинкам и процесс повторяли до тех пор, пока животные не теряли в весе, снижался блеск шерсти и развивалась инфекция, подобная адаптации EBOV у

морских свинок. Для исследований смертельного контрольного заражения на мышах (Kobinger GP, et al. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* **346**: 394-401), мышам в.б. инъецировали 200 мкл 1000 LD<sub>50</sub> (10 ФФЕ/животное) адаптированного к мышам ZEBOV. Всех животных ежедневно взвешивали и наблюдали прогрессирование заболевания с использованием одобренного оценочного листа в течение по меньшей мере 18 дней для мышей и 22 дней для морских свинок. Всю инфекционную работу осуществляли в отделении уровня биологической безопасности 4 (BSL4) в NML, PHAC.

#### **ELISA и анализы нейтрализации**

Титры антитела (Ab) определяли с использованием 96-луночных планшетов для ELISA, покрытых либо очищенной сахарозой MARV Ozolin GP или ZGP, или с очищенным сахарозой белком Nipah G отрицательного контроля в концентрации 1:2000. Вкратце, затем планшеты инкубировали в течение 18 ч при 4 °С, промывали PBS и 0,1% Твин-20, и 100 мкл/образец сыворотки тестировали в трех повторностях (при разбавлениях 1:100, 1:400, 1:1600 и 1:6400 в PBS с 5% обезжиренного молока и 0,5% Твина-20). После инкубации при 37°С в течение 1 ч во влагосодержащем контейнере планшеты помывали, а затем добавляли 100 мкл конъюгированного с HRP антитела козы к мышинным IgG (Cedarlane) (разбавление 1:2000) и еще инкубировали при 37°С в течение 1 ч во влагосодержащем контейнере. После промывания добавляли 100 мкл ABST (2,2'-азино-бис(3-этилбентиазолин-6-сульфоновой кислоты) и пероксидазный субстрат (Cedarlane) для визуализации связывания Ab. Планшет снова инкубировали во влагосодержащем контейнере в течение 30 мин при 37 °С, а затем позже считывали при 405 нм. Результаты положительного связывания характеризовали как соответствующие > 3 SD при вычитании значения положительного контроля из значения сыворотки отрицательного контроля.

Осуществляли анализ нейтрализации ZEBOV. Вкратце, сыворотки, собранные у иммунизированных мышей и морских свинок, инактивировали при 56°С в течение 45 минут и серийные разведения каждого образца (1:20, 1:40 и т. д. для мышей и 1:50 для морских

свинок в 50 мкл DMEM) смешивали с равным объемом экспрессирующегося ZEBOV репотерным геном EGFP (ZEBOV-EGFP) (100 трансдуцирующих единиц/лунку, в соответствии с экспрессией EGFP) и инкубировали при 37°C в течение 90 минут. Затем смесь трансфицировали до субконфлюэнтных клеток VeroE6 в 96-луночных плоскодонных планшетах и инкубировали в течение 5-10 минут при 37°C. Контрольные лунки инфицировали равными количествами вируса ZEBOV-EGFP без добавления сыворотки или с неиммунной сывороткой. Затем добавляли 100 мкл DMEM, дополненной 20% FBS, в каждую лунку и планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч.

В качестве альтернативы, нейтрализацию MARV-Angola 368 оценивали с использованием иммунофлуоресцентного анализа. Для обнаружения применяли первичное Ab кролика к MARV и конъюгированное с FITC вторичное Ab козы к IgG кролика. Нейтрализующие Ab (NAb) против SUDV Boniface анализировали на основании цитопатического эффекта (CPE) на клетках CV-1. Клетки инкубировали с равными частями иммунизированной сыворотки и SUDV Boniface в течение 10 дней до последующего фиксирования с помощью 10% забуференного формалина в течение 24 часов и оценивали под световым микроскопом. Положительные клетки по EGFP и FITC подсчитывали в каждой лунке и разбавлениях образцов, демонстрирующих >50% снижение количества зеленых клеток по сравнению с контролями, определенными как положительные в отношении NAb. В качестве альтернативы, NAb против SUDV Boniface анализировали на основании цитопатического эффекта (CPE) на клетках CV-1. Всю инфекционную работу осуществляли в лаборатории BSL4 NML, PHAC.

#### **Выделение спленоцитов**

Мышей умерщвляли на 8-11 день после конечной иммунизации и собирали селезенки. Вкратце, селезенки помещали в среду RPMI 1640 (Mediatech Inc., г. Манассас, штат Виргиния, США), дополненной 10% FBS, 1X Anti-anti (Invitrogen) и 1X  $\beta$ -ME (Invitrogen). Спленоциты выделяли посредством механического разрушения селезенки с использованием аппарата Stomacher (Seward Laboratory Systems Inc., г. Богемия, штат Нью-Йорк, США), и

полученный в результате продукт фильтровали с использованием клеточного фильтра на 40 мкм (BD Falcon). Затем клетки обрабатывали в течение 5 мин помощью лизирующего буфера АСК (Lonza, Швейцария) для лизиса эритроцитов (RBC), промывали в PBS, а затем ресуспендировали в среде RPMI для применения в анализе ELISPOT или FACS.

#### **Анализ ELISPOT**

Осуществляли стандартный анализ IFN $\gamma$  ELISPOT. Вкратце, 96-луночные планшеты (Millipore, г. Биллерика, штат Массачусетс, США) покрывали иммобилизованным антителом захвата против мышиного IFN- $\gamma$  и инкубировали в течение 24 ч при 4°C (R&D Systems, г. Миннеаполис, штат Миннесота, США). На следующий день планшеты промывали с помощью PBS, а затем блокировали в течение 2 ч с помощью блокирующего буфера (1% BSA и 5% сахарозы в PBS). Спленоциты (1-2 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/лунка) помещали на планшеты в трех повторностях и стимулировали в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и в присутствии либо RPMI 1640 (отрицательный контроль), Con A (положительный контроль) или пептидов GP, либо отдельно (15-меры, перекрывающиеся 9 аминокислотами и охватывающие длины их соответствующего GP), либо объединенных вместе (конечная концентрация 2,5 мкг/мл). Через 18-24 ч стимуляции планшеты промывали в PBS, а затем инкубировали в течение 24 ч при 4°C с биотинилированным mAb против мышиного IFN- $\gamma$  (R&D Systems, г. Миннеаполис, штат Миннесота, США). Затем планшеты снова промывали в PBS, и добавляли в каждую лунку стрептавидин-щелочную фосфатазу (MabTech, Швеция) и инкубировали в течение 2 ч при КТ. В конце планшеты снова промывали в PBS, а затем добавляли BCIP/NBT Plus субстрат (MabTech) в каждую лунку в течение 5-30 мин для образования бляшек. Сразу после завершения процесса образования при визуальном осмотре планшет промывали дистиллированной водой, а затем высушивали в течение ночи при КТ. Бляшки подсчитывали с использованием автоматизированного считывающего устройства ELISPOT (Cellular Technology Ltd., район Шейкер Хайтс, штат Огайо, США).

Для комплексного анализа спектра действия Т-клеток

стандартный IFN $\gamma$  ELISPOT был модифицирован, как было ранее описано в Shedlock DJ, *et al.* (2012). ВЫШЕ. Идентификацию и измерение субдоминантных и иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов оценивали посредством стимулирования спленоцитов отдельными пептидами, в отличие от общего пула или матричных пулов пептидов; традиционная практика пептидных пулов для сохранения консервации образца, например применения матричных наборных пулов, обеспечивает в результате снижение чувствительности анализа, поскольку общие функциональные ответы в пулах, содержащих множество отображающих эпитопы пептидов, будет эффективно снижать разрешение анализа, т. е. обеспечивать «глушение сигнала» с более низкой величиной. Таким образом, модифицированный ELISPOT осуществляли с отдельными пептидами (15-меры, перекрывающиеся 9 аминокислотами; конечная концентрация 2,5 мкг/мл), охватывающими каждый иммуноген GP. Пептиды, содержащие Т-клеточные эпитопы, идентифицировали ( $\geq 10$  AVE IFN $\gamma$ + бляшек и  $\geq 80\%$  частота ответа у животных; обобщены в таблицах 1-6), а затем позже подтверждали функционально и фенотипически посредством FACS. Не было идентифицировано общих или частичных эпитопов, кроме того, данные FACS или программное обеспечение для прогнозирования эпитопов в Интернете не предполагали наличия CD4+ или CD8+ Т-клеточного эпитопа, который сохранялся внутри последующих пептидов. В данном случае, возможные общие/частичные Т-клеточные эпитопы были направлены во всех случаях последовательных пептидных ответов, как определено посредством модифицированного анализа ELISPOT. Клетки стимулировали отдельно с каждым из последовательных пептидов, а также парно соединяли в комбинацию для прямого сравнения, и определяли как «общие/частичные», если комбинированный ответ не превышал какой-либо из двух отдельных ответов. Кроме того, следует отметить, что эпитопный ответ, представленный в данном документе, может не быть полностью исчерпывающим, поскольку алгоритм «15-меров, перекрывающихся 9 аминокислотами» для образования пептидов отклонялся к полному охвату CD8 Т-клеточных эпитопов, что может недооценивать CD4 Т-клеточные ответы в связи

с природой ограниченных классом II эпитопов, имеющих длину более 15 аминокислот. В конце, графики сходства аминокислот были сгенерированы с помощью программного обеспечения Vector NTI, и результаты показаны на фиг. 4В.

### **Проточная цитометрия**

Спленоциты добавляли в 96-луночный планшет (1 x10<sup>6</sup> клеток/луночку) и стимулировали в течение 5-6 ч либо отдельными пептидами, либо «минимальными пептидными пулами» (конечная концентрация 2,5 мкг/мл). Стимуляцию отдельными пептидами применяли для функционального подтверждения всех пептидов, идентифицированных посредством модифицированного ELISPOT (таблицы 1-6), а также фенотипической характеристики. Спленоциты и трансфицированные 293Т вначале предварительно окрашивали с помощью набора для фиксируемого окрашивания мертвых клеток фиолетовым красителем LIVE/DEAD® Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). В отношении спленоцитов клетки поверхностно окрашивали по CD19 (V450; клон 1D3), CD4 (PE-Cy7; клон RM4-5), CD8 $\alpha$  (APC-Cy7; клон 53-6.7) и CD44 (PE-Cy5; клон IM7) (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США), трижды промывали в PBS+1% FBS, пермеабелизировали с помощью набора BD Cytotfix/Cytoperm™, а затем окрашивали внутриклеточно с помощью IFN $\gamma$  (APC; клон XMG1.2), TNF (FITC; клон MP6-XT22), CD3 (PE-cy5.5; клон 145-2C11) и T-bet (PE; клон 4B10) (eBioscience, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США). Экспрессию GP в трансфицированных клетках 293Т оценивали через 24 ч после трансфекции. Непрямое окрашивание осуществляли после 30 мин инкубации при 4°C в PBS+1% FBS, содержащем указанный полученный из мышей GP-специфический поликлональный сывороточный реагент (разбавление 1:200), каждый из которых получен путем объединения сыворотки от мышей H-2<sup>b</sup>, иммунизированных трижды с помощью соответствующей ДНК-вакцины или контроля с пустым вектором pVAX1. Затем клетки окрашивали с помощью FITC-конъюгированного антитела козы к мышьиному IgG (BioLegend, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), тщательно промывали, а затем окрашивали для МНС класса I (HLA-ABC; PE-Cy7; клон G46-2.6; BD). Все клетки

фиксируют в 1% параформальдегида. Все данные получали, используя проточный цитометр LSRII (BD), и анализировали, используя программное обеспечение FlowJo (Tree Star, г. Ашленд, штат Орегон, США). Отбирали гейт спленоцитов для активированных продуцирующих IFN $\gamma$  Т-клеток, которые представляли собой CD3+ CD44+, CD4+ или CD8+, и негативные для В-клеточного маркера CD19 и красителя для определения жизнеспособности.

На фиг. 6 показан отбор гейта GP-специфических Т-клеток. Функциональный и фенотипический анализ для пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, как определено ELISPOT, осуществляли посредством отбора гейта FACS общих лимфоцитов, живых клеток (LD) CD3+, которые были негативны в отношении CD 19 и LIVE-DEAD (живая-мертвая) (канал отклонения), синглетов (исключает парные клетки), клеток CD4+ и CD8+, активированных клеток (CD44+) и пептид-специфических продуцирующих IFN $\gamma$  Т-клеток.

#### **Статистический анализ**

Значимость для некорневых филогенетических схем определяли посредством способа максимального правдоподобия и подтверждали посредством бутстреп-анализа, а значения значимой поддержки ( $\geq 80\%$ ; 1000 бутстреп-репликатов) определяли посредством программного обеспечения MEGA версии 5. Анализы групп завершали посредством связанного двустороннего критерия Стьюдента для одной выборки и кривые выживаемости анализировали посредством логарифмического рангового теста (Мантеля-Кокса). Все значения являются средним $\pm$ SEM, и статистические анализы осуществляли посредством GraphPad Prism (г. Ла-Холья, штат Калифорния, США).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### **Конструкция и экспрессия вакцины**

В ходе филогенетического анализа была обнаружена относительная консервативность среди GP EBOV (94,4% для SUDV и 92,9% для ZEBOV), тогда как GP MARV (MGP) были более разнообразными (консервативны на  $\sim 70\%$ ). Таким образом, стратегия консенсуса, как определено посредством выравнивания преобладающих аминокислотных последовательностей ZEBOV и SUDV GP, адаптировали для GP EBOV, тогда как соответствующую типу

стратегию применяли для MARV с использованием последовательности штамма вспышки в Анголе 2005 года, который исключительно отвечал за наибольшую и наиболее смертельную вспышку MARV. Каждый трансген GP был генетически оптимизирован, синтезирован коммерчески, а затем субклонирован до модифицированного вектора экспрессии pVAX1 млекопитающего. В общей сложности, стратегия с тремя плазмидами образовала основу для данной новой стратегии с поливалентной вакциной против филовируса.

НЕК 293Т-клетки трансфицировали отдельно с каждой плазмидой, и экспрессию GP оценивали посредством Вестерн-иммуноблоттинга и FACS. Белок ~130 кДа наблюдали в каждом из клеточных лизатов, собранных через 48 ч после трансфекции с использованием видоспецифических mAb к GP1 для обнаружения. Результаты показаны на фиг. 1В. Для сравнительного контроля рекомбинантные вирусы везикулярного стоматита (rVSV), экспрессирующие соответствующие GP, загружали в параллельные полосы. Затем экспрессию GP на поверхности клеток анализировали через 24 ч после трансфекции посредством непрямого окрашивания с помощью GP-специфической или контрольной поликлональной сыворотки посредством FACS. Результаты показаны на фиг. 1С. Экспрессию на поверхности клеток определяли для всех плазмид вакцин, при этом наблюдали незначительное неспецифическое связывание; контрольная сыворотка не реагировала с GP-трансфицированными клетками, как и положительная сыворотка с pVAX1-трансфицированными клетками (данные показаны для pEBOZ). Как ожидалось для GP EBOV, экспрессия на поверхности клеток пространственно препятствует распознаванию поверхностного МНС класса I, а также  $\beta$ 1-интегрину (Francica JR, Varela-Rohena A, Medvec A, Plesa G, Riley JL, Bates P (2010). Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS Pathog* 6: e1001098).

#### **Полная защита против контрольного заражения MARV и ZEBOV**

Для определения эффективности защиты авторы настоящего изобретения использовали модель доклинического контрольного заражения на морских свинках. Доклинические исследования

иммуногенности и эффективности осуществляли в данном случае с использованием моделей на морских свинках и мышах. Доклиническая модель на морских свинках была широко использована в качестве инструмента для скрининга и «доказательства концепции» для разработки вакцины против филовируса. Несмотря на то, что первичные изоляты MARV и EBOV вызывают несмертельное заболевание у морских свинок, небольшое количество пассажей в данном хозяине приводит к селекции вариантов, способных вызвать смертельное заболевание с патологическими свойствами, сходными наблюдаемым у инфицированных филовирусом приматов. Подобным образом, мышей также широко применяли для разработки вакцины против филовируса, тем не менее, в отличие от модели на морских свинках, для них широко доступны реагенты для иммунологического анализа для оценки иммунитета и Т-клеточных ответов. Инфицирование с помощью адаптированного к мышам ZEBOV (mZEBOV) обеспечивает в результате заболевание, характеризующееся высокими уровнями вируса в целевых органах и патологические изменения в печени и селезенках, схожие с обнаруженными у инфицированных EBOV приматов.

Морских свинок (n=24) иммунизировали внутрикожно (в.к.) дважды с помощью 200 мкг каждой плазмиды (pEBOZ, pEBOS и pMARV) в три различные места вакцинации или с помощью контроля с пустым вектором pVAX1 (n=9), а затем иммунизировали посредством бустерной иммунизации теми же вакцинами через месяц. Животных заражали через 28 дней после второй иммунизации с помощью 1000 LD<sub>50</sub> адаптированного к морским свинкам MARV-Angola (gpMARV) (n=9) или ZEBOV (gpZEBOV) (n=15) в отделении BSL-4, а затем ежедневно наблюдали и взвешивали. Результаты показаны на фиг. 2А-2Н. Вакцинированные животные были полностью защищены, тогда как у вакцинированных контролем животных развивался gpMARV до 10 дней после контрольного заражения (n=3; P=0,0052) или gpZEBOV до дня 7 после контрольного заражения (n=6; P=0,0008) (фиг. 2А и фиг. 2Е). Кроме того, вакцинированные животные были защищены от потери веса (фиг. 2В и фиг. 2F; P < 0,0001). По-видимому, индуцированные вакциной Ab, возможно, способствовали защите, поскольку GP-специфические Ab в смешанной сыворотке

демонстрировали значимое повышение в титрах связывания (фиг. 2С и фиг. 2G) и нейтрализации (фиг. 2D и фиг. 2H). Эксперименты осуществляли в отделении BSL-4 и повторяли дважды со сходными результатами, и столбики ошибок на фиг. А-2H представляют SEM. Анализы групп завершали посредством связанного двустороннего критерия Стьюдента для одной выборки и кривые выживаемости анализировали посредством логарифмического рангового теста (Мантеля-Кокса).

#### **Вакцины на основе плазмид были высоко иммуногенными**

Для лучшего определения характеристик иммунных взаимосвязей, обеспечиваемых защитной ДНК-вакциной (плазмиды pEBOZ, pEBOS и pMARV, также называемой трехвалентной ДНК-вакциной), далее авторы настоящего изобретения использовали модель на мышах, которая широко применялась в качестве инструмента скрининга и «доказательства концепции» для разработки вакцины против филовируса, и в отношении которой широко доступны реагенты для иммунологического анализа. Сначала оценивали В-клеточные ответы у мышей H-2<sup>d</sup> (n=5/группу) через 20 дней после каждой из двух вакцинаций, с трехнедельными промежутками между инъекциями 40 мкг соответствующей одновалентной ДНК-вакцины. Данные этих экспериментов показаны на фиг. 3А-3С. Поскольку в предварительно контрольных образцах до иммунизации наблюдался незначительная концентрация GP-специфического IgG, как показано на фиг. 3А и фиг. 3В, у всех животных было обнаружено значительное ее повышение после вакцинации. Поскольку очищенный SGP был недоступен, в качестве заменителя применяли очищенный ZGP. IgG у вакцинированных SUDV мышей связывал ZGP, демонстрируя способность к образованию индуцированных вакциной Ab, а также их способность к межвидовому распознаванию. Кроме того, сероконверсия возникала у 100% вакцинированных животных после только одной иммунизации, после чего ответы были значительно увеличены посредством гомологичной бустерной иммунизации; титры AVE, обратные конечному разведению, посредством бустерной иммунизации 22,1-кратно увеличены у иммунизированных pMARV мышей, и 3,4-кратно и 8,6-кратно увеличены у вакцинированных pEBOS и pEBOZ животных,

соответственно. Далее образцы анализировали в отношении нейтрализации ZEBOV, SUDV-Bonifac и MARV-Angola в отделении BSL-4. Результаты анализа нейтрализации показаны на фиг. 3С. Значительные повышения титров NAb были обнаружены после вакцинации всех животных.

Мышей из двух различных фоновых генетипов (Н-2<sup>d</sup> и Н-2<sup>b</sup>; n=5/группу) иммунизировали 40 мкг соответствующих плазмид pEBOZ, pEBOS и pMARV, проводили гомологичную бутерную иммунизацию через две недели, а затем умерщвляли через 8 дней для анализа Т-клеток. Результаты нового модифицированного анализа ELISPOT для оценки комплексного индуцированного вакциной Т-клеточного ответа, в котором спленоциты стимулировали с использованием отдельных пептидов, в отличие от матричных пулов, показаны на фиг. 4А. ДНК-вакцинация индуцировала устойчивые ответы IFN $\gamma$ +, которые распознавали разнообразие эпитопов Т-клеток (таблицы 1-6). Все положительные содержащие эпитопы пептиды затем отбирали в гейт (см. фиг. 6), подтверждали и дополнительно характеризовали посредством FACS. Данный модифицированный подход ELISPOT оказался чрезвычайно чувствительным, поскольку фоновые ответы профилей из контрольных лунок были низкими (7,2 $\pm$ 0,2 IFN $\gamma$ -продуцирующих БОЕ/10<sup>6</sup> спленоцитов у мышей Н-2<sup>b</sup> и 9,2 $\pm$ 0,5 - у Н-2<sup>d</sup>). Результаты, показанные на фиг. 4А, выявили, что вакцинация с помощью pMARV индуцировала 9 измеряемых эпитопов у мышей Н-2<sup>b</sup> и 11 - у мышей Н-2<sup>d</sup>, pEBOS индуцировал 9 и 8, а pEBOZ образовывал 10 и 12 в данных соответствующих штаммах. Поскольку пять из девяти (55,6%) эпитопов из иммунизированных pMARV мышей Н-2<sup>b</sup> были CD8+, они составляли приблизительно 57,3% общего MGP-специфического ответа IFN $\gamma$ +, измеренного как посредством подтверждения ELISPOT, так и FACS и фенотипического анализа. Подобным образом, только 33% и 38% подтвержденных эпитопов были ограничены CD8 у иммунизированных pEBOS мышей Н-2<sup>b</sup> и Н-2<sup>d</sup>, соответственно. Тем не менее, данные эпитопы составляли около 50-90% общего ответа; CD8+ Т-клеточные ответы оценивали как примерно 56% в обоих мышинных породах, тогда как оценки FACS составляли 51% и 90% у мышей Н-2<sup>b</sup> и Н-2<sup>d</sup>, соответственно. Общие

ответы CD8<sup>+</sup> были ниже у вакцинированных рЕВОЗ животных и составляли от 33% до 57% (33% для обеих пород посредством ELISPOT и 6% и 57% для мышей Н-2<sup>b</sup> и Н-2<sup>d</sup>, соответственно, посредством FACS).

Один иммунодоминантный эпитоп был обнаружен в обеих мышинных породах, получающих рЕВОС, при этом иммунодоминантный эпитоп был слабо определен как генерирующий ответ IFN $\gamma$  по меньшей мере двукратно превышая наиболее субдоминантный эпитоп; рMARV индуцировал четыре ограниченных Н-2<sup>b</sup> иммунодоминантных эпитопа CD8<sup>+</sup> внутри пептидов MGP<sub>25-39</sub> (№ 5), MGP<sub>67-81</sub> (№ 12), MGP<sub>181-195</sub> (№ 31) и MGP<sub>385-399</sub> (№ 65), и ограниченный Н-2<sup>d</sup> эпитоп CD4<sup>+</sup> в MGP<sub>151-171</sub> (№ 27). Четыре данных эпитопа возникали внутри высоко консервативных областей MARV GP1, в том числе три из которых были расположены внутри предполагаемого рецепторсвязывающего домена, тогда как только один возникал внутри вариабельной муциноподобной области (MGP<sub>385-399</sub> (№ 65)), как показано на фиг. 4B и фиг. 4C. Стимулированные рЕВОС эпитопы CD8<sup>+</sup> возникали в SUDV GP (SGP)<sub>19-33</sub> (№ 4) и SGP<sub>241-255</sub> (№ 41) у мышей Н-2<sup>b</sup> и Н-2<sup>d</sup>, соответственно, оба в высоко консервативных областях GP1. Тем не менее, иммунизация рЕВОЗ выявила три иммунодоминантных эпитопа у мышей Н-2<sup>d</sup> (ограниченный CD8 эпитоп, расположенный в рецепторсвязывающем домене ZEBOV GP (GP)<sub>139-153</sub> (№ 24), и два ограниченных CD4 эпитопа ZGP<sub>175-189</sub> (№ 30) и ZGP<sub>391-405</sub> (№ 66)), возникающих внутри рецепторсвязывающего домена и муциноподобной области, соответственно. У мышей Н-2<sup>b</sup> был определен только один иммунодоминантный эпитоп, который содержал как эпитоп CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> (№ 89), и он возникал в высоко консервативной области GP2. В целом, разнообразные эпитопные иерархии были постоянными и воспроизводимыми в каждой вакцинированной группе. Кроме того, как показано на фиг. 4D, субдоминантный ответ составлял значительную долю общего ответа; общий субдоминантный ответ AVE, измеренный посредством модифицированного анализа ELISPOT, составлял примерно 12%, 62% и 74% у иммунизированных рMARV, рЕВОС и рЕВОЗ мышей Н-2<sup>b</sup>, соответственно, тогда как ответы у мышей Н-2<sup>d</sup> составляли 47%, 50% и 34%, соответственно.

В конце, общие GP-специфические Т-клеточные ответы измеряли посредством FACS с использованием стимуляции минимальными пептидными пулами, содержащими только подтвержденные содержащие эпитоп идентифицированные пептиды. Устойчивые ответы были обнаружены у каждого из вакцинированных животных и в большинстве случаев обеспечивались обоими типами активированных CD4+ и CD8+ Т-клеток. Ответы были GP-специфическими, поскольку с контрольным пептидом (h-Clip) наблюдалась незначительная выработка IFN $\gamma$ , и это хорошо соотносилось с данными ELISPOT. Единственный случай, когда иммунизация не индуцировала заметный CTL, как измерено посредством FACS, был у мышей H-2<sup>d</sup>, вакцинированных с помощью pMARV, у которых не было подтверждено обнаруженного посредством ELISPOT эпитопа, являющегося CD8-ограниченным. В общей сложности, эти данные демонстрируют, что каждая из плазмид вакцины была высоко иммуногенной у мышей и обеспечивала в результате устойчивые GP-специфические Т-клеточные ответы, распознающие отличающийся набор Т-клеточных эпитопов, в том числе иммунодоминантные эпитопы с высоко консервативными областями GP. Кроме того, сильно отличающийся субдоминантный Т-клеточный ответ, охарактеризованный в данном документе, в противном случае мог быть не выявлен с использованием традиционных пулов матричных наборов пептидов для идентификации эпитопа.

Т-клеточные ответы измеряли в отношении реакционной способности против минимальных пептидных пулов, содержащихся во всех позитивно идентифицированных пептидах для каждого соответствующего GP посредством FACS. На фиг. 7А показаны индуцированные ДНК-вакциной Т-клеточные ответы от показательного животного, и IFN $\gamma$ -продуцирующие клетки CD4+ (справа) и CD8+ (слева) собраны в гейт. Показаны графики FACS. Инкубация с помощью пептида h-CLIP выступала в качестве отрицательного контроля (Контроль). На фиг. 7В показаны результаты гейтированных клеток, на фиг. 7А результаты обобщены как средний % общих клеток CD44+/IFN $\gamma$ + CD4+ или CD8+, и столбики ошибок представляют SEM. Эксперименты повторяли по меньшей мере дважды

со сходными результатами.

#### **«Однодозовая» защита у мышей**

Эффективность вакцины против контрольного заражения ZEBOV далее оценивали в доклинической модели на мышах. Мышей вакцинировали только один раз в связи с наблюдаемыми данными о сильной индукции и защите NAb. Мышей (H-2<sup>k</sup>; n=10/группу) иммунизировали 40 мкг pEBOZ ДНК и защиту оценивали через 28 дней посредством контрольного заражения с помощью 1000 LD<sub>50</sub> адаптированного к мышам ZEBOV (mZEBOV) в отделении BSL4. В то время, как у всех контрольных животных развивалась инфекция до дня 7 после заражения, на фиг. 5A показано, что вакцинированные ДНК мыши были полностью защищены ( $P=0,0002$ ). Кроме того, как показано на фиг. 5B, контрольные мыши демонстрировали прогрессирующую потерю веса тела до наступления смерти ( $P < 0,0001$ ).

Для лучшего понимания механизмов индуцированной ДНК защиты в «однодозовой» модели, далее авторы настоящего изобретения оценивали образование NAb и Т-клеток. NAb оценивали через 25 дней после вакцинации, за 3 дня до контрольного заражения и, как показано на фиг. 5C, значимое повышение ( $P < 0,0001$ ) было обнаружено у всех вакцинированных животных (n=10/группу); обратные конечному разведению титры варьировали от 19 до 42,  $27,3 \pm 2,5$ .

Далее авторы настоящего изобретения оценивали образование ZGP-специфических Т-клеток и увеличили масштаб анализа для сравнения ответов у мышей, иммунизированных либо pEBOZ отдельно, либо в трехвалентном составе. Выработку IFN- $\gamma$  (n=5) оценивали через 11 дней посредством FACS с использованием всех пептидных пулов ZGP; данные показаны на фиг. 5D. Продуцирующие IFN $\gamma$  Т-клетки были обнаружены у всех животных, и они были специфическими для пептидов ZGP, поскольку стимуляция посредством контрольного пептида не индуцировала выработку цитокина. Иммунизация либо одновалентным, либо трехвалентным составом индуцировала устойчивые Т-клеточные ответы IFN $\gamma$  которые при сравнении значимо не отличались ( $P=0,0920$ ).

Поскольку CTL может быть важен для удаления инфицированных вирусом клеток (Warfield KL, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **175**: 1184-1191; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. *Virology* **6**: 132; Olinger GG, et al. (2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by Venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. *J Virol* **79**: 14189-14196; Sullivan NJ, et al. (2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med* **17**: 1128-1131; and Geisbert TW, et al. (2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. *J Virol* **84**: 10386-10394), измеряли выработку дополнительного эффекторного цитокина, TNF, а также фактора ограничения развития, T-бокс фактор транскрипции TBX21 (T-bet), которые, как известно, коррелируют с CTL иммунитетом Th1-типа, и цитотоксичность, результаты были следующими. Для всех клеток: TNF  $2,9 \pm 0,8$ , Tbet  $13,0 \pm 1,1$ . Для CD4+/CD44+/IFN $\gamma$ + клеток: TNF  $61,4 \pm 3,1$ , Tbet  $72,6 \pm 2,0$ . Для CD8+/CD44+/IFN $\gamma$ + клеток: TNF  $33,0 \pm 3,3$ , Tbet  $992,1 \pm 1,4$  (\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Было обнаружено, что ~61% и ~33% активированных CD4+ и CD8+ Т-клеток, соответственно, также продуцировали TNF помимо IFN $\gamma$ . Кроме того, основная часть продуцирующих IFN $\gamma$  Т-клеток экспрессировали высокие уровни T-bet; приблизительно 73% и 92% CD8+ и CD4+ Т-клеток, соответственно, были CD44+ и вырабатывали IFN $\gamma$  после пептидной стимуляции ZGP.

На фиг. 8А и 8В показано введение Т-клеток посредством «однодозовой» вакцинации. Т-клеточные ответы у мышей Н-2<sup>к</sup> после одной иммунизации рЕВОZ или одной трехвалентной вакцинации, состояли из трех плазмид вакцин в отдельных областях, как измерено посредством FACS, показаны (а) и обобщены (b) как AVE % общих клеток CD44+/IFN $\gamma$ + CD4+ (фиолетовый) или CD8+ (оранжевый). Псевдоцветные графики FACS получены от показательного животного,

и продуцирующие IFN $\gamma$  клетки CD4<sup>+</sup> (справа) и CD8<sup>+</sup> (слева) собраны в гейт. Инкубация с помощью пептида h-CLIP выступала в качестве отрицательного контроля (Контроль). Эксперименты осуществляли дважды со сходными результатами, столбики ошибок представляют SEM; ns, отсутствие значимости.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Авторы настоящего изобретения сообщают о разработке и оценке поливалентной вакцины против филовируса в доклинических исследованиях иммуногенности и эффективности на грызунах. Полная защита против контрольного заражения с помощью gpMARV и gpZEBOV наблюдалась после двух доз ДНК-вакцины у морских свинок, а также с «однодозовой» ДНК-вакциной у мышей против mZEBOV. До настоящего времени, генетическая вакцинация морских свинок включала либо инъектирование «голой» ДНК (Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**: 605-609), либо ДНК, доставленной посредством генетической пушки (Dowling W, et al. (2006). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* **81**: 1821-1837; Vanderzanden L, et al. (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **246**: 134-144; and Riemenschneider J, et al (2003). Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* **21**: 4071-4080), тем не менее, любой способ требовал по меньшей мере трех вакцинаций для достижения полной защиты. Улучшенная защита в данном случае может быть вызвана индукцией устойчивых Ab, поскольку одна вакцинация ДНК вызывала образование титров GP-специфических связывающих IgG, которые были сопоставимы по величине с титрами у защищенных животных после введения посредством генетической пушки; вакцинация ДНК индуцировала титры 3,85 и 2,18 log<sub>10</sub> ZGP и MGP-специфических Ab, соответственно, после одного введения в сравнении с титрами 2,7 и 3,0 после трех вакцинаций посредством генетической пушки. Для

сравнения с альтернативной «однодозовой» защитной стратегией у морских свинок, Ag-связанная платформа на основе вирусоподобных частиц (VLP) вызывала образование титров Ab, которые только незначительно превышали наблюдаемые после вакцинации ДНК vaccination (Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S (2005). Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* **23**: 3033-3042). Кроме того, подход с рекомбинантным аденовирусом (rAd) индуцировал титры ZGP-специфических NAb, которые были ниже титров при одной вакцинации ДНК (титр 53, обратный конечному разведению, в сравнении с титром 88 в данном случае) (Kobinger GP, et al. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* **346**: 394-401). Vaccination with rVSV (Jones SM, et al (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**: S404-412) вызывал образование титров ZGP-специфических Ab, которые были подобны титрам настоящей платформы. В общей сложности, эти данные демонстрируют, что вакцинация ДНК была способна индуцировать связывающие и нейтрализующие Ab, которые были сопоставимы с нереплицирующими вирусными платформами, и что эти данные могут частично облегчить объяснение значительной выживаемости морских свинок в данном случае.

Образование NAb посредством защитной вакцинации ДНК могло бы оказывать благоприятное воздействие посредством экспрессированных трансгеном зрелых структур GP. Исследования трансфекции *in vitro* подтверждали, что кодированные вакциной GP были высоко экспрессируемы, отщепленными после трансляции (фиг. 1B), транспортированными к поверхности клетки, и они пространственно препятствовали иммунологическому определению молекул клеточной поверхности (фиг. 1C). Следовательно, весьма вероятно, что иммуногены вакцины, образованные в данном случае, вызревали до гетеро-тримерных шипов, в противном случае они бы были функциональными при сборке вириона во время инфекции. Это может быть важно для генерации и отображения вирусологически

значимых нейтрализующих детерминант, которые впоследствии могли бы иметь решающее значение для индукции конформационно-зависимых Nab (Dowling W, et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* **81**: 1821-1837; Shedlock DJ, Bailey MA, Popernack PM, Cunningham JM, Burton DR, Sullivan NJ (2010). Antibody-mediated neutralization of Ebola virus can occur by two distinct mechanisms. *Virology* **401**: 228-235). Таким образом, в этом отношении экспрессия нативных закрепленных структур может превосходить растворимые производные в способности генерировать NAb (Sullivan NJ, et al. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* **3**: e177; Xu L, et al. (1998). Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* **4**: 37-42).

Для получения лучшей характеристики Т-клеточных ответов, вызванных защитной вакциной, авторами были проведены исследования иммуногенности и эффективности на мышах и определена «однодозовая» полная защита от mZEBOV с помощью вакцинации ДНК (фиг. 5А-5D). На сегодняшний день наиболее эффективными платформами, обеспечивающими полную защиту в этой модели, являются VLP, либо с адъювантом (Warfield KL, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **175**: 1184-1191; Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Kalina WV, Aman MJ, Bavari S (2007). Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**: S430-437), либо без адъюванта (Sun Y, et al. (2009). Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology* **383**: 12-21), вакцинация rAd ((Kobinger GP, et al. (2006) ВЫШЕ; Choi JH, et al. (2012). A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs. *Mol Pharm* **9**: 156-167; Richardson JS, et al. (2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One*

4: e5308), или вакцинация rRABV (Blaney JE, et al. (2011). Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol* **85**: 10605-10616). Тем не менее, определение характеристик Т-клеточных ответов было сильно ограничено в данных исследованиях и было ограничено стимуляцией спленоцитов либо двумя (Warfield KL, (2007), ВЫШЕ), либо одним (Warfield KL, et al. (2005) ВЫШЕ) пептидом, описанными ранее, как содержащие ZGP Т-клеточные эпитопы (Warfield KL, et al. (2005) ВЫШЕ. Olinger GG, et al. (2005) ВЫШЕ; Kobinger GP, et al. (2006), ВЫШЕ; Sun Y, et al. (2009). Choi, JH, et al. (2012). В данном случае, авторы настоящего изобретения сообщают об индукции устойчивых СТЛ с широким спектром с помощью защитной вакцинации, которая тщательно анализируется с помощью нового модифицированного анализа Т-клеток (фиг. 4А и таблицы 1-6). В целом, были идентифицированы 52 новых Т-клеточных эпитопа, включая многочисленные иммунодоминантные эпитопы, встречающиеся в основном в высоко консервативных областях GP. Из общего количества 22 идентифицированных эпитопов ZGP только о 4 сообщалось ранее. Более того, только один из 20 MGP (Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. *Virology* **6**: 132) и один из 16 эпитопов SGP были описаны ранее. Таким образом, это наиболее полный отчет о доклинических эпитопах GP на сегодняшний день, описывающий GP эпитопы из нескольких филовирюсов в двух разных фоновых генотипах мышей.

Еще одним новым результатом, полученным в результате этих анализов, была оценка индуцированных вакцинами субдоминантных Т-клеточных ответов, которые, как показано в данном документе, составляли значительный процент от общего Т-клеточного ответа, варьируя в широких пределах от 12% до 74% (фиг. 4D). Это может быть особенно важно, поскольку субдоминантные ответы могут значительно способствовать защите. Таким образом, в будущем может оказаться полезным определить специфический вклад субдоминантных и иммунодоминантных эпитопических Т-клеточных ответов в защиту. Примечательно, что в противном случае эти

ответы могли быть упущены при использовании традиционных пулов матричных наборов пептидов для идентификации эпитопов. Таким образом, ограниченное обнаружение эпитопов в предыдущих исследованиях могло быть напрямую связано с более низкими уровнями иммунитета, индуцированного вакциной, использованием менее чувствительных стандартных анализов и/или использованием пептидных схем и/или алгоритмов, способствующих обнаружению иммунодоминантных эпитопов CD8<sup>+</sup>.

Несмотря на то, что иммунные взаимосвязи защиты от филловирuсов остаются противоречивыми, полученные с помощью этого высокоиммуногенного подхода данные предоставляют уникальную возможность для изучения Т-клеточного иммунитета, направляемого защитной вакциной. ДНК-вакцинация в данном случае индуцировала сильные ZGP-специфические Т-клетки, большая часть которых характеризовалась многофункциональным CTL типа Th1, экспрессирующим высокие уровни T-bet, также показано, что она коррелирует с цитотоксичностью Т-клеток у людей. Ясно, что предыдущие автономные платформы ДНК-вакцинации, способные генерировать в основном гуморальные иммунные ответы и клеточный иммунитет, смещенные на CD4<sup>+</sup> Т-клетки, могут, вероятно, иметь преимущество от доставки ЭП *in vivo*, которая, как было недавно продемонстрировано, индуцирует активные CD8<sup>+</sup> Т-клетки у NHP и в клинических исследованиях. Таким образом, приведенные в данном документе данные согласуются с этим подходом в качестве самостоятельного стимула или способа иммунизации в режиме прайм-буст первичного в исследованиях иммуногенности и эффективности на NHP. Этот подход предлагает привлекательную стратегию вакцинации, которая может быть быстро и недорого изменена и/или произведена для быстрого реагирования в ситуациях, связанных с ситуациями биологической угрозы и вспышками *Filoviridae*. Кроме того, данный модельный подход обеспечивает важный инструмент для изучения защитных иммунных корреляций против филловирuсного заболевания и может применяться в отношении существующих платформ для управления будущими стратегиями.

## **Пример 2**

Представлена трехвалентная вакцина, которая содержит три

плазмиды. Первая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Zaire ebolavirus*, который основан на ZEBOV CON, SEQ ID NO:1, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Zaire ebolavirus*. Вторая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Sudan ebolavirus*, который основан на SUDV CON, SEQ ID NO:2, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Sudan ebolavirus*. Третья плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген *Marburg marburgvirus* Angola (иммуноген MARV, который основан на MARV ANG, SEQ ID NO:3, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце иммуногена *Marburg marburgvirus* Angola).

### Пример 3

Представлено пять вакцин на основе плазмид. Первая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Zaire ebolavirus*, который представляет собой ZEBOV CON, SEQ ID NO:1. Вторая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Sudan ebolavirus*, который представляет собой SUDV CON, SEQ ID NO:2. Третья плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:4, кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Ravn (MARV-RAV CON) с использованием *Marburg marburgvirus* Ravn, Durba (09DRC99) и Uganda (02Uga07Y). Четвертая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:5, кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Ozolin (MARV-OZO CON) с использованием Ozolin, Uganda (01Uga07), и Durba (05 и 07DRC99). Пятая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:6, кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Musoke (MARV-MUS CON) с использованием (Musoke, Popp, и Leiden).

### Пример 4

Представлено пять вакцин на основе плазмид. Первая плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует

консенсусный иммуноген *Zaire ebolavirus*, который основан на ZEBOV CON, SEQ ID NO:1, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Zaire ebolavirus*. Вторая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Sudan ebolavirus*, который основан на SUDV CON, SEQ ID NO:2, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Sudan ebolavirus*. Третья плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Rav на основе SEQ ID NO:4, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Ravn (MARV-RAV CON) с использованием *Marburg marburgvirus* Ravn, Durba (09DRC99) и Uganda (02Uga07Y), и модифицированного для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Rav. Четвертая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Ozo на основе SEQ ID NO:5, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Ozolin (MARV-OZO CON) с использованием Ozolin, Uganda (01Uga07) и Durba (05 и 07DRC99), и модифицирован для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Ozo. Пятая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Mus на основе SEQ ID NO:6, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Musoke (MARV-MUS CON) с использованием (Musoke, Popp, и Leiden), и модифицированного для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Mus.

#### **Пример 5**

Представлено шесть вакцин на основе плазмид. Первая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Zaire ebolavirus*, который представляет собой ZEBOV CON, SEQ ID NO:1. Вторая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Sudan ebolavirus*, который представляет собой SUDV CON, SEQ ID NO:2. Третья плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:4,

кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Ravn (MARV-RAV CON) с использованием *Marburg marburgvirus* Ravn, Durba (09DRC99) и Uganda (02Uga07Y). Четвертая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:5, кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Ozolin (MARV-OZO CON) с использованием Ozolin, Uganda (01Uga07), и Durba (05 и 07DRC99). Пятая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:6, кластерный консенсус *Marburg marburgvirus*-Musoke (MARV-MUS CON) с использованием (Musoke, Popp, и Leiden). Шестая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO:3, выделенный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года.

#### **Пример 6**

Представлено пять вакцин на основе плазмид. Первая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Zaire ebolavirus*, который основан на ZEBOV CON, SEQ ID NO:1, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Zaire ebolavirus*. Вторая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген *Sudan ebolavirus*, который основан на SUDV CON, SEQ ID NO:2, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Sudan ebolavirus*. Третья плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Rav на основе SEQ ID NO:4, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Ravn (MARV-RAV CON) с использованием *Marburg marburgvirus* Ravn, Durba (09DRC99) и Uganda (02Uga07Y), и модифицированного для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Rav. Четвертая плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Ozo на основе SEQ ID NO:5, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Ozolin (MARV-OZO CON) с использованием Ozolin, Uganda (01Uga07) и Durba (05 и 07DRC99), и модифицированного для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Ozo.

Пятая плаزمида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсус *Marburg marburgvirus* Mus на основе SEQ ID NO:6, кластерного консенсуса *Marburg marburgvirus*-Musoke (MARV-MUS CON) с использованием (Musoke, Popp и Leiden), и модифицированного для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце консенсусного иммуногена *Marburg marburgvirus*-Mus. Третья плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует выделенный гликопротеиновый иммуноген *Marburg marburgvirus* Анголы 2005 года, который основан на MARV ANG, SEQ ID NO:3, модифицированном для включения в него сигнального пептида IgE на N-конце иммуногена *Marburg marburgvirus* Angola.

### Пример 7

В данном документе описан состав ДНК-вакцины, экспрессирующей 3 синтетических гликопротеина вируса Эбола Заир (EBOV) (GP): 2 сконструированы на основе выравнивания последовательностей GP (1976-2014), а 3-я конструкция соответствует штамму вспышки 2014 года. Плазмиды IL-12 (pIL-12) также была включена в качестве адъюванта для дополнительного усиления клеточного иммунного ответа. Мультивалентный состав ДНК-вакцины GP вводили макакам в соответствии с режимом иммунизации ДНК-ДНК «прайм-буст». Макаки (n=3 или 4 на группу) получали поливалентный состав GP ДНК+pIL-12 посредством внутримышечной доставки с последующей электропорацией. Различия в иммуногенности были проанализированы, и наблюдали защиту между различными дозами, режимами (2, 3, 4 и 5 инъекций), а также различные интервалы между последовательными дозами. Как антитело, так и Т-клеточные ответы наблюдались у 83% животных через 2 недели после первой инъекции и у 100% животных после 2-й инъекции. Макаки заражали смертельной дозой штамма вспышки EBOV Guinea-Makona (1000 БОЕ, вирус 7-U) и контролировали в течение 28 дней после заражения. 100% животных, получавших по меньшей мере 3 инъекции с 4-недельными интервалами, пережили смертельное заражение. Животные были полностью защищены от признаков заболевания и не имели повышенных показателей химического анализа крови. Интересно, что 50% животных, получавших 2 инъекции, пережили смертельное заражение. Выжившие животные

проявляли минимальные признаки заболевания, что позволяет предположить, что при дальнейшей оптимизации возможно достичь полной защиты с помощью 2 инъекций. В дополнительных исследованиях по оптимизации на мышах было установлено, что однократные инъекции являются 100% защитными и вызывают длительные иммунные ответы через 8 месяцев после вакцинации.

## **СПОСОБЫ**

### **Разработка состава ДНК-вакцины EBOV GP**

Вакцины, которые в настоящее время находятся на клинических испытаниях, включают rVSVΔG/ZEBOVGP, ChAd3 prime+MVA boost и MVA pan-filovirus. Хотя эти вакцины являются иммуногенными, защитными для приматов кроме человека (NHP) и обеспечивают защиту с однократной дозой, они развивают антивекторный иммунитет, имеют неопределенную продолжительность вторичного иммунитета, дают неблагоприятные реакции в клинических испытаниях на людях и могут не подходить для всех популяций. Таким образом, дополнительная платформа с более четким профилем безопасности, которая может вызывать сильные иммунные ответы против гетерологичных вирусов Эбола Заир, была бы очень полезной (фиг. 9).

Были сконструированы три конструкции ДНК EBOV: консенсусная последовательность ZEBOV (1976-1996) (ConEBOVGP № 1), ZEBOV (2002-2008) (ConEBOVGP № 2), и подобранная последовательность ZEBOV из вспышки в Гвинее 2014 года. (Guinea-GP). Было разработано пять вакцин, одновалентные вакцины, которые содержат только одну ДНК-конструкцию, двухвалентный состав вакцины, который содержит любой ConEBOVGP № 1 с Guinea-GP, и трехвалентный состав, который содержит все три из ConEBOVGP № 1, ConEBOVGP № 2 и Guinea-GP (фиг. 10).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Однократная иммунизация ДНК-вакциной является иммуногенной для мышей**

Мыши BALB/c получали однократную внутримышечную (ВМ) иммунизацию с последующей электропорацией (ЭП) составом вакцины. В день 28 определяли общий титр антител IgG и ELISPOT-IFN $\gamma$ .

Каждый состав вакцины вызывал устойчивый ответ IgG. Полифункциональные CD4+ и CD8+ Т-клетки, секретирующие IFN $\gamma$ , IL2 и TNF $\alpha$ , были одинаковыми для всех вакцин и составов. (Фигура 11).

**Одна иммунизация полностью защищает мышей от смертельного контрольного заражения адаптированным к мышам вирусом Эбола**

Мышей BALB/c, иммунизированных составами двухвалентных или трехвалентных вакцин, смертельно заражали 1000 LD50 гетерологичного Эболавируса. Штаммом для заражения был адаптированный к мышам вирус Ebola Mayinga 1976. Мыши, вакцинированные контрольной плазмидой pVax1, быстро теряли вес и не выживали дольше 7 дней. Тем не менее, обе мыши, вакцинированные двухвалентными составами вакцины, и мыши, вакцинированные трехвалентными составами вакцины, сохраняли свой вес, и мыши не погибали до дня 20 (фиг. 12).

**Отдельные конструкции GP ДНК-вакцин вызывают устойчивые вторичные иммунные ответы.**

Мыши BALB/c получали 3xBM по 40 мкг иммунизации моновалентной вакциной с последующей электропорацией в дни 0, 28 и 84. Измеряли титр антител IgG, IFN $\gamma$ , Т-клетки CD4+ CD44+ памяти и Т-клетки CD8+ CD44+ памяти. Устойчивые иммунные ответы были обнаружены через несколько месяцев после последней инъекции (фиг. 13).

**Составы GP ДНК-вакцин являются иммуногенными для NHP**

Макак *Сynomolgus* применяли в качестве NHP, так как они являются моделью эффективности вакцин против Эболы и смертельного контрольного заражения. Макакам вводили В.М. либо двухвалентную композицию с адъювантом Rhesus pIL12, либо трехвалентную композицию с адъювантом Rhesus-pIL12 с последующей ЭП. Различные схемы введения для понимания развития иммуногенности. Группа 1 получала 2 инъекции ВМ-ЭП двухвалентного состава с интервалом 4 недели. Группа 2 получала 2 инъекции ВМ-ЭП трехвалентного состава с интервалом 4 недели. Группа 3 получала 3 инъекции ВМ-ЭП трехвалентного состава. Образцы для исследований иммуногенности отбирали ежемесячно и в

течение одного дополнительного месяца после последней дозы. (Фиг. 6). Каждый состав ДНК-вакцины индуцировал устойчивые ответы антител против вируса GP Эбола ( $\text{GMT} > 10^3$ ) и ответы Т-клеток против GP. Иммунные ответы усиливались после каждой инъекции (фиг. 14).

#### **Вакцины с составами GP ДНК защищают от смертельного заражения вируса Эбола Заир (Макона)**

Макак *Cynomolgus* из групп 1, 2 и 3 заражали 1000 TCID<sub>50</sub> Guinea-Makona 2014 вируса C07 (эталонный штамм 7-U) через 28 дней после финальной иммунизации ДНК. Животных наблюдали в течение 28 дней после заражения. Хотя ни одно из контрольных животных не выжило после 10-го дня после заражения, 4/4 животных группы 3 выжили через 28 дней после заражения, 4/8 животных группы 2 выжили через 28 дней после заражения и 3/4 животных группы 1 выжили через 28 дней после заражения (фиг. 15). Выжившие животные не имели каких-либо существенных признаков заболевания. Они также поддерживали нормальный уровень СВС и уровень ферментов. Двухвалентные и трехвалентные ДНК-вакцины, доставленные ВМ-ЭП, вызывают долговременные ответы антител и Т-клеточные ответы, которые были обнаружены через >3 месяцев после финальной инъекции ДНК (фиг. 43).

Три дозы трехвалентной ДНК-вакцины EBOV GP обеспечивают 100% защиту от летального заражения EBOV. Две дозы двухвалентной ДНК-вакцины EBOV GP обеспечивают 75% защиту. В целом, данные подтверждают необходимость дальнейшего изучения ДНК-вакцин, поставляемых ВМ-ЭП, для возможного введения против вируса Эбола и других инфекционных патогенов.

#### **Клиническое исследование EBOV-001 фазы I**

Было проведено открытое исследование INO-4212 (с INO-9012 или без него). INO-4212 вводили здоровым добровольцам ВМ или ВК после электропорации. Контролировали безопасность и иммунологические оценки. Сравнивали внутридермальную доставку и внутримышечную доставку. Всего было 69 субъектов. Анализ ELISA проводили до иммунизации (начальный уровень) и через 2, 6 и 14 недели. Серопозитивность определяли как положительный ответ антител IgG на гликопротеин вируса Эбола Заир.

INO-4201 представляет собой ДНК-вакцину, составленную с консенсусным оболочечным гликопротеином Zaire Ebolavirus (ConEBOVGP № 1), образованным с использованием последовательностей оболочечных гликопротеинов штаммов вспышек 1976, 1994, 1995, 1996, 2003, 2005, 2007 и 2008 года, управляемым человеческим промотором CMV (промотором hCMV) с 3'-концевым сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH polyA). рGX4201 получали путем клонирования гена синтетического консенсусного оболочечного гликопротеина Zaire Ebolavirus в рGX0001 по сайтах BamHI и XhoI.

Последовательность ConEBOVGP № 1 (ConGP1) была сконструирована путем создания консенсусной оболочечной гликопротеиновой последовательности Zaire Ebolavirus с использованием оболочечных гликопротеиновых последовательностей штаммов вспышек 1976, 1994, 1995, 1996, 2003, 2005, 2007 и 2008 годов. Вкратце, консенсусная последовательность GP впервые была создана на основе шести последовательностей оболочки штаммов вспышек 1976, 1994, 1995, 1996, 2003 и 2005 годов. Затем три неконсенсусных остатка в позициях 377, 430 и 440 были взвешены по отношению к штаммам 2003, 2005, 2007 и 2008 годов, поскольку они были самыми последними и смертельными вспышками по опубликованным данным о последовательностях. Номера доступа GenBank для выбранных последовательностей GP штаммов вспышек являются следующими: Q05320, P87671, AAC57989, AЕК25495, АВW34743, P87666, AER59718, AER59712, АВW34742, AAL25818. После получения консенсусной последовательности GP1, к N-концу была добавлена вышестоящая последовательность Kozak. Дополнительно с целью получения более высокого уровня экспрессии, использование кодонов данного гена было адаптировано к смещению кодонов генов Homo sapiens. Кроме того, была также проведена оптимизация РНК: избегали областей с очень высоким (>80%) или очень низким (<30%) содержанием GC и мотивами цис-действующей последовательности, такими как внутренние боксы ТАТА, chi-сайты и рибосомные сайты входа. Синтезированный ConGP1 расщепляли с помощью BamHI и XhoI и клонировали в вектор экспрессии.

INO-4202 представляет собой ДНК-вакцину, в состав которой входит плазида ДНК, экспрессирующая оболочечный гликопротеин Zaire Ebolavirus, выделенный при вспышке в 2014 году в Гвинее (GuineaGP), управляемый промотором CMV человека (промотор hCMV) с 3'-концевым сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH polyA).

INO-4212 представляет собой двухвалентную вакцину INO-4201 и INO-4202.

На фиг. 17 изображена схема получения состава вакцины, способ введения и доза для каждой когорты. После первой инъекции 15% или менее пациентов были серопозитивными. После второй инъекции 50-100% пациентов были серопозитивными. После третьей инъекции 79-100% пациентов были серопозитивными (фиг. 18). Два показательных пациента с умеренным ELISpot IFN $\gamma$  или высоким ELISpot IFN $\gamma$  показали специфические Т-клеточные ответы (фиг. 19).

В то время как другие платформы для вакцин против Эболы, включая NIAID VRC/GSK и rVSV/ZEBOVGP, в настоящее время находятся на клинических испытаниях, представленные в данном документе двухвалентные и трехвалентные вакцины имеют преимущества, которые не наблюдаются на других платформах для вакцин. Например, двух- или трехвалентные вакцины можно вводить ВМ или ВК, тогда как другие вакцинные платформы вводят только ВМ. Важно отметить, что NIAID VRC/GSK и rVSV/ZEBOVGP демонстрируют побочные эффекты, в том числе лихорадку, усталость, артралгию и лимфопению, в то время как двух- и трехвалентные вакцины не демонстрируют никаких побочных эффектов. Однако следует отметить, что некоторые из побочных эффектов rVSV/ZEBOVGP и ChAd3/MVAGP частично совпадают с симптомами вируса Эболы. Другие двух- и трехвалентные вакцины дают титры антител на от один-два порядка больше, чем rVSV/ZEBOVGP и ChAd3/MVAGP (фиг. 20).

Субъектам (n=15) было назначено введение INO-4201 в дозе 2 мг ДНК/дозу в виде двух отдельных ВК инъекций (Манту) по 1 мг (0,1 мл) с последующей ЭП с помощью устройства CELLECTRA®-3P. Субъекты получали серию из 3 доз с иммунизациями через 0, 4

недели и 12 недель (схема 0-4-12 недель). Антитела, специфичные к гликопротеину (GP) EBOV, измеряли в сыворотках вакцинированных субъектов с помощью связывающего ELISA. Обратные конечному разведению титры выше дня 0 показаны через две недели после каждой иммунизации (фиг. 22). 100% субъектов, вакцинированных INO-4201 были сероконвертированными после 2 иммунизаций (фиг. 22, когорта 3 и фиг. 24).

### **Пример 8**

В данном документе описаны данные иммунного ответа для трех конструкций ДНК EBOV, описанных в Примере 7: консенсусная последовательность ZEBOV (1976-1996) (ConEBOVGP № 1 или INO-4201), ZEBOV (2002-2008) (ConEBOVGP № 2) и соответствующая последовательность ZEBOV из вспышки в Гвинее в 2014 году. (Guinea-GP). Было разработано пять вакцин, одновалентные вакцины, которые содержат только одну ДНК-конструкцию, двухвалентный состав вакцины, который содержит либо ConEBOVGP № 1 с Guinea-GP, и трехвалентный состав, который содержит все три из ConEBOVGP № 1, ConEBOVGP № 2 и Guinea-GP. В анализ иммунного ответа с помощью ELISA были включены 69 субъектов из групп 1-5 и 75 субъектов из групп 1-5 были включены в анализ иммунного ответа с помощью ELISpot (фиг.21, 25).

### **Титры ELISA по когорте и моменту времени**

Титры против EBOVR определяли для каждой когорты на 2, 6 и 14 неделе. К 6-й неделе в каждой группе наблюдалось увеличение титра антител выше 0-го дня (фиг. 22-23). Реактивность первой дозы в каждой группе была незначительной или отсутствовала. Доза 2 начинает приводить к сероконверсии, причем в когортах 3 и 5 наблюдается наибольшая частота. Доза три обеспечивает более 90% сероконверсии в когортах 4/5. Когорты 3 и 5 показывают 100% сероконверсию в этот момент времени (фиг. 24).

### **Ответы субъектов по пептидному пулу**

Ответы в когортах анализировали с помощью пептидного пула (фиг. 26-33). Для анализа резко отличающихся значений ELISpot значения дня 0 для каждого пула и суммарные ответы EBOV применяли для создания порога выброса (средние значения дня 0+(3x STDEV значений дня 0)). Этот порог должен охватывать 99%

нормально распределенной популяции. Любого субъекта, показавшего базовые значения, превышающие пороговое значение для выброса, удаляли, и по остальным субъектам были сгенерированы критерии респондента.

### **Анализ ICS**

47 субъектов из всех когорт были включены в анализ, однако когорта 5 недостаточно представлена (фиг. 35). Анализ ICS осуществляли на начальном уровне и на неделе 14. Для стимуляции применяли один пул пептидов EBOV, состоящий из пулов 1-4. Анализ активности Т-клеток в форме продукции IFN $\gamma$  или TNF $\alpha$  из компартментов CD4 и CD8 позволяет предположить значимое повышение TNF $\alpha$  в компартментах как CD4, так и CD8, а также повышение TNF $\alpha$  и/или IFN $\gamma$  только в когорте 3 (связанный парный анализ по Вилкоксоу, двухсторонний)

### **Краткое изложение иммунологии**

100% пациентов из когорты 3 (BK) были сероконвертированными после 2 доз. 92% пациентов из когорты 5 (BM+IL12) были сероконвертированными после 2 доз и 100% после 3 доз. Другие когорты показали 67% в лучшем случае после 2 доз и достигали 93% после 3 доз.

При анализе всех пациентов: наилучшая частота ответов была у когорт 2 и 4 с 53% и 57%, соответственно. Когорта 3 показала 40% респондентов. Добавление IL-12 в когорту 5, по-видимому, не влияло на частоту ответов (47%). При анализе пациентов с 8 удаленными резко отличающимися значениями частоты ответов были когорты 2 и 4 с 84,6% и 76,9%, соответственно. Когорта 3 показала 64,3% респондентов. Добавление IL-12 в когорту 5, по-видимому, не влияло на частоту ответов (53,3%).

Как CD4, так и CD8 Т-клетки показали высокую экспрессию TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$  и/или IFN $\gamma$  в когорте 3 (статистически значимо для исходного уровня, критерий соответствия связанных пар Уилкоксона, 2-сторонний).

Иммунизация с помощью INO-4201 хорошо переносилась здоровыми добровольцами без каких-либо СНЯ 3 или 4 класса. INO-4201 устойчиво индуцировал специфические к GP Эбола антитела (GMT 46,968) и приводил к 100% -ной сероконверсии, измеренной с

помощью связывающего ELISA, после всего лишь двух доз INO-4201. Введение INO-4201 генерировало EBOV GP-специфические Т-клеточные ответы по оценке ELISpot на интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) (295,3 БОЕ на 10<sup>6</sup> РВМС) и значительное увеличение продукции IFN $\gamma$  или TNF $\alpha$  в компартментах как CD8<sup>+</sup> Т-клеток, так и CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Внутрикожное введение INO-4201 с использованием устройства Celectra хорошо переносится, а также иммуногенно, по оценке как гуморальными, так и клеточными EBOV GP-специфическими иммуноанализами. Данные результаты показывают, что INO-4201 является убедительным кандидатом для дальнейшей клинической разработки профилактической вакцины против лихорадки Эбола.

**Пример 9. Длительные гуморальные и клеточные иммунные ответы у макак *Synomolgus* после введения ДНК-вакцины против GP вируса Эбола (EBOV), доставляемой посредством внутримышечной электропорации**

В данном документе представлены новые ДНК-вакцины против вирусного заболевания Эбола (EVD), которые имеют чистый профиль безопасности и являются серологически независимыми, что допускает возможное повторное введение вектора. Были разработаны три новые синтетические ДНК-вакцины GP вируса Эбола Заир (EBOV) и двухвалентные или трехвалентные составы. Оба ДНК-вакцины EBOV-GP обладали высокой защитой (75-100%) от смертельного заражения C07 EBOV Makona у макак *Synomolgus*. Животных (n=4-5/группу) с различными режимами введения наблюдали для мониторинга долгосрочной иммуногенности после иммунизации ДНК. Все NHP были быстро сероконвертированы. NHP имеют устойчивые общие титры антител IgG и ответы Т-клеток на антиген GP EBOV, включая полифункциональные CD4 и CD8 Т-клетки, экспрессирующие IFN $\gamma$ , IL2 и TNF $\alpha$  и ответы в субпопуляциях клеток памяти (фиг. 47-59). Все вместе, данные обеспечивают надежное подтверждение, что доставка ДНК-вакцины EBOV-GP необходима для защиты и формирования устойчивых вторичных иммунных ответов.

Вакцины EBOV-GP ДНК вызывают длительный иммунный ответ и дают сильный ответ после бустерной иммунизации по прошествии 1 года (фиг. 49-50). Ответ на реакцию был удивительно высоким в

группе, получавшей одну инъекцию ВМ (фиг. 50).

### Пример 10

В данном документе представлены пептидные последовательности и нуклеотидные последовательности для пептидов.

#### ТАБЛИЦА 1

Вакцина на основе плазмиды pMARV

Последовательность GP MARV ANG

Пептид Номер	последовательности	SEQ ID NO:	Положение	ELISPOT H-2 AVE $\pm$ SEM			FACS Т-клет. огра нич.
				d			
3	IQGVKTLPILEIASN	7	13-27	d	62	34	4+
5	ASNIQPQNVDSVCSG	8	25-39	b	743	186	8+
12	SKRWAFRAGVPPKNV	9	67-81	b	694	204	4+
27	GKVFTEGNIAAMIVN	10	157-171	d	602	75	4+
28	GNIAAMIVNKTVHKM	11	163-177	b/d	126	28	8+
	GNIAAMIVNKTVHKM	12		d	30	10	4+
29	IVNKTVHKMIFSRQG	13	169-183	d	92	17	4+
30	HKMIFSRQGQGYRHM	14	175-189	d	31	10	4+
31	RQGQGYRHMNLTSTN	15	181-195	b	674	112	8+
32	RHMNLTSTNKYWTSS	16	187-201	b	44	16	8+
65	LPTENPTTAKSTNST	17	385-399	b/d	398/ 16	107 /2	4+
71	PNSTAQHLVYFRRKR	18	421-435	d	29	6	4+
72	HLVYFRRKRNILWRE	19	427-441	d	145	18	4+
89	GLSWIPFFGPGIEGL	20	529-543	b	26	8	4+
92	GLIKNQNNLVCRLRR	21	547-561	d	29	10	4+
93	NNLVCRLRRLANQTA	22	553-567	d	34	13	4+
97	TTEERTFSLINRHAI	23	577-591	b	46	18	8+
99	HAIDFLARWGGTCK	24	589-603	d	63	12	4+
101	TCKVLGPDCCIGIED	25	601-615	b	97	37	4+

«Эпитопсодержащие пептиды идентифицировали с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT ( $\geq 10$  БОЕ/ $10^6$  спленоцитов и  $\geq 80\%$  частота ответа), а затем подтверждали с помощью FACS (было получено  $\geq 3-5 \times 10^4$  клеток CD3+). Ответы для каждого были дополнительно охарактеризованы с помощью FACS (экспрессия CD4 и/или CD8 клетками CD3+/CD44+/IFN $\gamma$  +). Предположительные эпитопы CD8+ подчеркнуты (% ранга наилучшего консенсуса по IEDB) и упоминаются ранее описанные эпитопы. Отображены иммунодоминантные эпитопы (\*).

ТАБЛИЦА 2

Вакцина на основе плазмиды pEBOS

Последовательность GP SUDV CON

Пептид Номер	последовательности	SEQ ID No:	Положение	ELISPOT H-2 AVE $\pm$ SEM			FACS Т- клет. огра нич.
				b	310	139	
4	FFVWVILFQKAFSM	26	19-33	b	310	139	8+
15	RWGFRRSGVPPKVVS	27	85-99	b	108	59	4+
19	YNLEIKKPDGSECLP	28	109-123	b	55	25	4+
24	HKAQGTGPCPGDYAF	29	139-153	d	13	3	8+
27	GAFFLYDRLASTVIY	30	157-171	d	29	9	8+
30	NFAEGVIAFLILAKP	31	175-189	d	31	6	4+
36	SYATSYLEYEIEINF	32	211-225	b	60	16	4+
41	FVLLDRPHTPQFLFQ	33	241-255	d	338	55	8+
78	NITTAVKTVLPQEST	34	463-477	b/d	28/ 105	12/ 18	4+
82	TGILGSLGLRKRSR	35	487-501	d	82	14	4+
83	LGLRKRSRQVNTRA	36	493-507	d	69	12	4+
89	IAWIPYFGPGAEGY	37	529-543	b	123	40	8+/4+
97	TELRTYTILNRKAID	38	577-591	d	12	5	4+
101	CRILGPDCCIEPHDW	39	601-615	b	80	41	4+
105	QIIHDFIDNPLPNQD	40	625-639	b	28	23	4+
110	GIGITGIIIAIALL	41	655-669	b	27	19	8+

«Эпитопсодержащие пептиды идентифицировали с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT ( $\geq 10$  БОЕ/ $10^6$  спленоцитов и  $\geq 80\%$  частота ответа), а затем подтверждали с помощью FACS (было получено  $\geq 3-5 \times 10^4$  клеток CD3+). Ответы для каждого были дополнительно охарактеризованы с помощью FACS (экспрессия CD4 и/или CD8 клетками CD3+/CD44+/IFN $\gamma$  +). Предположительные эпитопы CD8+ подчеркнуты (% ранга наилучшего консенсуса по IEDB) и упоминаются ранее описанные эпитопы. Отображены иммунодоминантные эпитопы (\*).



									1		аллель
5	ASNIQPQNVDSVCSG	8	0,4								
12	SKRWAFRAGVPPKNV	9						0,8			
27	GKVFTEGNIAAMIVN	10						12,9			H-2d класс I
28	GNIAAMIVNKTVHKM	11	0,2						3,9		
	GNIAAMIVNKTVHKM	12	0,2						3,9		
29	IVNKTVHKMIFSRQG	13							17,2		
30	HKMIFSRQGQGYRHM	14									
31	RQGQGYRHMNLTSTN	15		0,1					23,9		
32	RHMNLTSTNKYWTSS	16									
65	LPTENPTTAKSTNST	17						24,0			
71	PNSTAQHLVYFRRKR	18								7,5	
72	HLVYFRRKRNILWRE	19				0,3				8,3	
89	GLSWIPFFGPGIEGL	20						7,0			
92	GLIKNQNNLVCRLRR	21									
93	NNLVCRLRRLANQTA	22							13,3		
97	TTEERTFSLINRHAI	23	0,1			0,4					
99	HAIDFLLARWGGTCK	24								21,8	
101	TCKVLGPDCCIGIED	25			0,4						

«Эпитопсодержащие пептиды идентифицировали с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT ( $\geq 10$  БОЕ/ $10^6$  спленоцитов и  $\geq 80\%$  частота ответа), а затем подтверждали с помощью FACS (было получено  $\geq 3-5 \times 10^4$  клеток CD3+). Ответы для каждого были дополнительно охарактеризованы с помощью FACS (экспрессия CD4 и/или CD8 клетками CD3+/CD44+/IFN $\gamma$  +). Предположительные эпитопы CD8+ подчеркнуты (% ранга наилучшего консенсуса по IEDB) и упоминаются ранее описанные эпитопы. Отображены иммунодоминантные эпитопы (\*).

ТАБЛИЦА 5

Вакцина на основе плазмиды pEBOS

Последовательность GP SUDV CON

% ранга наилучш. конс. (IEDB)

CD8+ ( $\leq 0,5$ )

CD4+ (&lt;25)

Пептид Номер	последовательно сти	SEQ ID NO:	Db	Kb	Dd	Kd	Ld	I- Ab	I- Ad	I- Ed	Ранее опреде ленные (80% Бласт; аллель  H-2b класс I
4	FFVWVILFQKAESM	26		0, 4							
15	RWGFRSGVPPKVVSYS	27						1, 2			
19	YNLEIKKPDGSECLP	28									
24	HKAQGTGPCPGDYAF	29					0, 3				
27	GAFFLYDRLASTVIY	30		0, 3				21 ,1		23 ,4	
30	NFAEGVIAFLILAKP	31			0, 1						
36	SYATSYLEYEIENF	32	0, 4		0, 3	0, 1					
41	FVLLDRPHTPQFLFQ	33					0, 1				
78	NITTAVKTVLPQEST	34							7,2		
82	TGILGSLGLRKRSRR	35								17 ,2	
83	LGLRKRSRRQVNTRA	36									
89	IAWIPYFGPGAEGIY	37			0, 1			3, 0			
97	TELRTYTILNRKAID	38	0, 1						18, 5	21 ,2	
101	CRILGPDCCIEPHDW	39									
105	QIIHDFIDNPLPNQD	40	0, 3								
110	GIGITGIIIAIALL	41									

«Эпитопсодержащие пептиды идентифицировали с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT ( $\geq 10$  БОЕ/ $10^6$  спленоцитов и  $\geq 80\%$  частота ответа), а затем подтверждали с помощью FACS (было получено  $\geq 3-5 \times 10^4$  клеток CD3+). Ответы для каждого были дополнительно охарактеризованы с помощью FACS (экспрессия CD4 и/или CD8 клетками CD3+/CD44+/IFN $\gamma$  +). Предположительные эпитопы CD8+ подчеркнуты (% ранга наилучшего консенсуса по IEDB) и упоминаются ранее описанные эпитопы. Отображены иммунодоминантные эпитопы (\*).

ТАБЛИЦА 6

Вакцина на основе плазмиды pEBOZ

Последовательность GP ZEBOV CON

% ранга наилучш. конс. (IEDB)

CD8+ ( $\leq 0,5$ )

CD4+ (&lt;25)

Пептид Номер	последовательно сти	SEQ ID NO:	Db	Kb	Dd	Kd	Ld	I- Ab	I- Ad	I- Ed	Ранее определ енные (80% Бласт; аллель
6	FSIPLGVIHNSTLQV	42					0, 2				
15	RWGFRSGVPPKVVNY	43						1, 2			
19	YNLEIKKPDGSECLP	44									
24	HKVSGTGPCAGDFAF	45					0, 1	14 ,9			
27	GAFFLYDRLASTVIY	46		0, 3				21 ,1		23, 4	H-2d класс I
30	TFAEGVVAFLILPQA	47			0, 2				21, 6		H-2d класс I
32	PQAKKDFSSHPLRE	48	0, 1	0, 4				16 ,4			H-2b класс I
33	FFSSHPLREPVNATE	49						14 ,7			H-2k класс I
40	EVDNLTIVQLESRFT	50				0, 4			19, 6		
41	YVQLESRFTPQFLQ	51									
48	TTIGEWAFWETKKNL	52								12, 9	
49	AFWETKKNLTKIRS	53								22, 9	
50	KNLTKIRSEELSFT	54							22, 7		
60	SQGREAAVSHLTTLA	55	0, 3					23 ,1	3,9		
65	DNSTHNTVPYKLDIS	56									
66	TPVYKLDISEATQVE	57						22 ,6	5,5		
71	PPATTAAGPPKAENT	58						2, 1			
84	TRREAIVNAQPKCNP	59	0, 3					14 ,6	7,9		
89	LAWIPYFGPAAEGIY	60			0, 1			0, 8			
97	TELRTFSILNRKAID	61	0, 1							22, 2	
101	CHILGPDCCEPHDW	62									

«Эпитопсодержащие пептиды идентифицировали с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT ( $\geq 10$  БОЕ/ $10^6$  спленоцитов и  $\geq 80\%$  частота ответа), а затем подтверждали с помощью FACS (было получено  $\geq 3-5 \times 10^4$  клеток CD3+). Ответы для каждого были дополнительно охарактеризованы с помощью FACS (экспрессия CD4 и/или CD8 клетками CD3+/CD44+/IFN $\gamma$  +). Предположительные эпитопы CD8+ подчеркнуты (% ранга наилучшего

консенсуса по IEDB) и упоминаются ранее описанные эпитопы. Отображены иммунодоминантные эпитопы (\*).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую консенсусный оболочечный гликопротеиновый иммуноген эболовируса Заир (ZEBOVCON), где ZEBOVCON содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:64, фрагмент SEQ ID NO:64, кодирующий по меньшей мере 600 последовательных аминокислот SEQ ID NO:1, или фрагмент SEQ ID NO:64, кодирующий по меньшей мере 600 последовательных аминокислот SEQ ID NO:1, функционально связанный с последовательностью, кодирующей лидерную последовательность IgE.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:64.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая фрагмент SEQ ID NO:1, содержит фрагмент SEQ ID NO:64, кодирующий фрагмент из по меньшей мере 600 последовательных аминокислот SEQ ID NO:1.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует фрагмент SEQ ID NO:1, кодирует по меньшей мере 630 аминокислот или по меньшей мере 660 аминокислот SEQ ID NO:1.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.4, где выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует фрагмент SEQ ID NO:1, содержит фрагмент SEQ ID NO:64, кодирующий фрагмент из по меньшей мере 630 аминокислот или по меньшей мере из 660 аминокислот SEQ ID NO:1.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где ZEBOVCON связан с сигнальным пептидом IgE.

7. Композиция для индукции иммунного ответа против вируса Эбола, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6.

8. Композиция по п.7, где композиция содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один из ZEBOVCON, и дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ZEBOVCON2, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую

ZEBOVGUI, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ZEBOVCON2, кодирует SEQ ID NO:68, и где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ZEBOVGUI, кодирует SEQ ID NO:67.

9. Композиция по п.8, где композиция содержит три молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие комбинацию ZEBOVCON, ZEBOVCON2 и ZEBOVGUI.

10. Композиция по п.7, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

11. Композиция по любому из пп.7-10, где композиция составлена для доставки индивидууму с помощью электропорации.

12. Композиция по любому из пп.7-11, дополнительно содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: IL-12, IL-15 и IL-28.

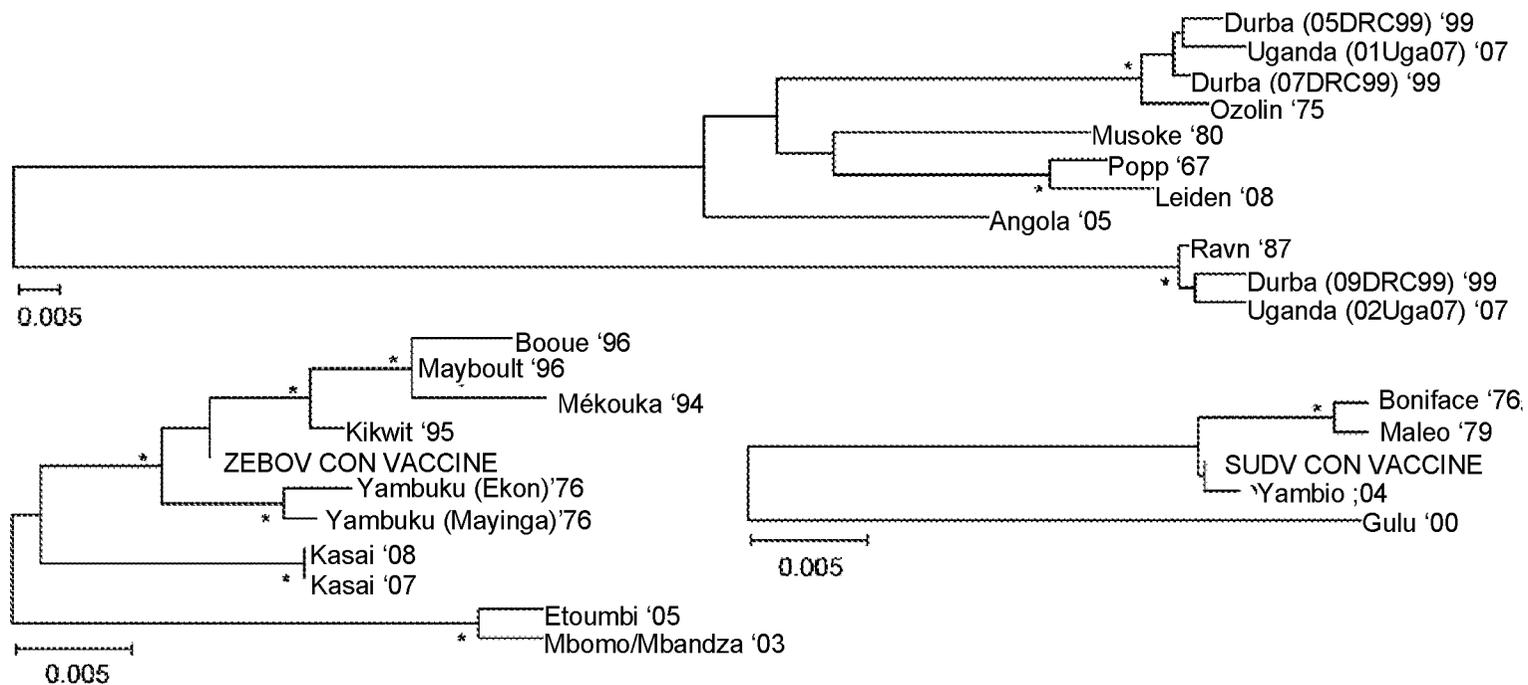
13. Применение композиции по любому из пп.7-12 в приготовлении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против вируса Эбола.

14. Применение композиции по любому из пп.7-12 в приготовлении лекарственного средства для лечения индивида, у которого диагностирован вирус Эбола.

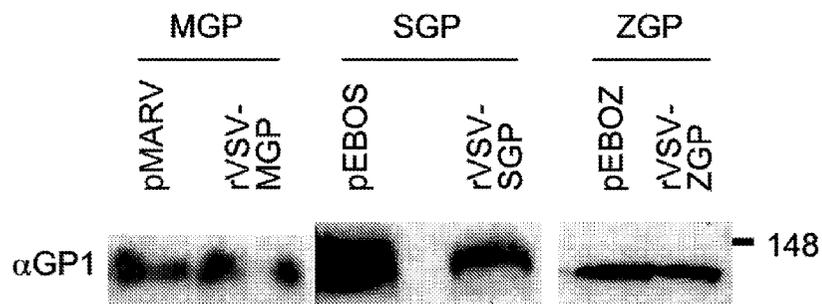
15. Применение композиции по любому из пп.7-12 в приготовлении лекарственного средства для профилактики инфекции вирусом Эбола у индивида.

По доверенности

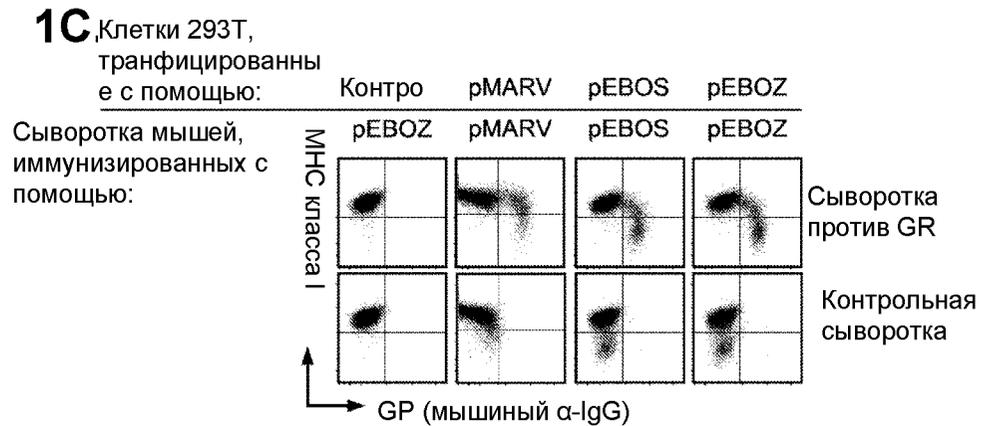
1A.



1B.

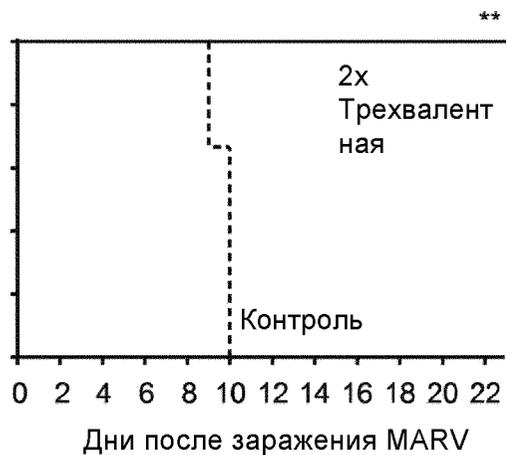


1C.

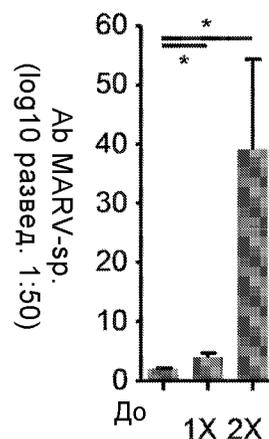
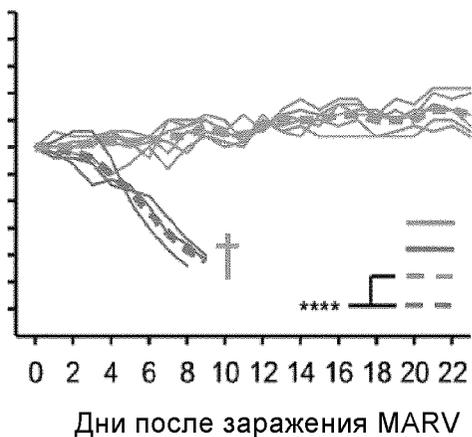


Фигура 1A-1C

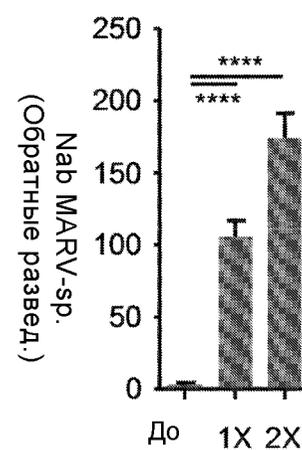
2A.



2B. 2C.



2D.



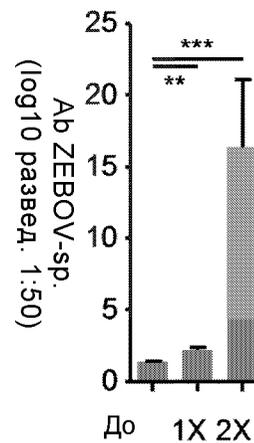
2E.



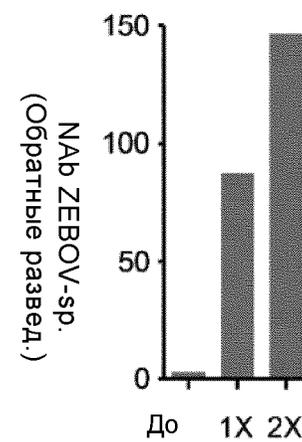
2F.



2G.

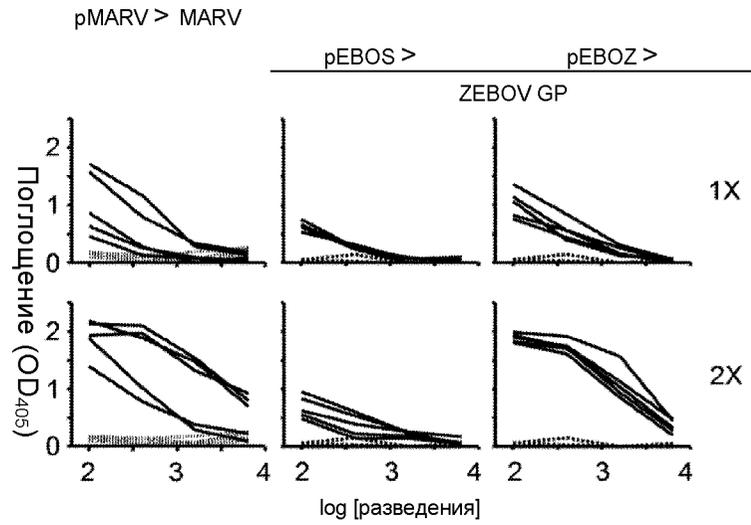


2H.

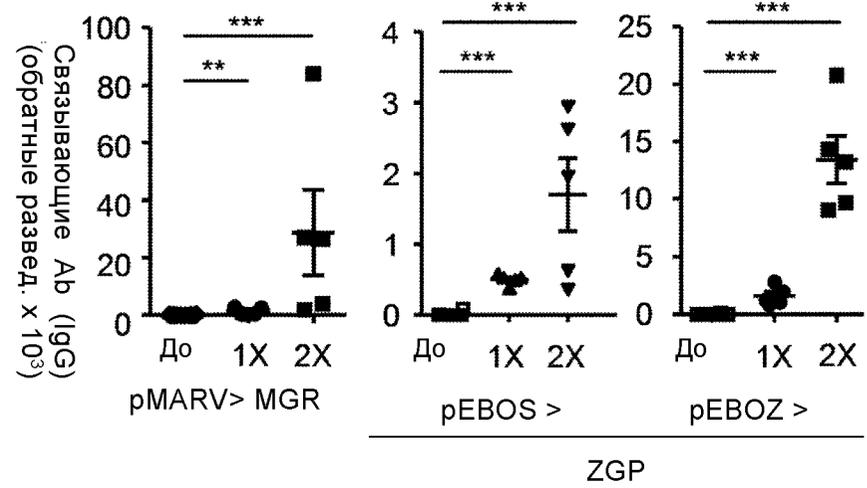


Фигура 2A-2H

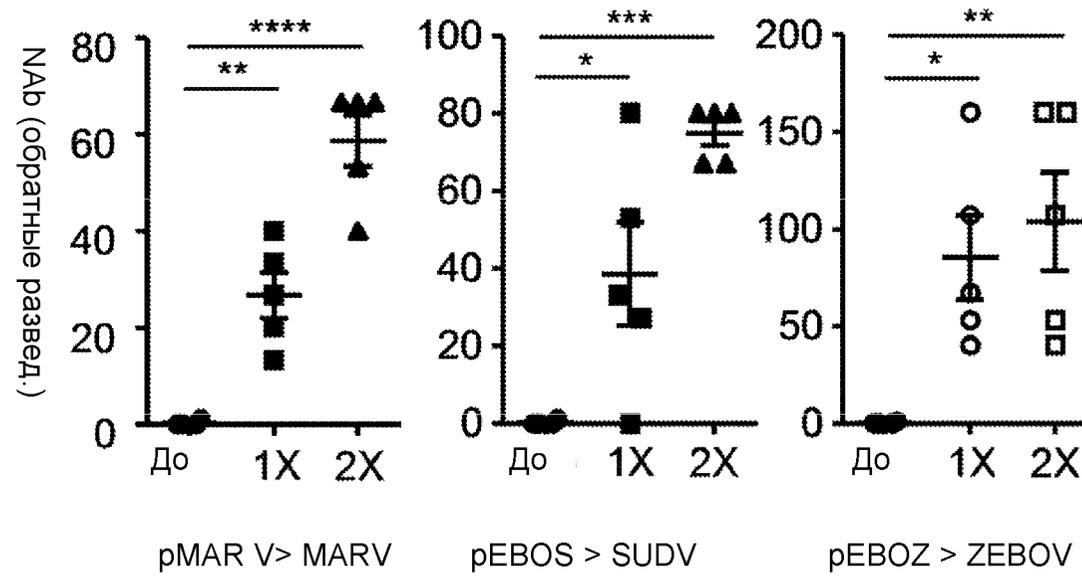
3A.



3B.

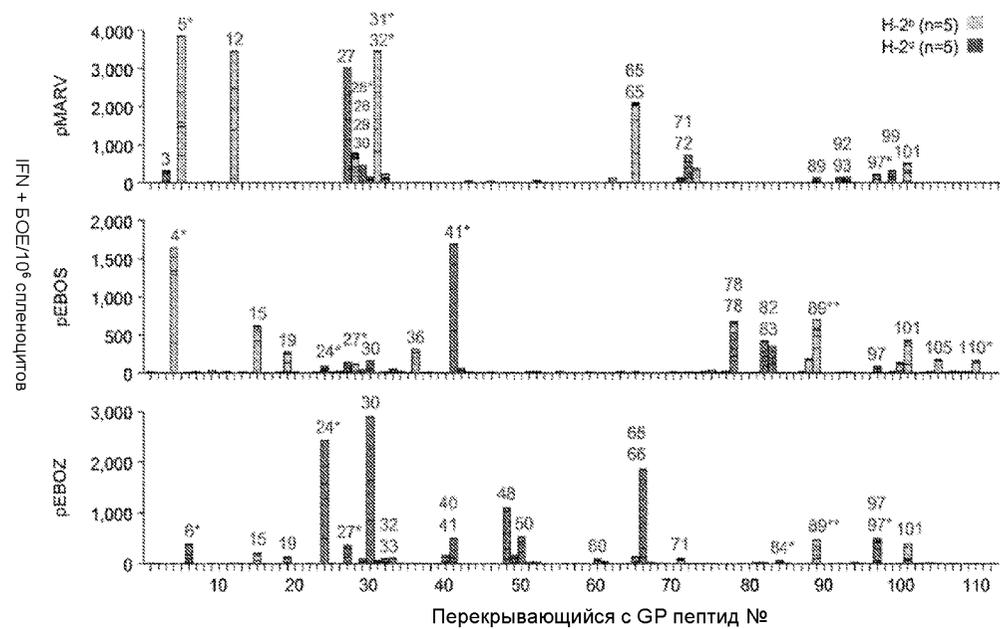


3C.

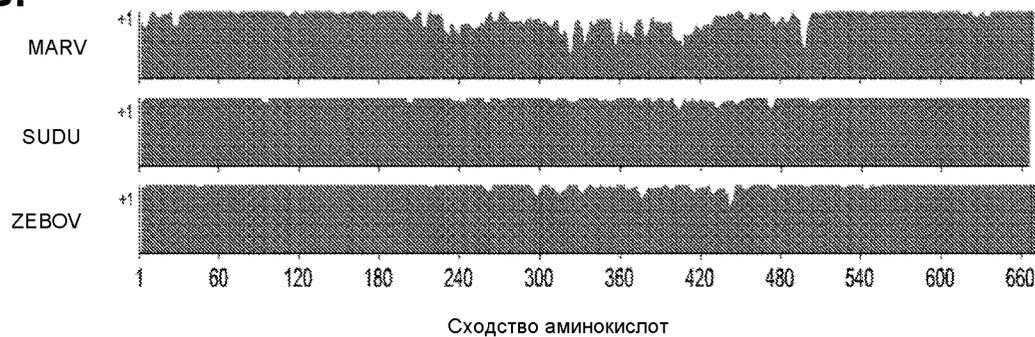


Фигура 3А-3С

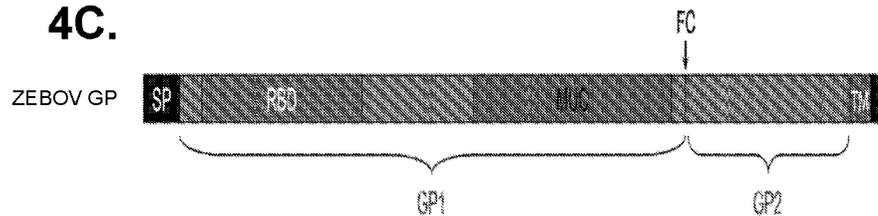
4A.



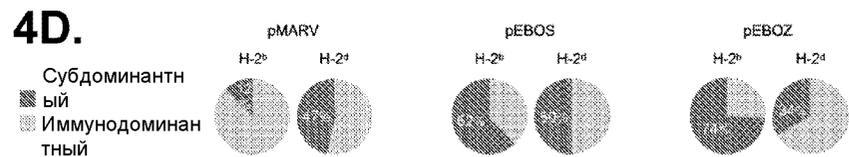
4B.



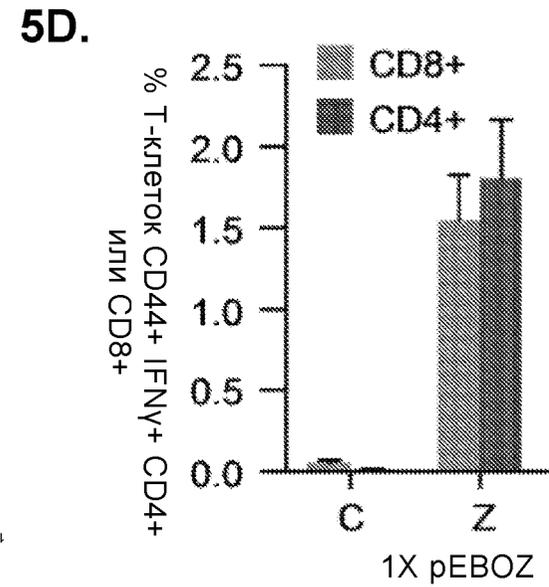
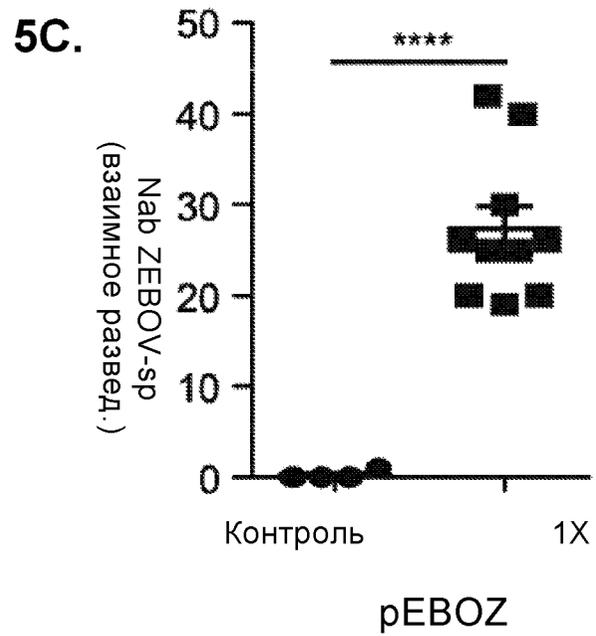
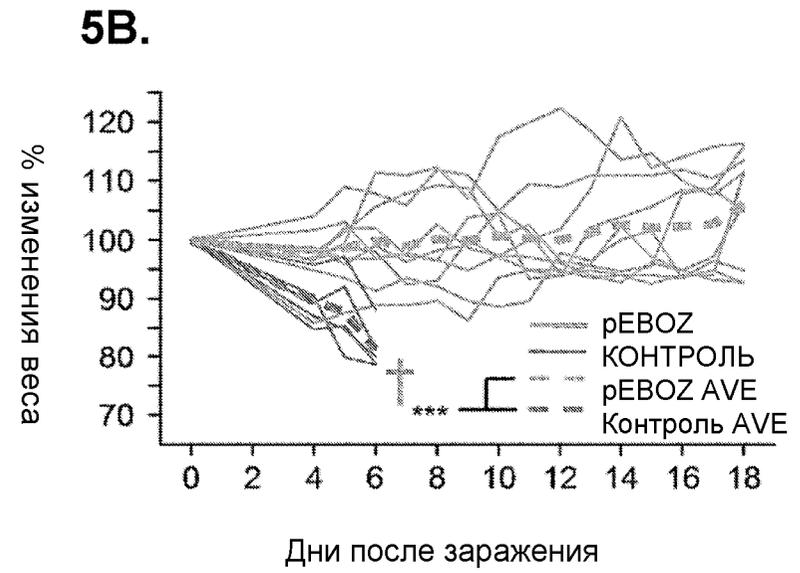
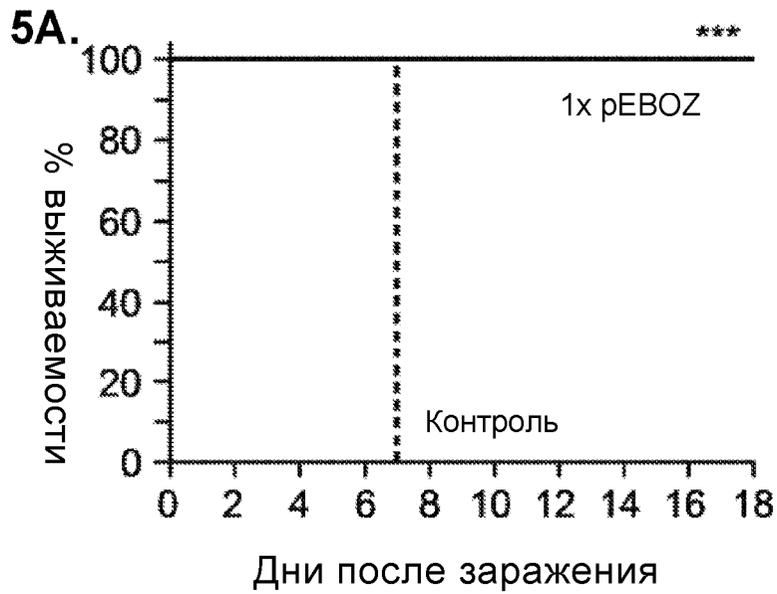
4C.



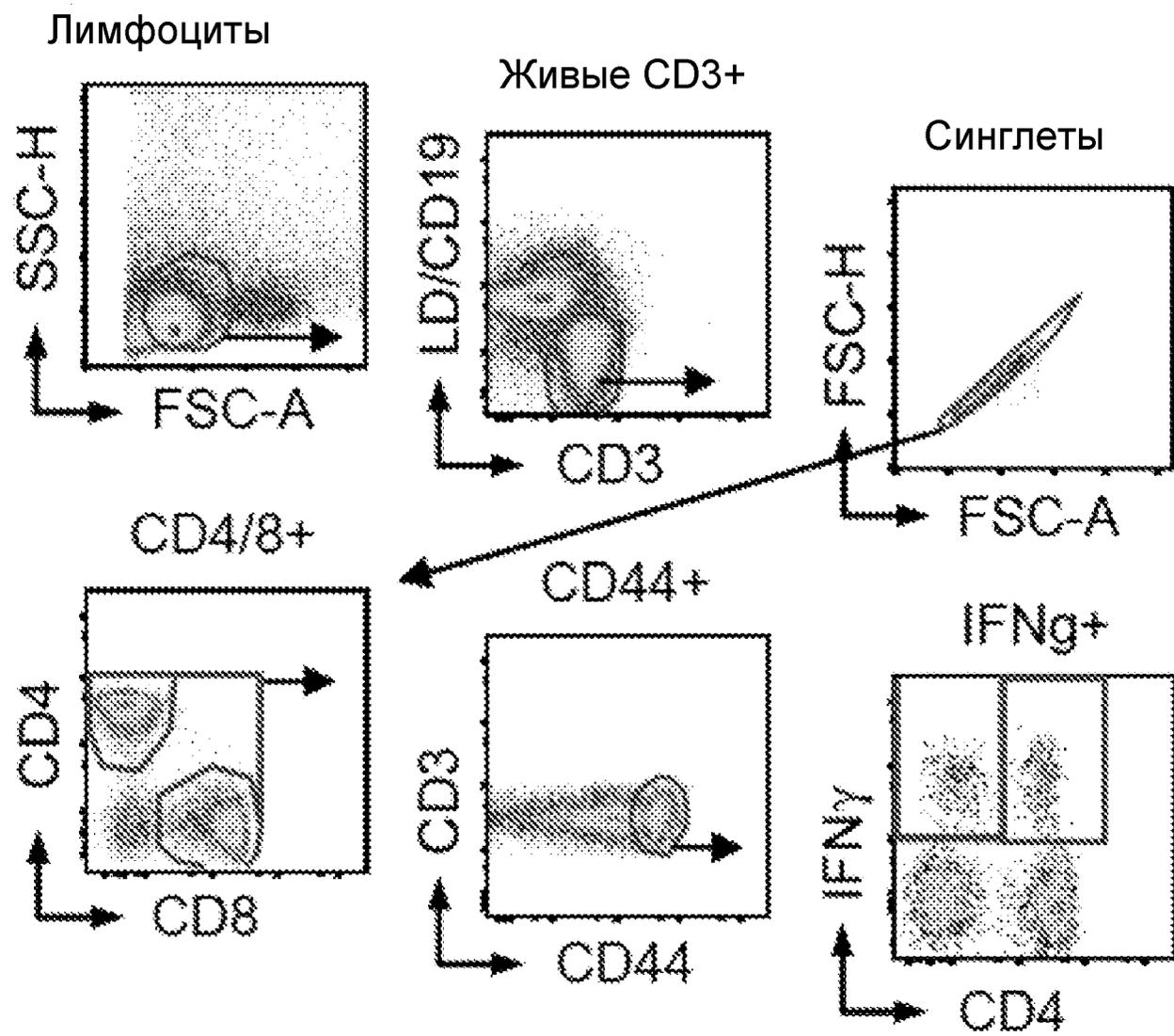
4D.



Фигура 4A-4D

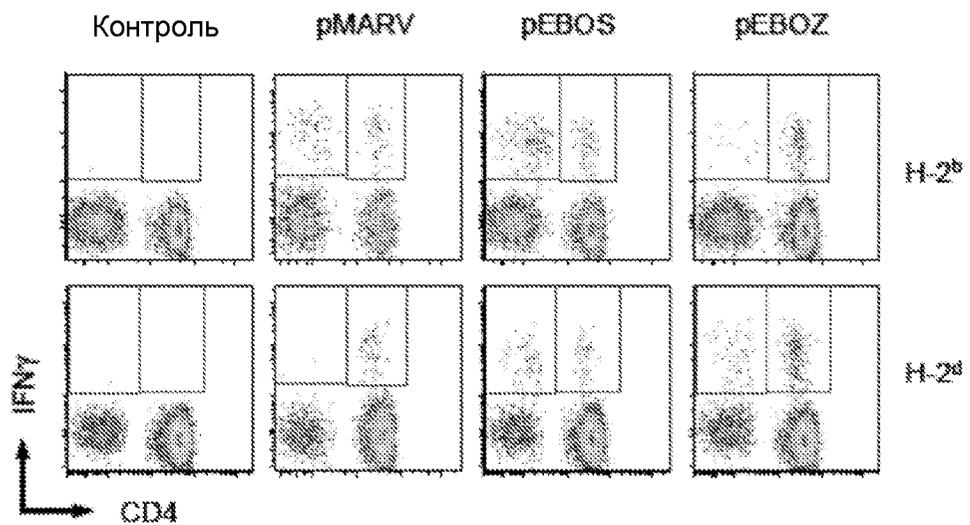


Фигура 5A-5D

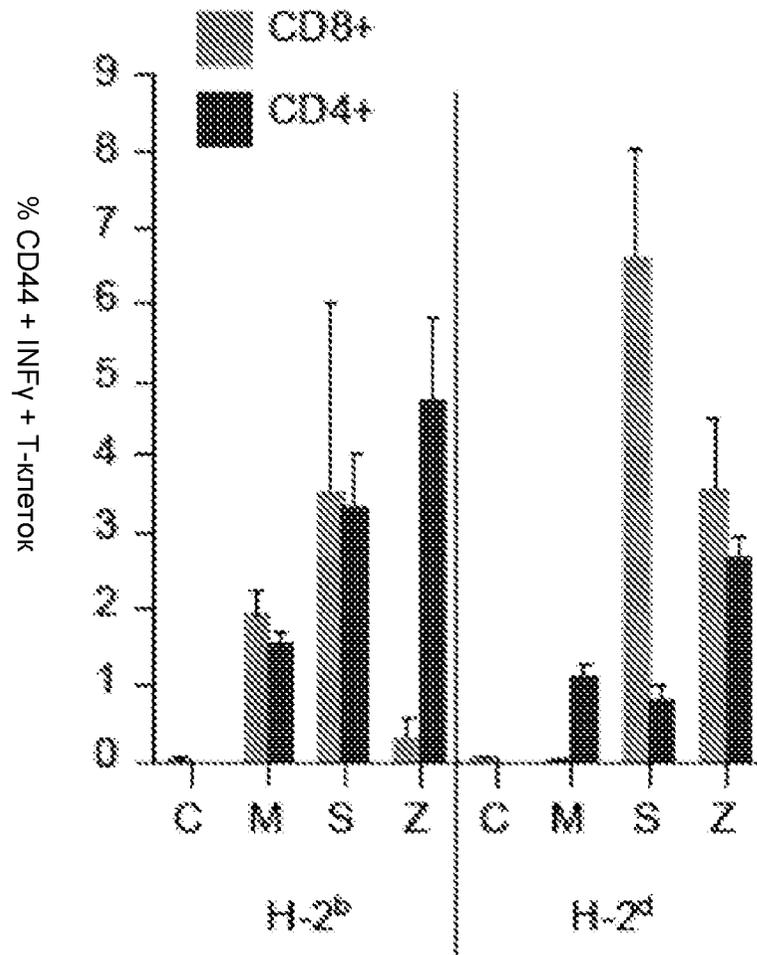


Фиг. 6

7A.



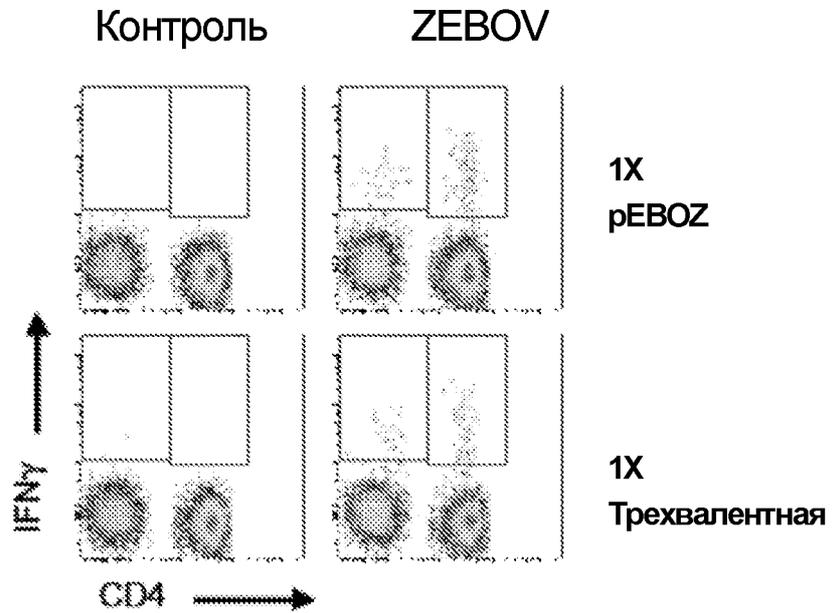
7B.



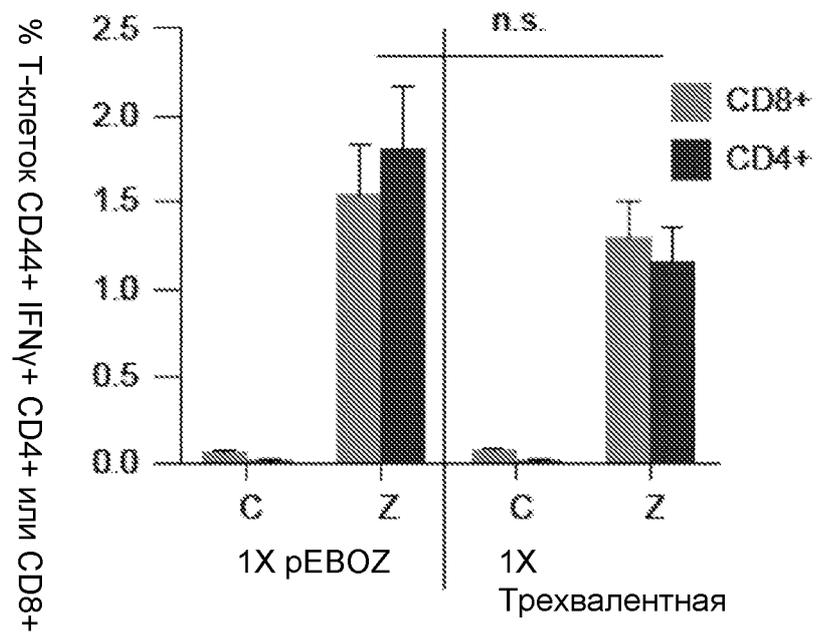
7/60

Фигура 7A-7B

8A.



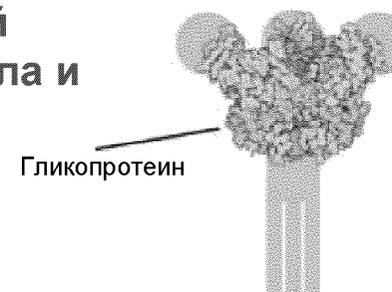
8B.



Фигура 8А-8В

# Экспериментальные вакцины против Эбола

Гликопротеины (GP) вируса Эбола представляют собой основную антигенную мишень для вакцин: Мишень антитела и Т-клеток



**Вакцины, в настоящее время находящиеся на клинических испытаниях**

- rVSVAG/ZEBOVGP
- Первичная вакцинация ChAd3 + бустерная вакцинация MVA
- MVA pan-filovirus



**Преимущества:** иммуногенные, защитные у NHP, однократная защита

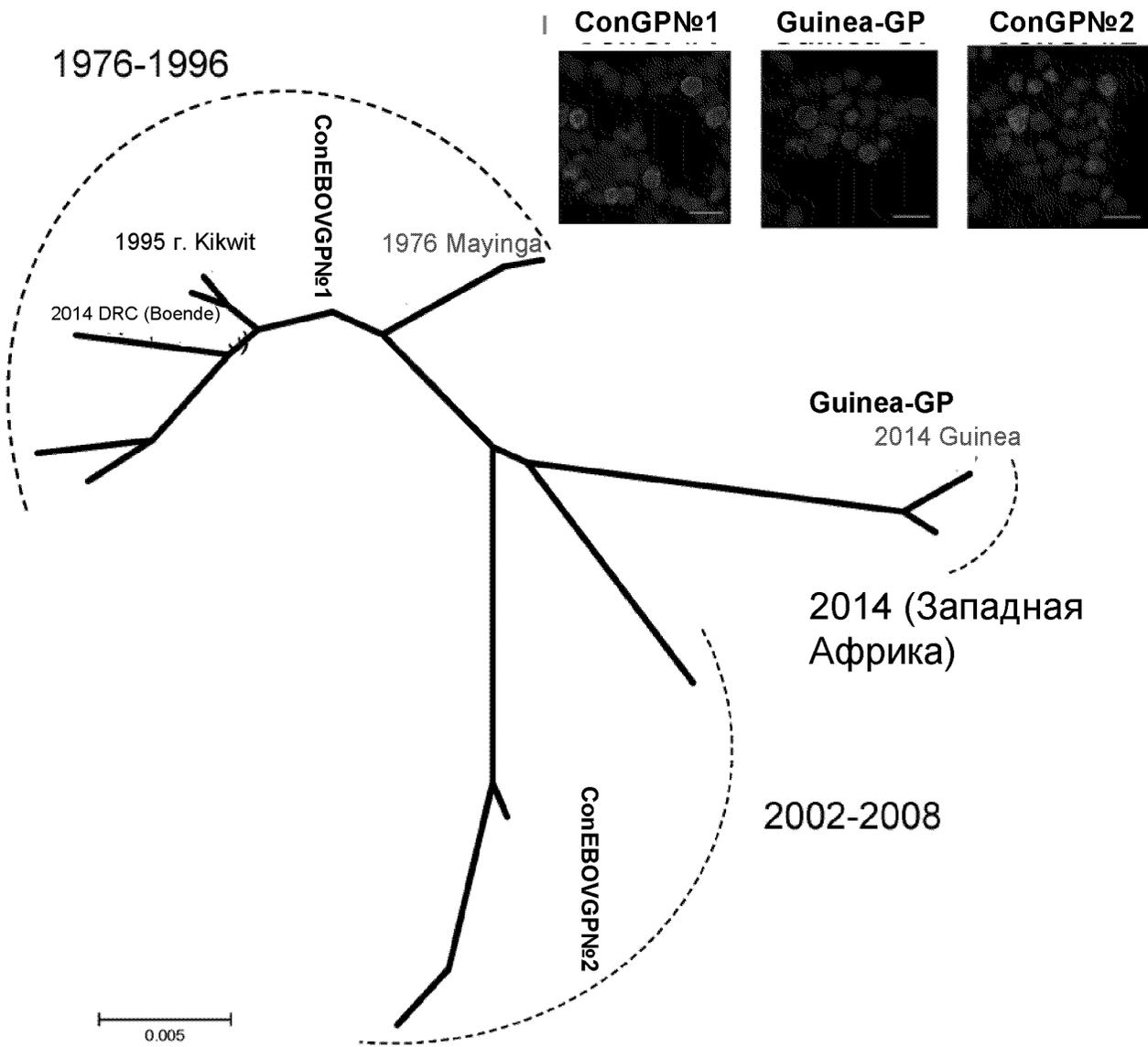
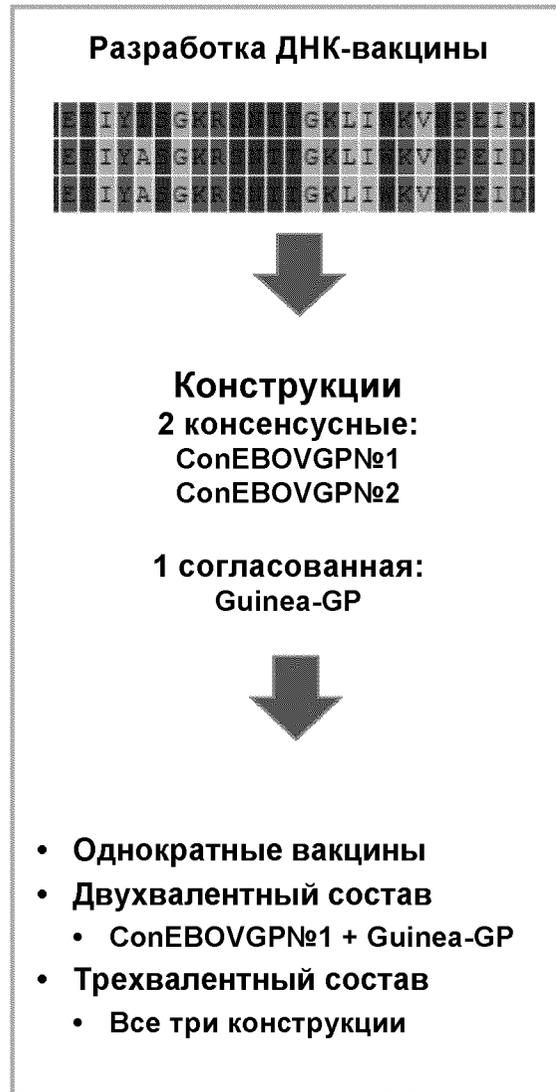
## **Недостатки:**

- развитие иммунитета против вектора
- неопределенная длительность вторичного иммунного ответа
- побочные реакции в клинических испытаниях на людях
- может подходить не для всех популяций

**Дополнительная платформа с более четким профилем безопасности, которая может вызывать сильные иммунные ответы против гетерологичных вирусов Эбола Заир, была бы очень полезной**

Фиг. 9

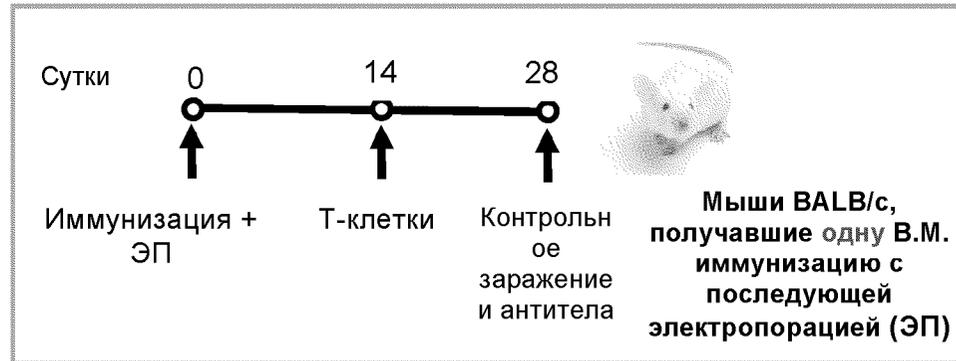
# Разработка состава ДНК-вакцины EBOV GP



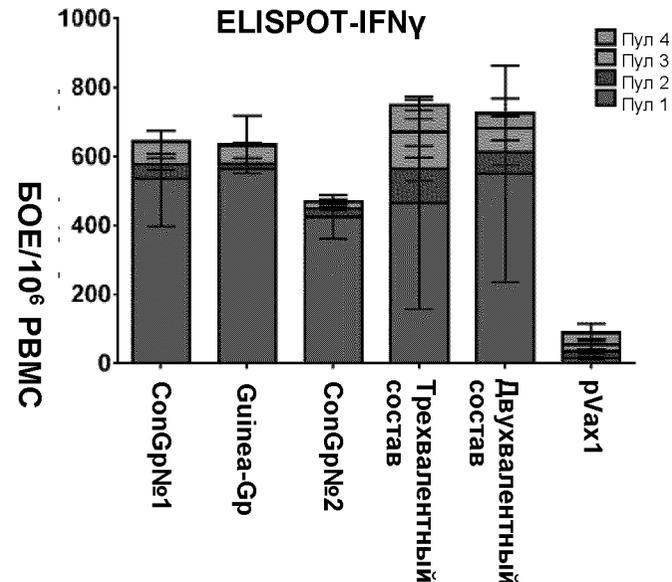
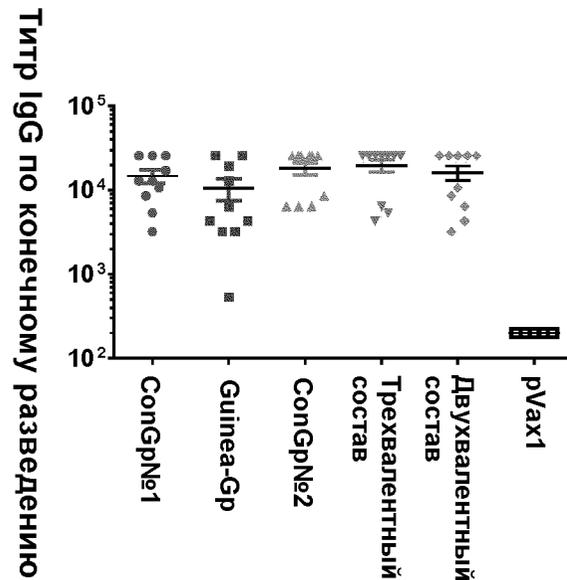
10/60

Фиг. 10

# Однократная иммунизация ДНК-вакциной является иммуногенной для мышей



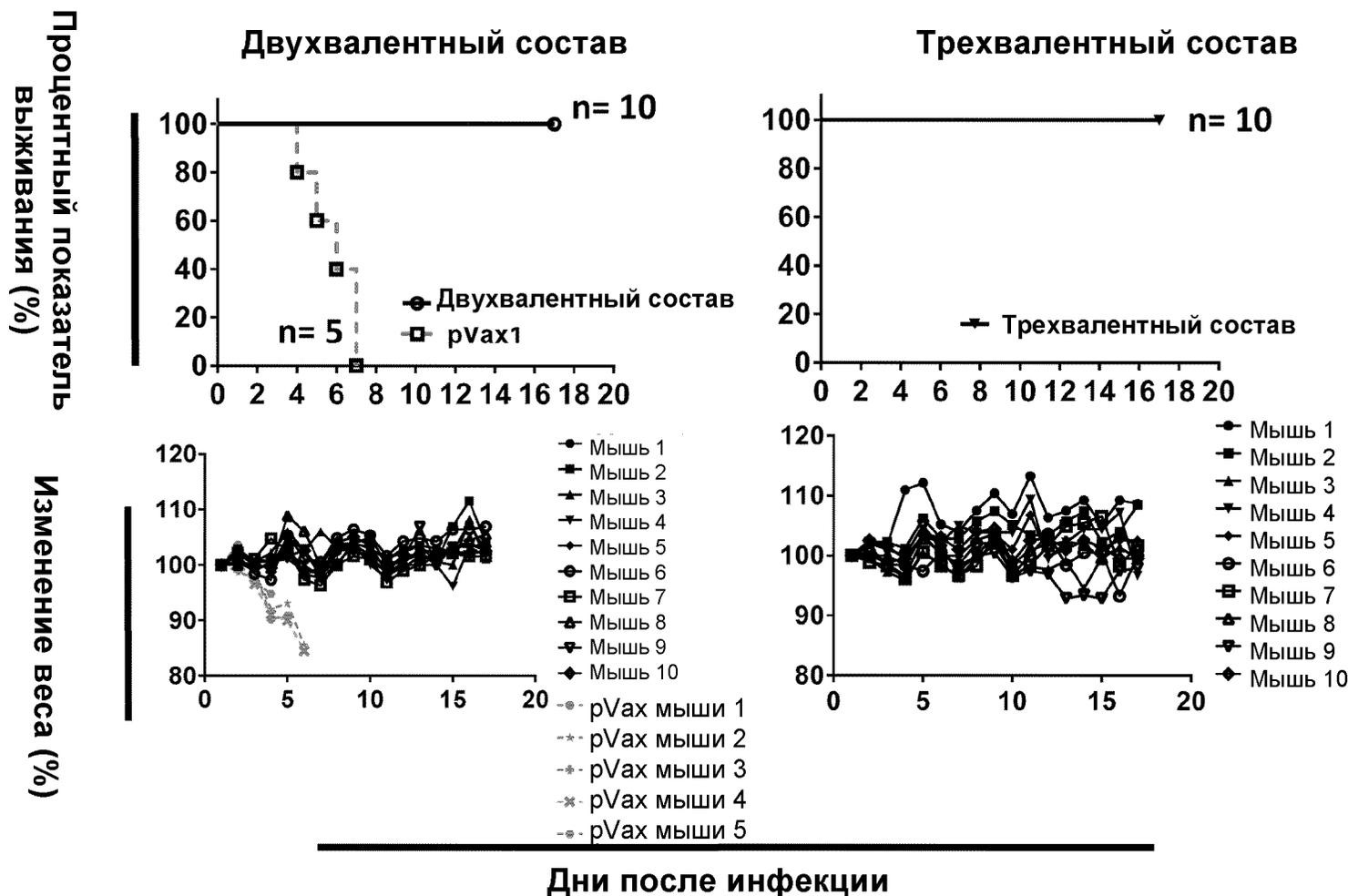
Общий титр антител IgG



Полифункциональные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, секретирующие IFN $\gamma$ , IL2 и TNF $\alpha$ , были сходными для всех вакцин и составов.

Фиг. 11

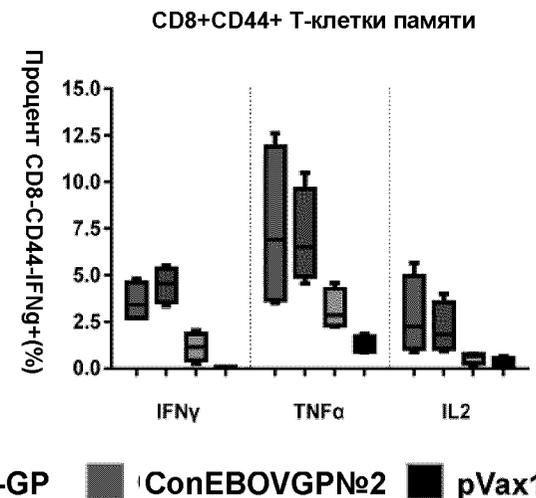
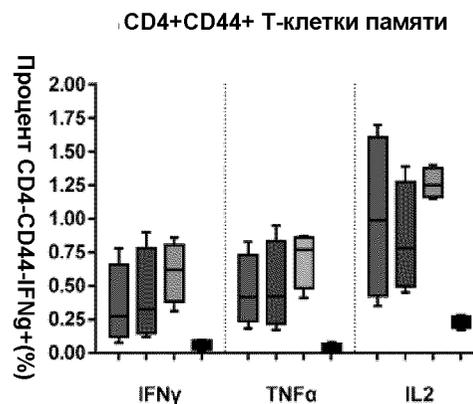
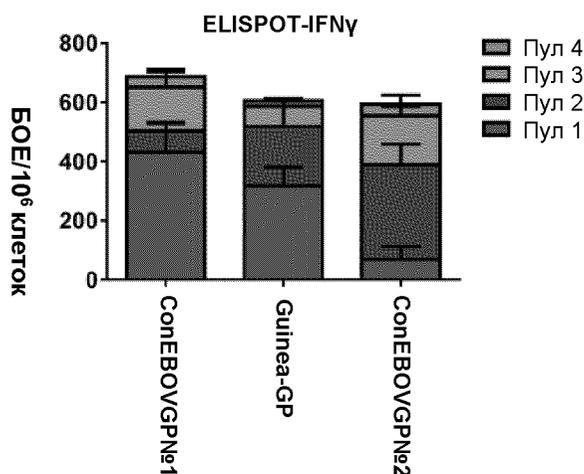
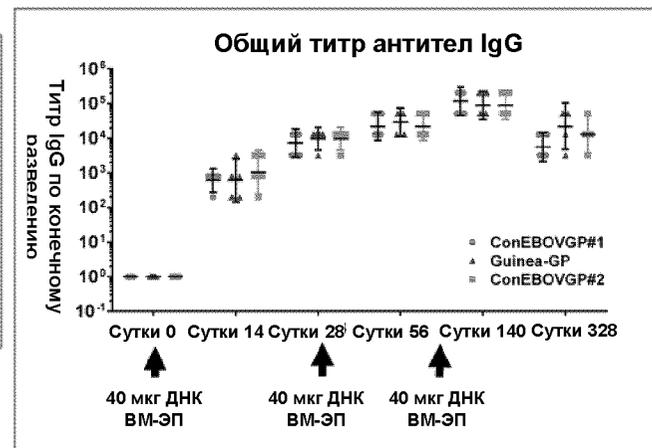
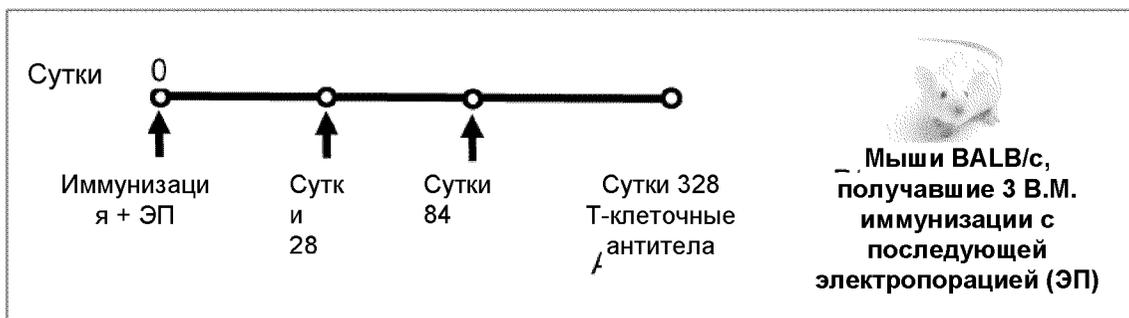
# Одна иммунизация полностью защищает мышей от смертельного контрольного заражения адаптированным к мышам вирусом Эбола



Смертельное контрольное заражение 1000 LD50 гетерологичного штамма для заражения Ebolavirus = адаптированный к мышам Эбола Mayinga 1976

Фиг. 12

# Отдельные конструкции GP ДНК-вакцин вызывают устойчивые вторичные иммунные ответы



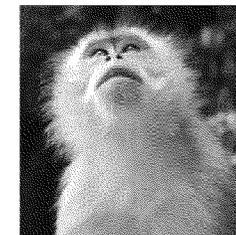
Устойчивые иммунные ответы обнаружены через несколько месяцев после последней инъекции

Фиг. 13

# Эффективность GP ДНК-вакцин у приматов кроме человека

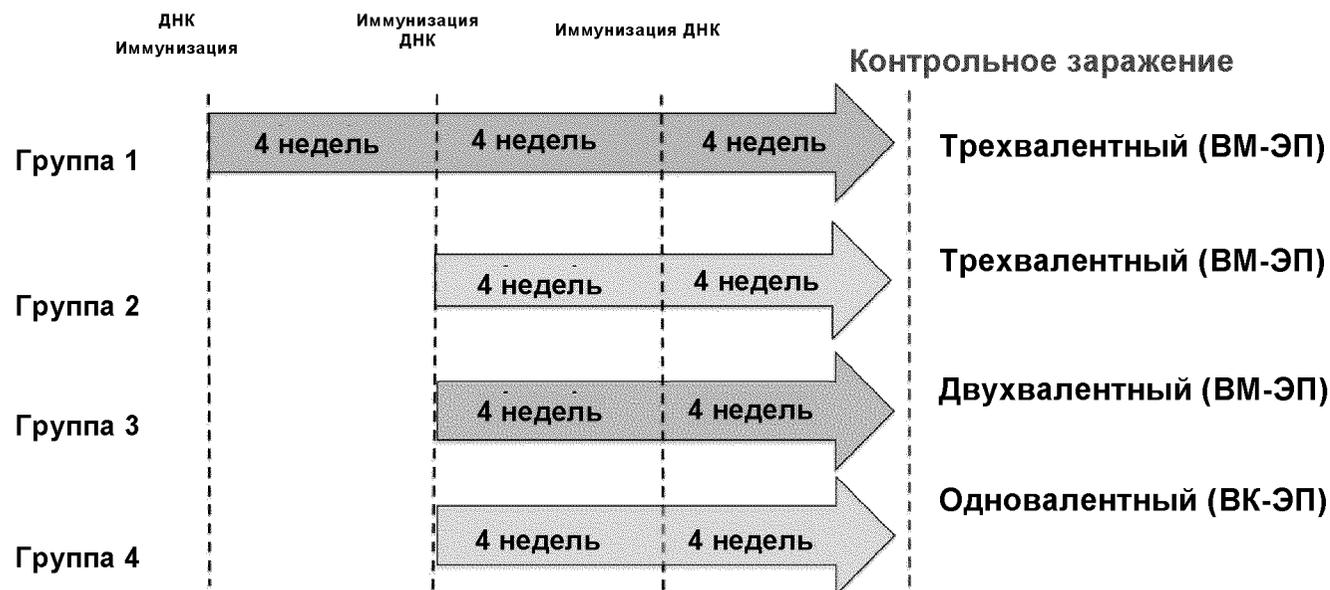
Введенные В.М. с последующей ЭП

Двухвалентный состав	Трехвалентный состав
1. ConEBOVGPN <sup>№1</sup> 2. Соответствующий вспышке GP + Адъювант: Опт. Rhesus pIL12	1. ConEBOVGPN <sup>№1</sup> 2. Соответствующий вспышке GP 3. ConEBOVGPN <sup>№2</sup> + Адъювант: Опт. Rhesus pIL12



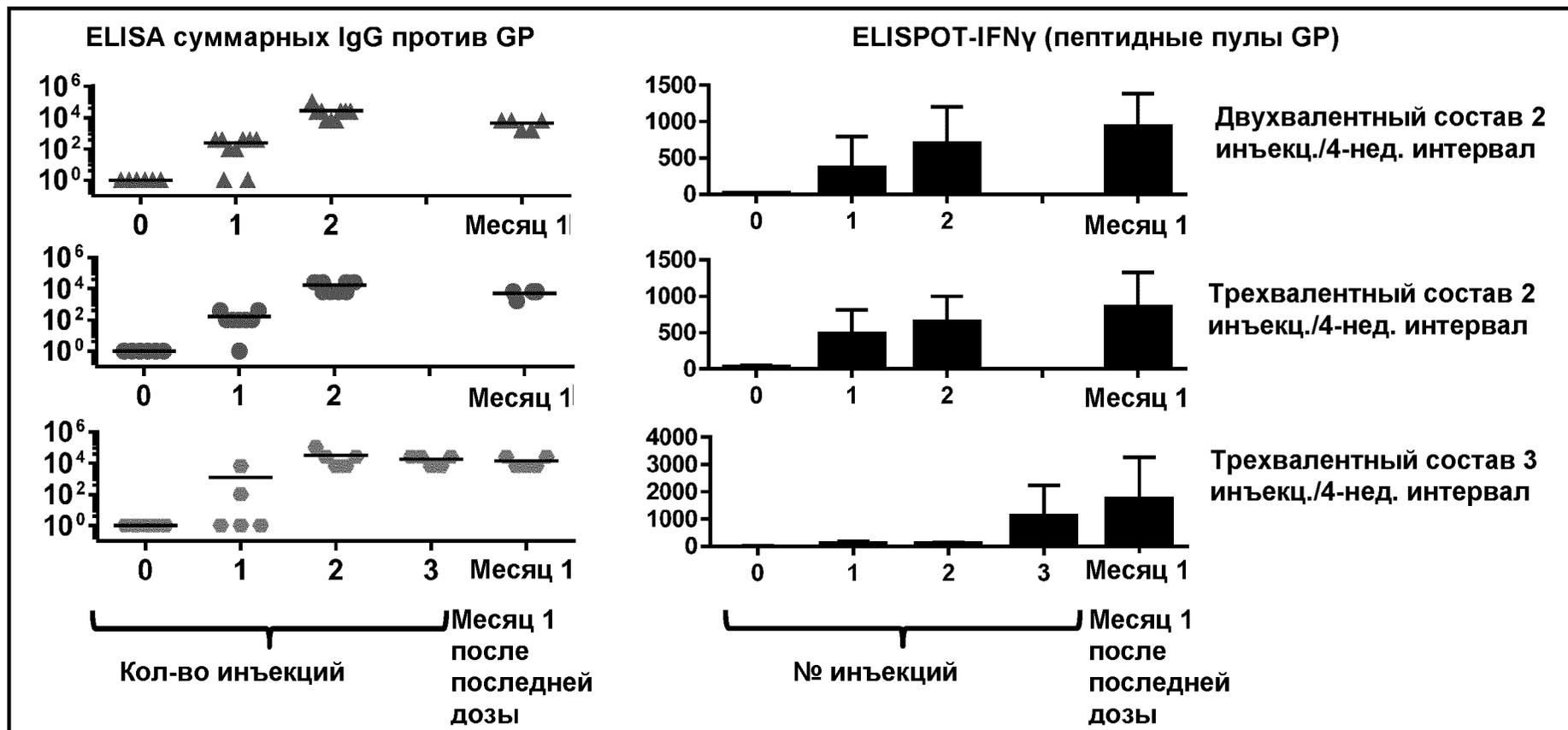
Макаки *Супотолгус* являются моделью эффективности вакцины против Эболы и смертельного контрольного заражения

Оцененные различные схемы введения для понимания развития иммуногенности



Фиг. 14

# Составы GP ДНК-вакцин являются иммуногенными для NHP



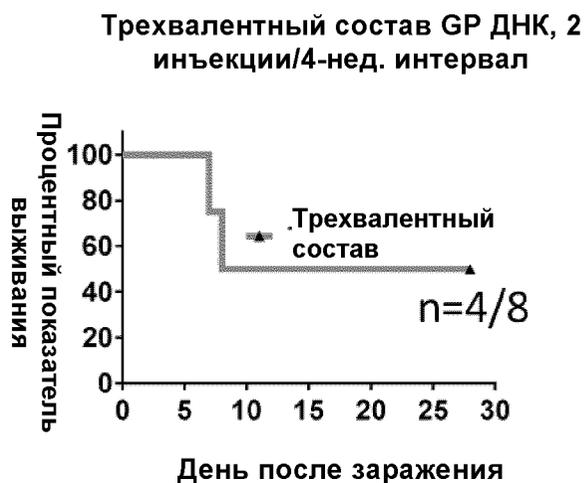
Составы ДНК-вакцин индуцируют ответы антител GP против вируса Эбола (GMT >10<sup>3</sup>) и Т-клеточные ответы GP.

Иммунные ответы усиливались после каждой инъекции.

Фиг. 15

## Вакцины с составами ДНК GP защищают от смертельного заражения вирусом Эбола Заир (Makona)

Доза контрольного заражения = 1000 TCID<sub>50</sub> вируса C07 Guinea-Makona 2014 (контрольный штамм 7-U), 28 после конечной иммунизации ДНК



Животных наблюдали в течение 28 дней после заражения.

Выжившие животные не имели каких-либо существенных признаков заболевания. Они также поддерживали нормальный уровень СВС и уровни ферментов

# Клиническое исследования EBOV-001 фазы I (NCT02464670)

Открытое исследование INO-4212 с INO-9012 или без него, введенного ВМ или ВК с последующей электропорацией у здоровых добровольцев

Первичный результат: оценка безопасности

Вторичный результаты: иммунологическая оценка

Другое: внутрикожная (ВК) доставка в сравнении с внутримышечной (ВМ) доставкой

Когорта	Вакцина	Схема	Путь	Доза (мг)
1	ConEBOVGPN№1	0-4-12 недель	ВМ	2
2	Guinea-GP	0-4-12 недель	ВМ	2
3	ConEBOVGPN№1	0-4-12 недель	ВК	2
4	ConEBOVGPN№1 + Guinea-GP	0-4-12 недель	ВМ	4
5	ConEBOVGPN№1 + Guinea-GP + плазмиды IL12	0-4-12 недель	ВМ	4+1

17/60

Фиг. 17

# Сероконверсия EBOV-001

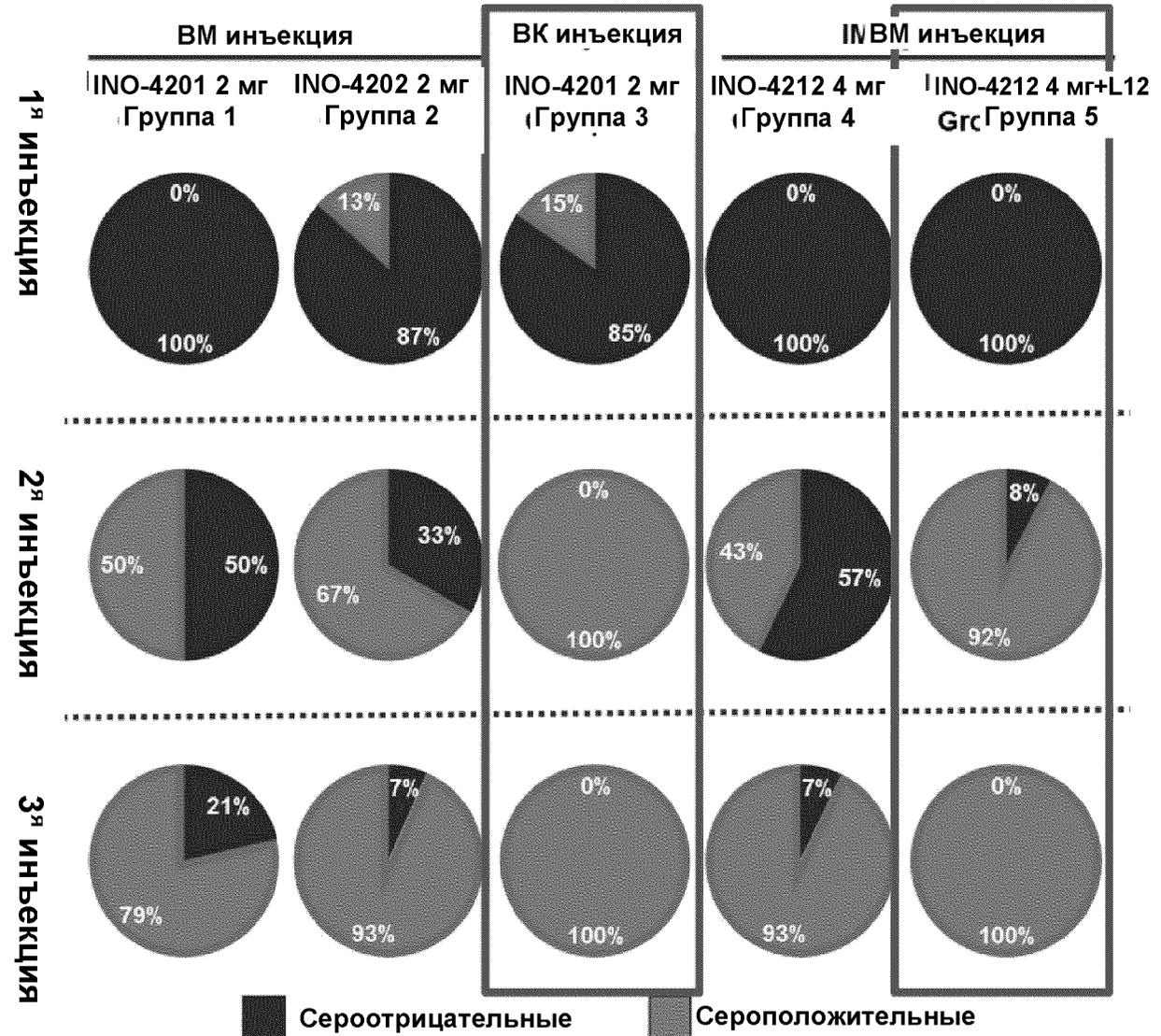
Всего 69 субъектов

Анализ ELISA:

- базовый уровень
- неделя 2
- неделя 6
- неделя 14

Сероположительный = +  
ответ IgG антител на  
гликопротеин Эбола Заир

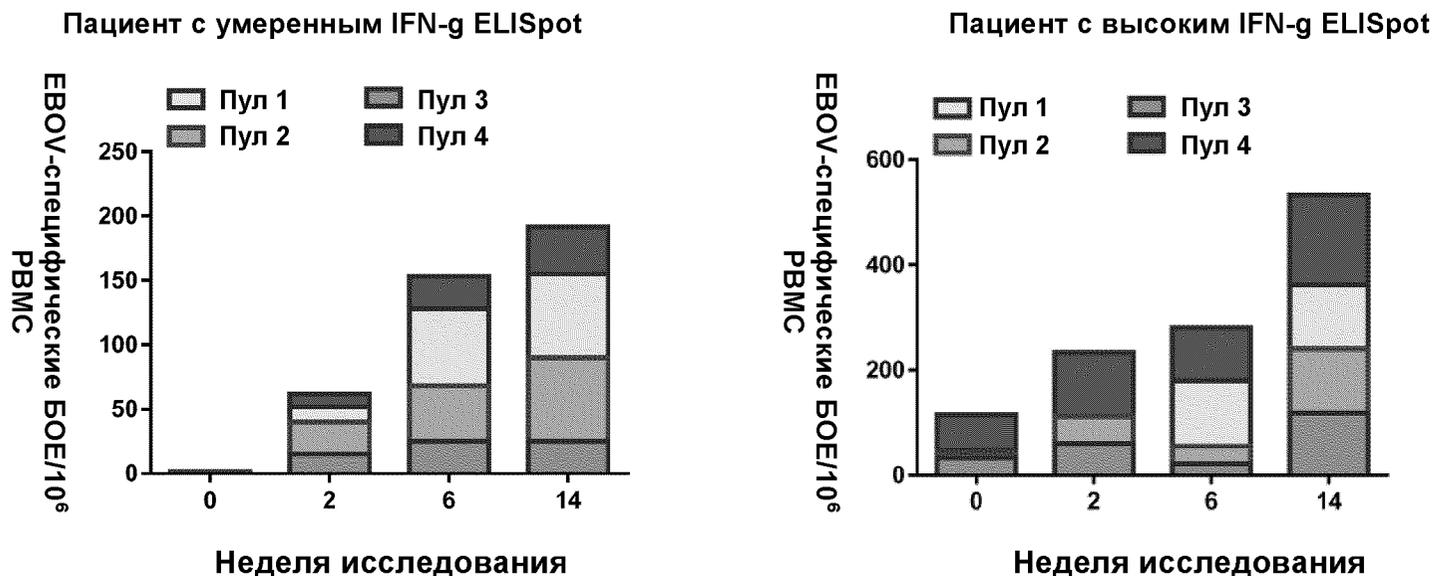
Неделя 14: IgG GMT =  $10^3$ - $10^5$



18/60

Фиг. 18

# ЕВОV 001: Индукция специфических к GP Эбола Т-клеточных ответов (ELISpot): Показательные пациенты



• Анализ ELISpot: базовый уровень, неделя 2, неделя 6, неделя 14.

• 4 пептидные пула, применяемые для стимуляции, представляли собой GP пул 1, GP пул 2, GP пул 3, GP пул 4.

## Сравнение с другими платформами вакцин против Эбола, в настоящее время находящихся на клинических испытаниях

	ChAd3/MVA-GP	rVSV/ZEBOVGP	GP ДНК-вакцина
	NIAID VRC/GSK	PHAC/Newlink/Merck	Inovio
Трансген	1976 GP	1995 GP	Консенсусный GP 2014 GP
Способ введения	В.М.	В.М.	В.М. или В.К.
Схема лечения	Первичная вакцинация ChAd3 (60-90% серопоз.), MVA бустерная вакцинация	Однократная инъекция	2 инъекция (100% сероп. ВК) 3 инъекция (100% сероп. ВМ)
Побочные эффекты	Лихорадка, утомляемость, артралгия, лимфопения	Лихорадка, утомляемость, артралгия	Отсутствует
Боль в месте инъекции	Да	Да	Да
Титры антител	$>10^3$	$>10^3$	$10^3$ - $10^5$
Т-клеточные ответы	Да	Н/Д	Да
Холодовая цепь	-20С	-20С	4С
Другие отметки	Требуется бустерная вакцинация MVA для образования длительного вторичного иммунного ответа	Испытание с кольцевой вакцинацией, длительный вторичный иммунный ответ не подтвержден	Может быть введена повторно. Исследование вторичного иммунного ответа продолжается

\*\*Rampling et al 2015, Legerwood et al 2014, Agnandji et al 2015, Henao-Restrepo et al 2015, Tapia et al 2015

**Некоторые из побочных эффектов rVSV/ZEBOVGP и ChAd3/MVAGP частично совпадают с симптомами вируса Эбола**

Фиг. 20

20/60

# EBOV001 ELISA

- 69 субъектов из всех когорт (1-5) включены в анализ.
- Анализ ELISA: базовый уровень, неделя 2, неделя 6, неделя 14.
- Применяемый белок представлял собой белок Эбола Заир

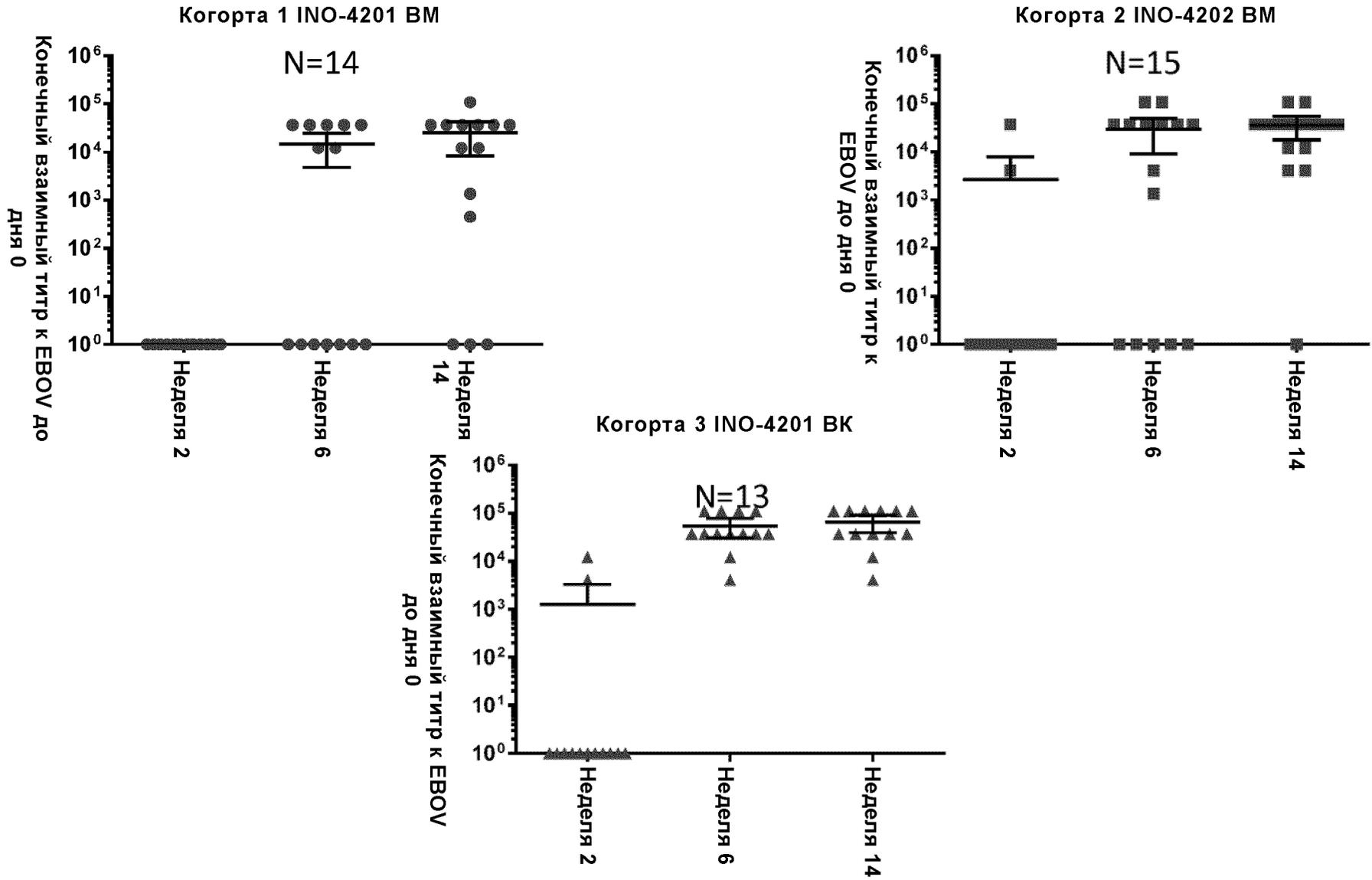
## Описания когорт

Когорта	Вакцина	Плазмиды, включенные в вакцину	Схемы	Путь	Доза (мг)
1	INO-4201	pGX4201	0-4-12-неделя	IM	2
2	INO-4202	pGX4202	0-4-12-неделя	IM	2
3	INO-4201	pGX4201	0-4-12-неделя	ID	2
4	INO-4212	pGX4201 и pGX4202	0-4-12-неделя	IM	4
5	INO-4212 +INO-9012	pGX4201, pGX4202, и pGX6001	0-4-12-неделя	IM	4+1

	Этническая принадлежность		Расовая принадлежность				Западноафриканское происхождение		
	Латиноамериканцы	Не латиноамериканцы	Африканцы	Европейцы	Азиаты	МЕЖРАСОВЫЕ			
Количество субъектов	74	8	66	34	37	2	1	1	Сьерра-Леоне
Мужчины	25	4	21	9	15	1	0		Субъект 4201-007, Когорта 1
Женщины	49	4	45	25	22	1	1		

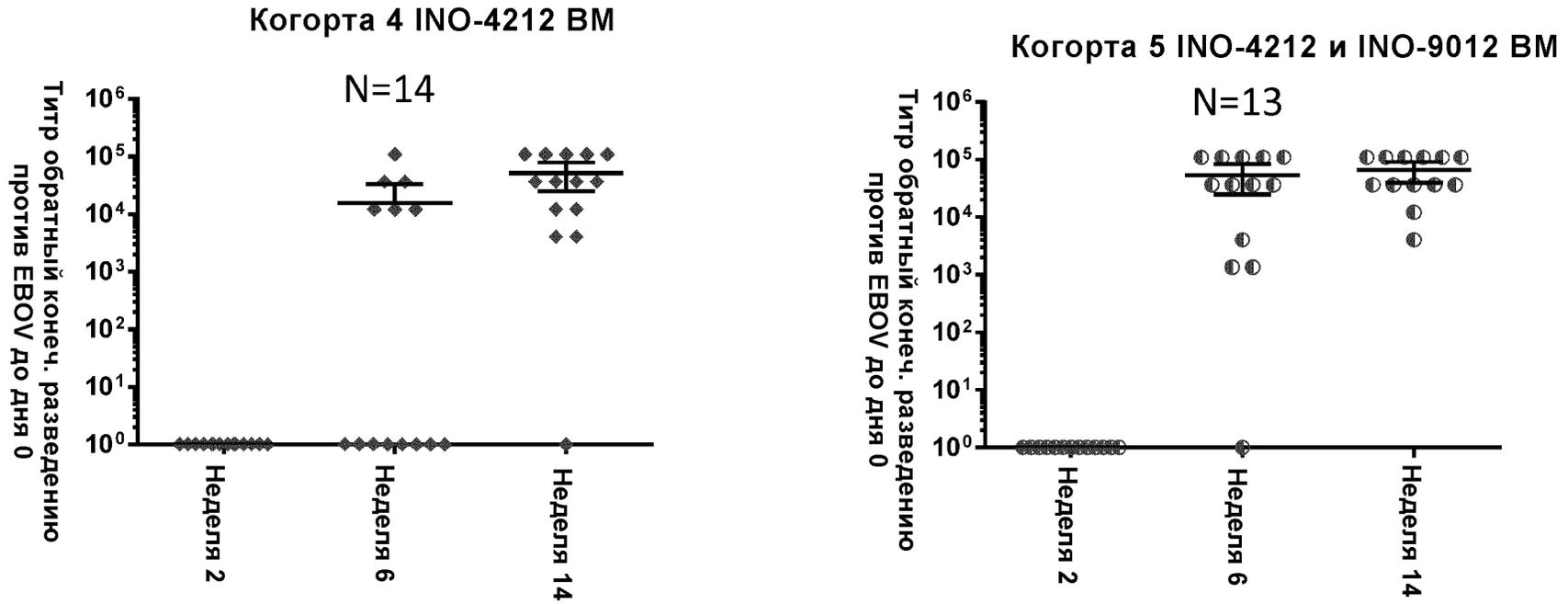
Фиг. 21

# Титры ELISA по когорте и моменту времени



Фиг. 22

# Титры ELISA по когорте и моменту времени



23/60

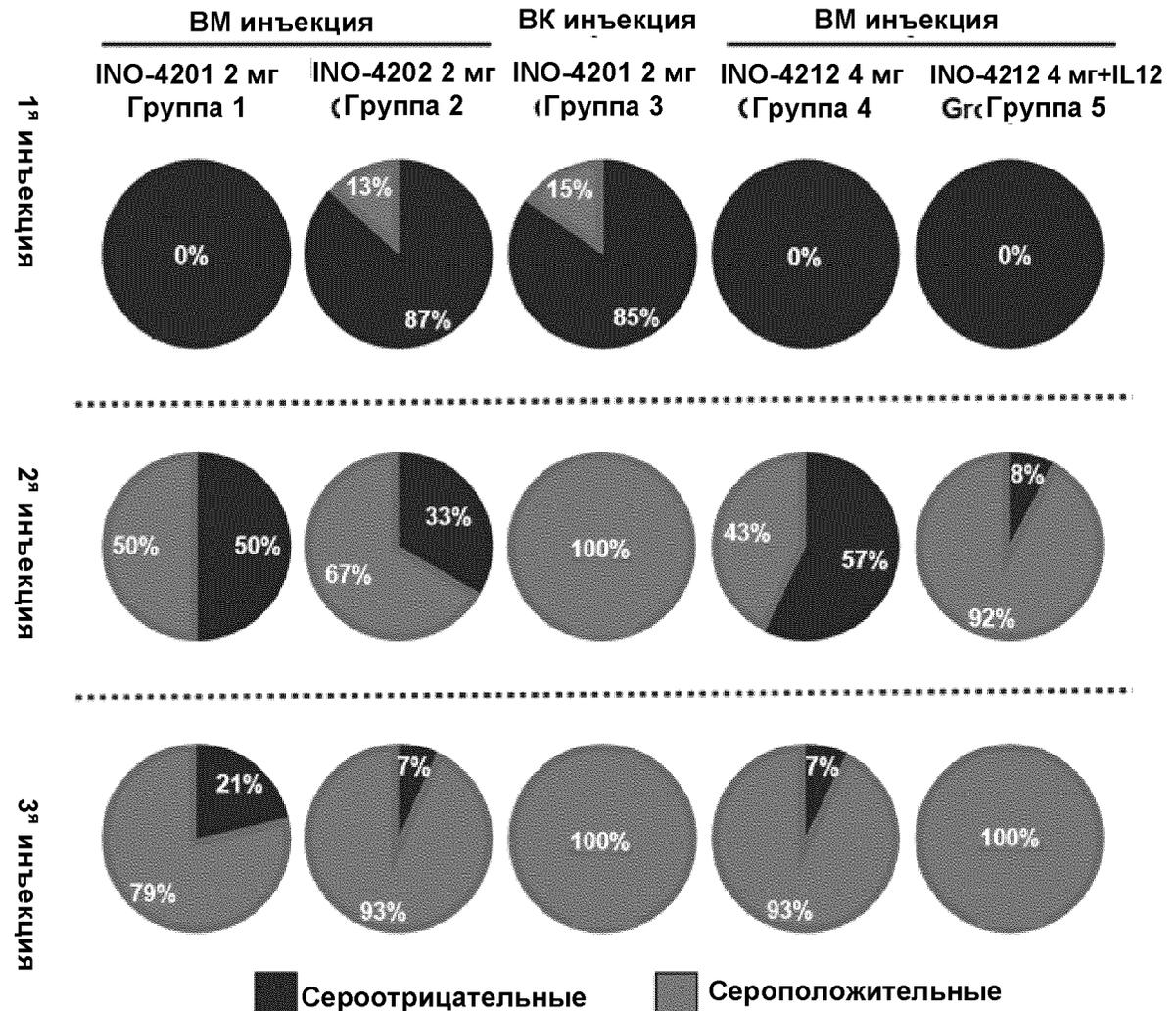
Когорта	Геометрические средние обратные титры EBOV				
	1	2	3	4	5
GMT недели 2 (диапазон)	1 (1-1)	3.50 (1-36,450)	3.91 (1-12,150)	1 (1-1)	1 (1-1)
GMT недели 6 (диапазон)	163.88 (1-36,450)	882.49 (1-109,350)	39,664.20 (4050-109,350)	77.06 (1-109,350)	12,609.40 (1-109,350)
GMT недели 14 (диапазон)	2,049.04 (1-109,350)	13,500.60 (1-109,350)	46,968.00 (4050-109,350)	15,914.10 (1-109,350)	46,968.00 (1-109,350)

Фиг. 23

# Обобщенные результаты ELISA

## • Обобщенные результаты:

- Реакционная способность от незначительной до отсутствующей после первой дозы
- Доза 2 начинает приводить к сероконверсии, причем в когортах 3 и 5 наблюдается наибольшая частота.
- Доза 3 обеспечивает более 90% сероконверсии в 4/5 когортах. Когорты 3 и 5 демонстрируют 100% сероконверсию в данный момент времени



24/60

Фиг. 24

# EBOV001 ELISpot

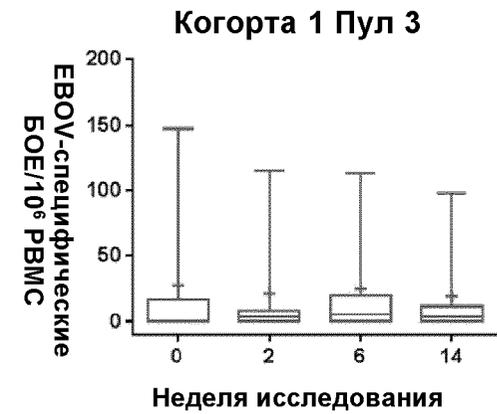
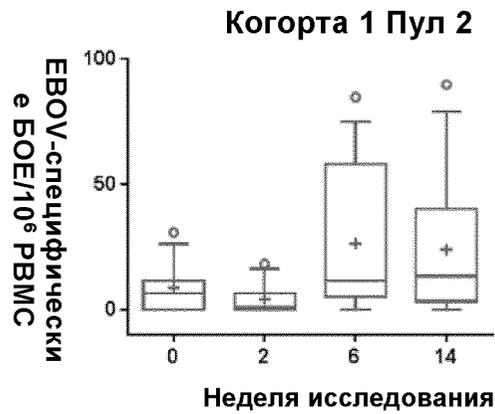
- 75 субъектов из всех когорт (1-5) включены в анализ.
- Анализ ELISpot: базовый уровень, неделя 2, неделя 6, неделя 14.
- 4 пептидных пула (Заир), применяемые для стимуляции:
  - Пул 1 (pp1-28)
  - Пул 2 (pp29-56)
  - Пул 3(pp57-84)
  - Пул 4 (pp85-112)

Когорта:	Вакцина:	Плазмиды, включенные в вакцину	ScIСхема	Путь:	Доза (мг)
1	INO-4201	pGX4201	0-4-12-неделя	IM	2
2	INO-4202	pGX4202	0-4-12-неделя	IM	2
3	INO-4201	pGX4201	0-4-12-неделя	ID	2
4	INO-4212	pGX4201 и pGX4202	0-4-12-неделя	IM	4
5	INO-4212 +INO-9012	pGX4201, pGX4202, и pGX6001	0-4-12-неделя	IM	4+1

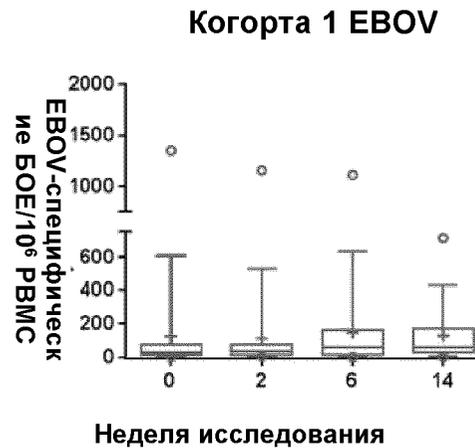
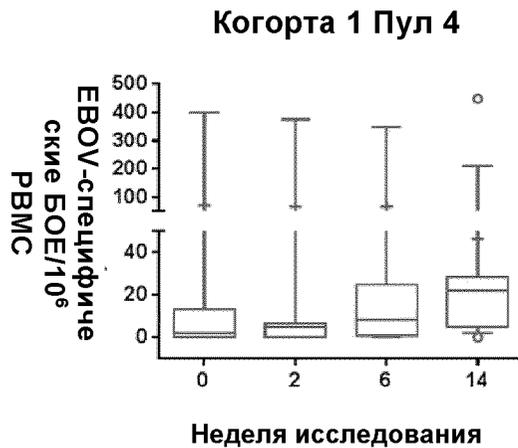
25/60

Фиг. 25

## Когорта 1 Ответы субъектов по пептидному пулу (все субъекты, n = 15)



26/60

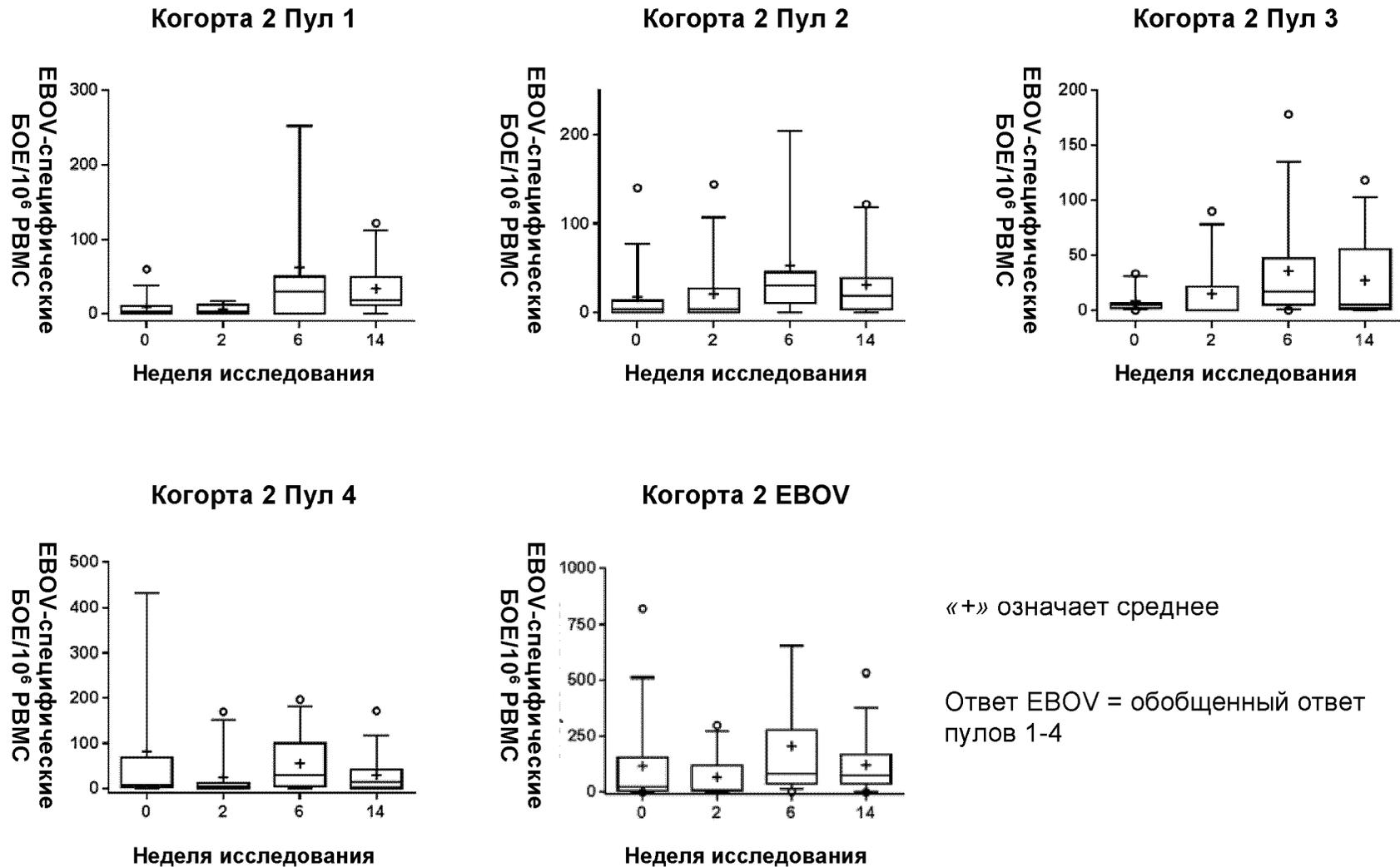


«+» означает среднее

Ответ EBOV = обобщенный  
ответ пулов 1-4

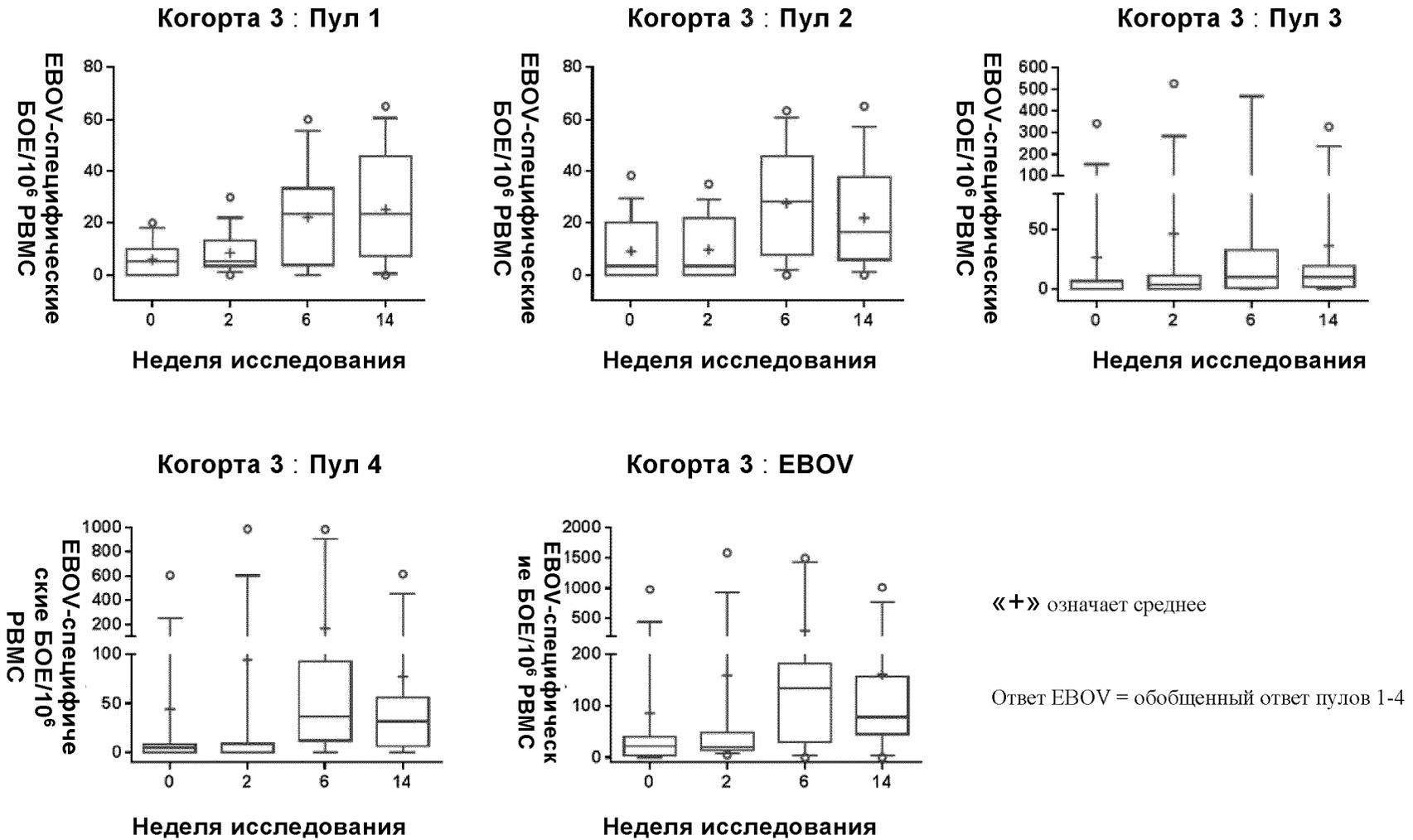
Фиг. 26

## Когорта 2 Ответы субъектов по пептидному пулу (все субъекты, n = 15)



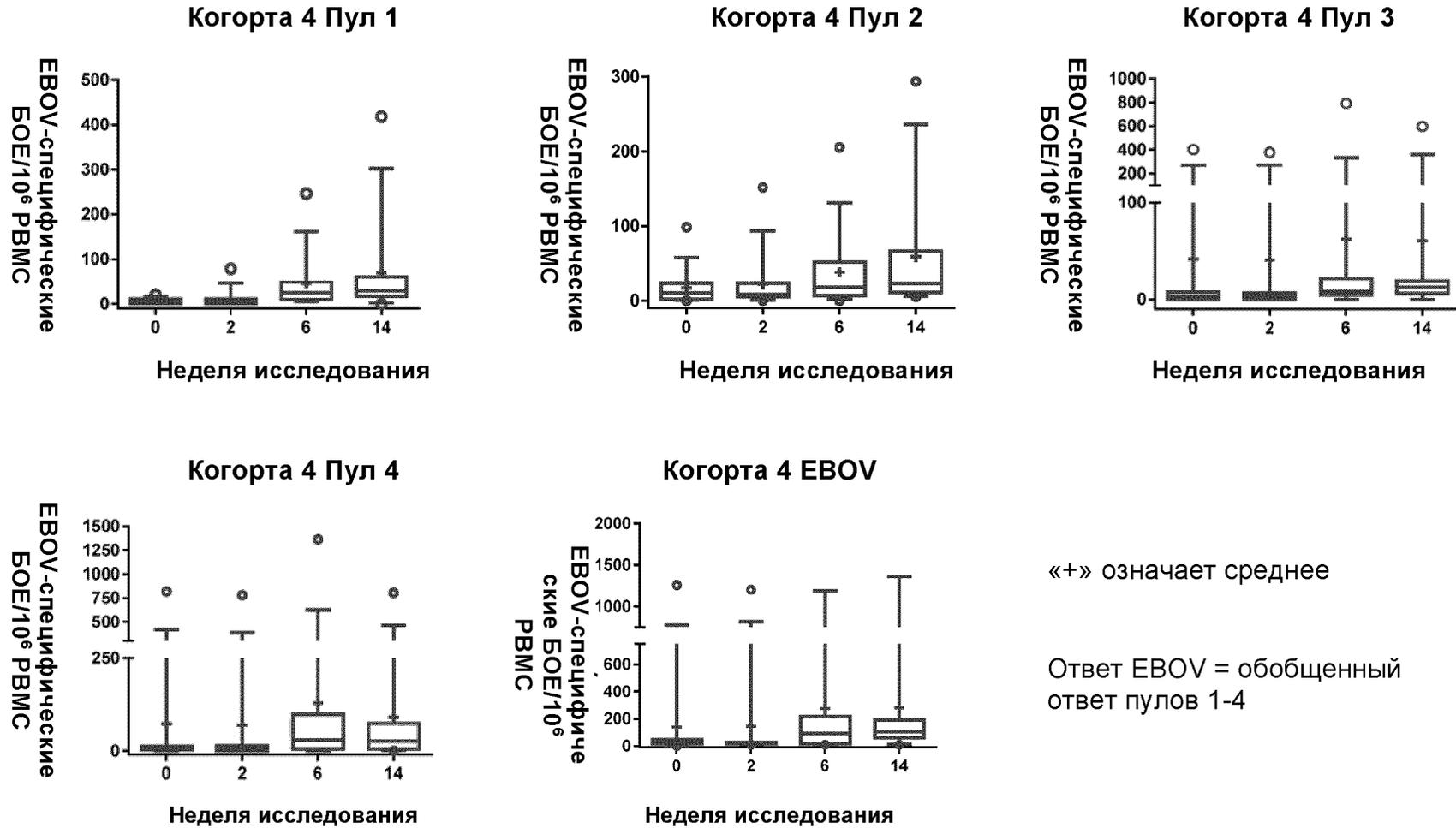
Фиг. 27

**Когорта 3** : Ответы субъектов по пептидному пулу (все субъекты, n = 15)



Фиг. 28

## Когорта 4 Ответы субъектов по пептидному пулу (все субъекты, n = 14)

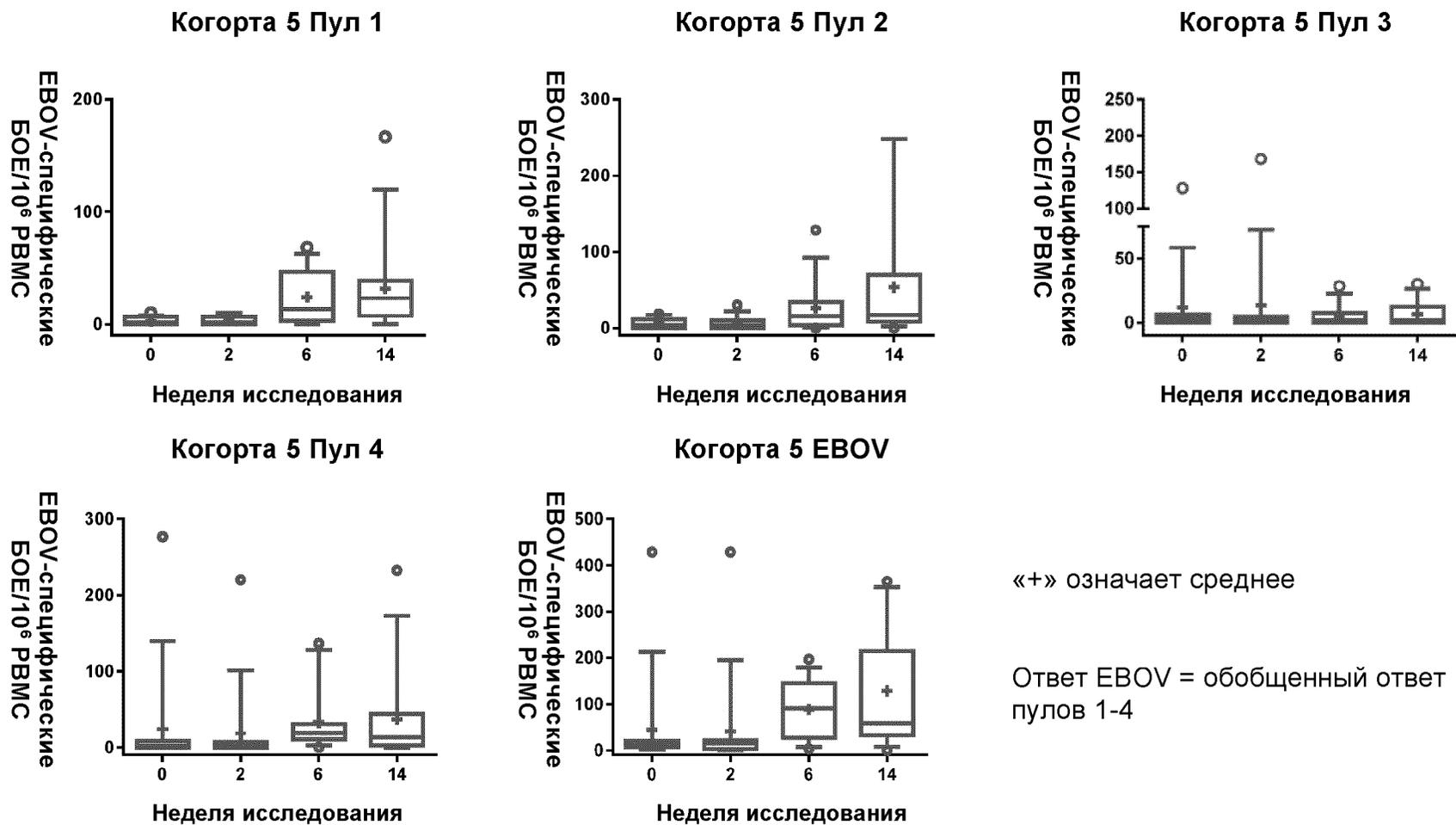


«+» означает среднее

Ответ EBOV = обобщенный  
ответ пулов 1-4

Фиг. 29

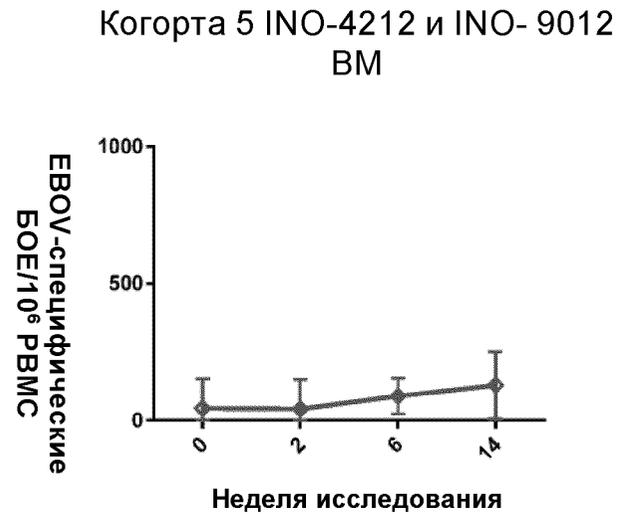
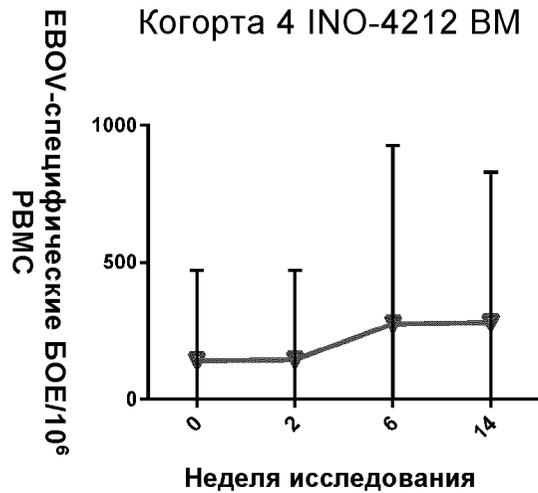
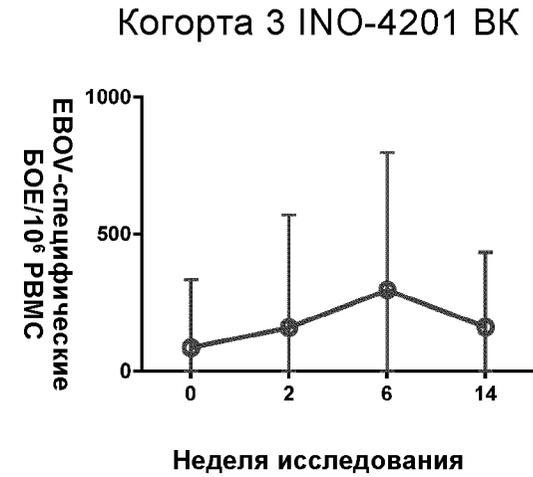
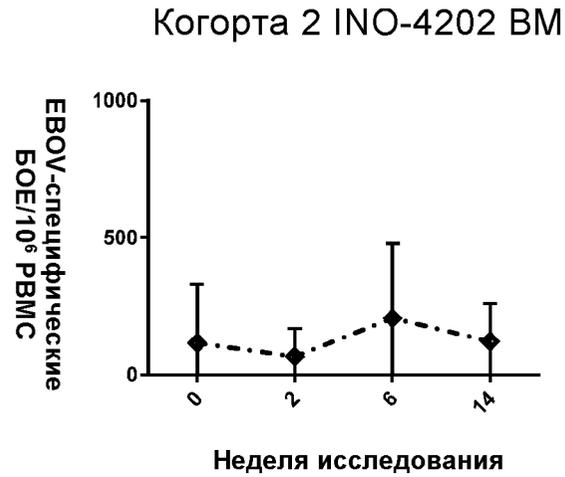
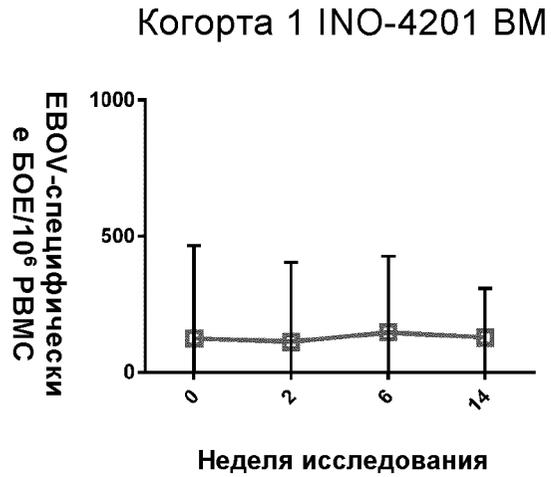
## Когорта 5 Ответы субъектов по пептидному пулу (все субъекты, n = 15)



30/60

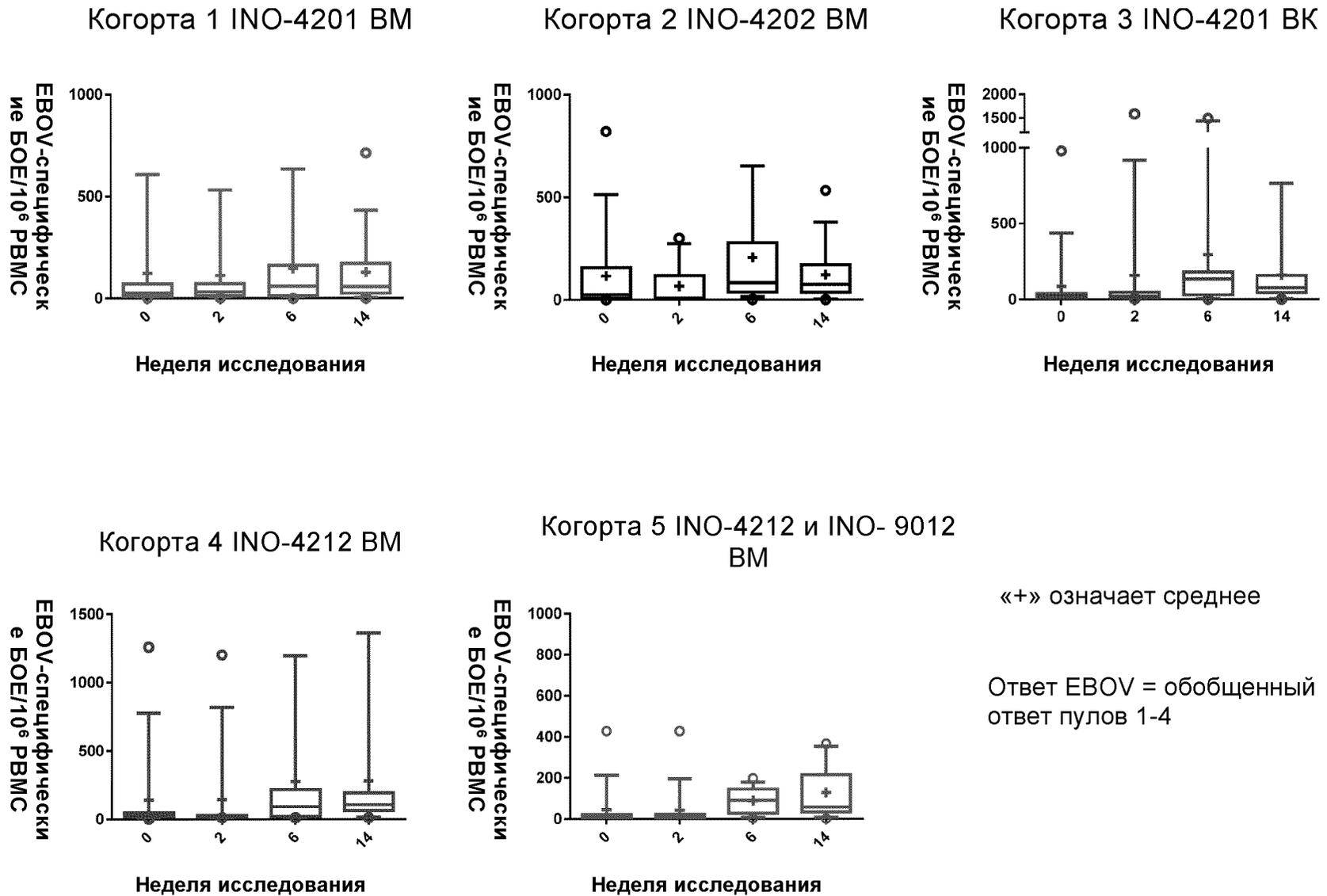
Фиг. 30

## Обобщенные результаты ELISpot по когорте



Фиг. 31

## Обобщенные результаты ELISpot по когорте



Фиг. 32

# Анализ пациентов, ответивших на лечение

## Респондеры, ответившие на вакцину - Все субъекты

Все субъекты			
Респондеры	Всего	% респондеров	
EBOV	4	75	5,3%
Пул GP1	31	75	41,3%
Пул GP 2	22	75	29,3%
Пул GP 3	5	75	6,7%
Пул GP 4	3	75	4,0%

Ответ по пулу					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	0/15	1/15	2/15	1/15	0/15
Пул GP 1	6/15	8/15	4/15	7/15	6/15
Пул GP 2	5/15	4/15	3/15	5/15	5/15
Пул GP 3	0/15	1/15	2/15	2/15	0/15
Пул GP 4	0/15	0/15	2/15	1/15	0/15

Ответ по когорте					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	0/15	1/15	2/15	1/15	0/15
Любой пул	7/15	8/15	6/15	8/15	7/15

Все субъекты			
Респондеры	Всего	% респондеров	
EBOV	4	75	5,3%
Любой пул	36	75	48,0%

% ответа по пулу					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	0,0%	6,7%	13,3%	6,7%	0,0%
Пул GP 1	40,0%	53,3%	26,7%	46,7%	40,0%
Пул GP 2	33,3%	26,7%	20,0%	33,3%	33,3%
Пул GP 3	0,0%	6,7%	13,3%	13,3%	0,0%
Пул GP 4	0,0%	0,0%	13,3%	6,7%	0,0%

% ответа по когорте					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	0,0%	6,7%	13,3%	6,7%	0,0%
Любой пул	46,7%	53,3%	40,0%	53,3%	46,7%

33/60

# Анализ респондеров

Респондеры, ответившие на вакцину – удалены резко отличающиеся от начального уровня значения (n=8)

Все субъекты		
Респондеры	Всего	% респондеров
EBOV	19	28,4%
Пул GP 1	44	65,7%
Пул GP 2	33	49,3%
Пул GP 3	6	9,0%
Пул GP 4	4	6,0%

Ответ по пулу					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	2/12	5/13	3/14	5/13	4/15
Пул GP1	7/12	11/13	8/14	10/13	8/15
Пул GP 2	6/12	9/13	7/14	5/13	6/15
Пул GP 3	0/12	4/13	1/14	0/13	1/15
Пул GP 4	0/12	2/13	1/14	0/13	1/15

Ответ по когорте					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	2/12	5/13	3/14	5/13	4/15
Любой пул	8/12	11/13	9/14	10/13	8/15

Все субъекты		
Респондеры	Всего	% респондеров
EBOV	19	28,4%
Любой пул	46	68,7%

% ответа по пулу					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	16,7%	38,5%	21,4%	38,5%	26,7%
Пул GP 1	58,3%	84,6%	57,1%	76,9%	53,3%
Пул GP 2	50,0%	69,2%	50,0%	38,5%	40,0%
Пул GP 3	0,0%	30,8%	7,1%	0,0%	6,7%
Пул GP 4	0,0%	15,4%	7,1%	0,0%	6,7%

% ответа по когорте					
	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5
EBOV	16,7%	38,5%	21,4%	38,5%	26,7%
Любой пул	66,7%	84,6%	64,3%	76,9%	53,3%

34/60

Фиг. 34

## EBOV001 ICS

- 47 субъектов из всех когорт (1-5) включены в анализ. Когорта 5 в настоящее время недостаточно представлена.
- Анализ ICS осуществляли на начальном уровне и на неделю 14
- Для стимуляции применяют один пул пептидов EBOV, состоящий из пулов 1-4 **Описания когорт.**

Когорта	Вакцина	Плазмиды, включенные в вакцину	Схема	Путь	Доза (мг)
1	INO-4201	pGX4201	0-4-12-недель	BM	2
2	INO-4202	pGX4202	0-4-12-недель	BM	2
3	INO-4201	pGX4201	0-4-12-недель	BK	2
4	INO-4212	pGX4201 и pGX4202	0-4-12-недель	BM	4
5	INO-4212 +INO-9012	pGX4201, pGX4202, и pGX6001	0-4-12-недель	BM	4+1

35/60

Фиг. 35

# EBOV001 ICS

Анализ Вилкоксона для связанных пар выборок на основании когорты

	Когорта 1 (2-сторонний)	Когорта 2 (2-сторонний)	Когорта 3 (2-сторонний)	Когорта 4 (2-сторонний)	Когорта 5 (2-сторонний)
CD4 IFNg и TNFa	.770	.252	.695	.438	1.000
CD4 IFNg	.688	.105	.713	.063	1.000
CD4 IFNg и/или TNFa	.945	.121	.0039	.547	1.000
CD4 TNFa	.945	.301	.0078	.406	1.000
CD8 IFNg и TNFa	.770	.922	.027	.164	1.000
CD8 IFNg	.844	.133	.221	.125	1.000
CD8 IFNg и/или TNFa	.945	.695	.0010	.844	1.000
CD8 TNFa	.910	.734	.0010	.742	1.000

Оцениваемые субъекты

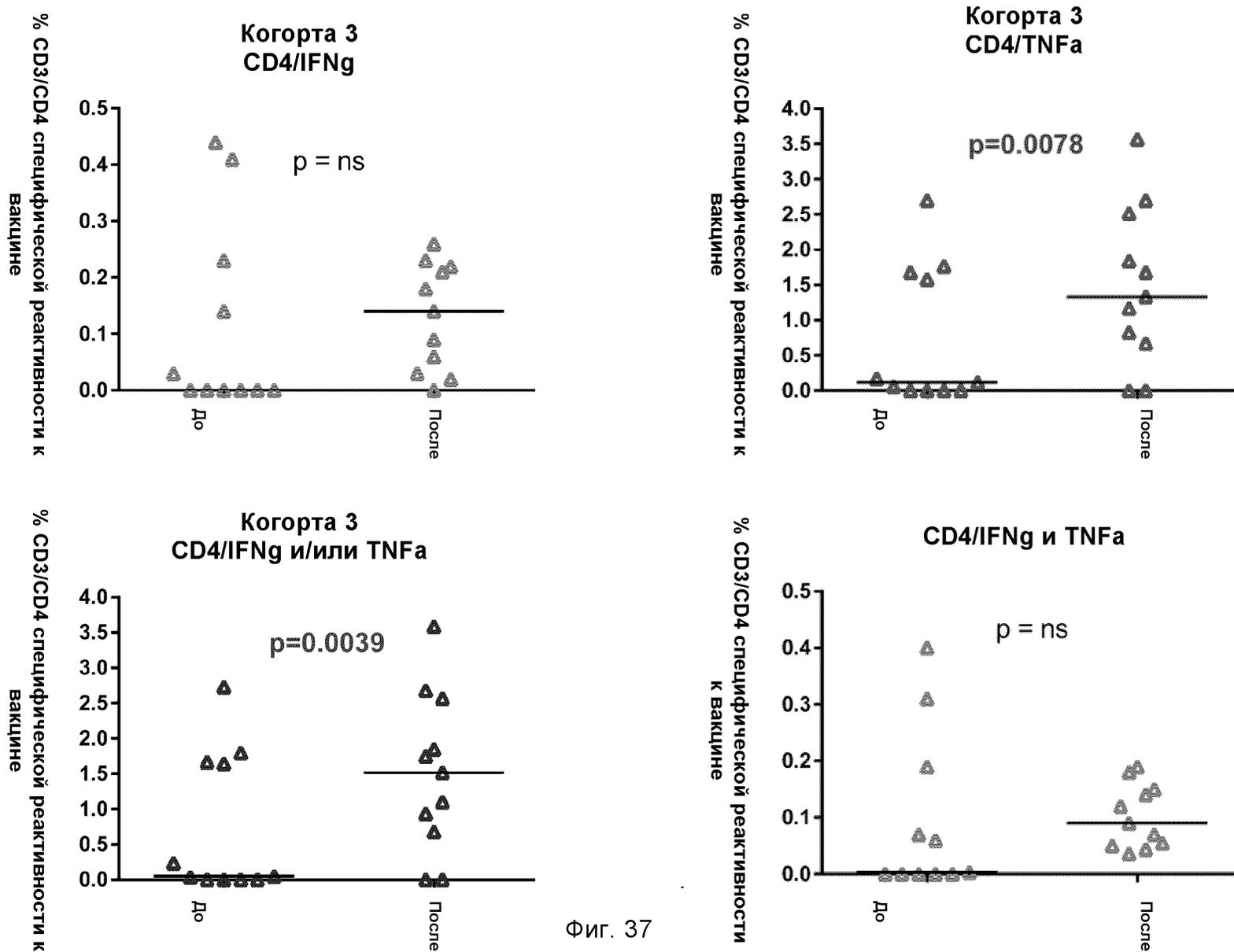
Когорта	n=
1	12
2	12
3	11
4	9
5	3

Желтый = значимый

Красный = не поддающийся  
оценке в связи с N

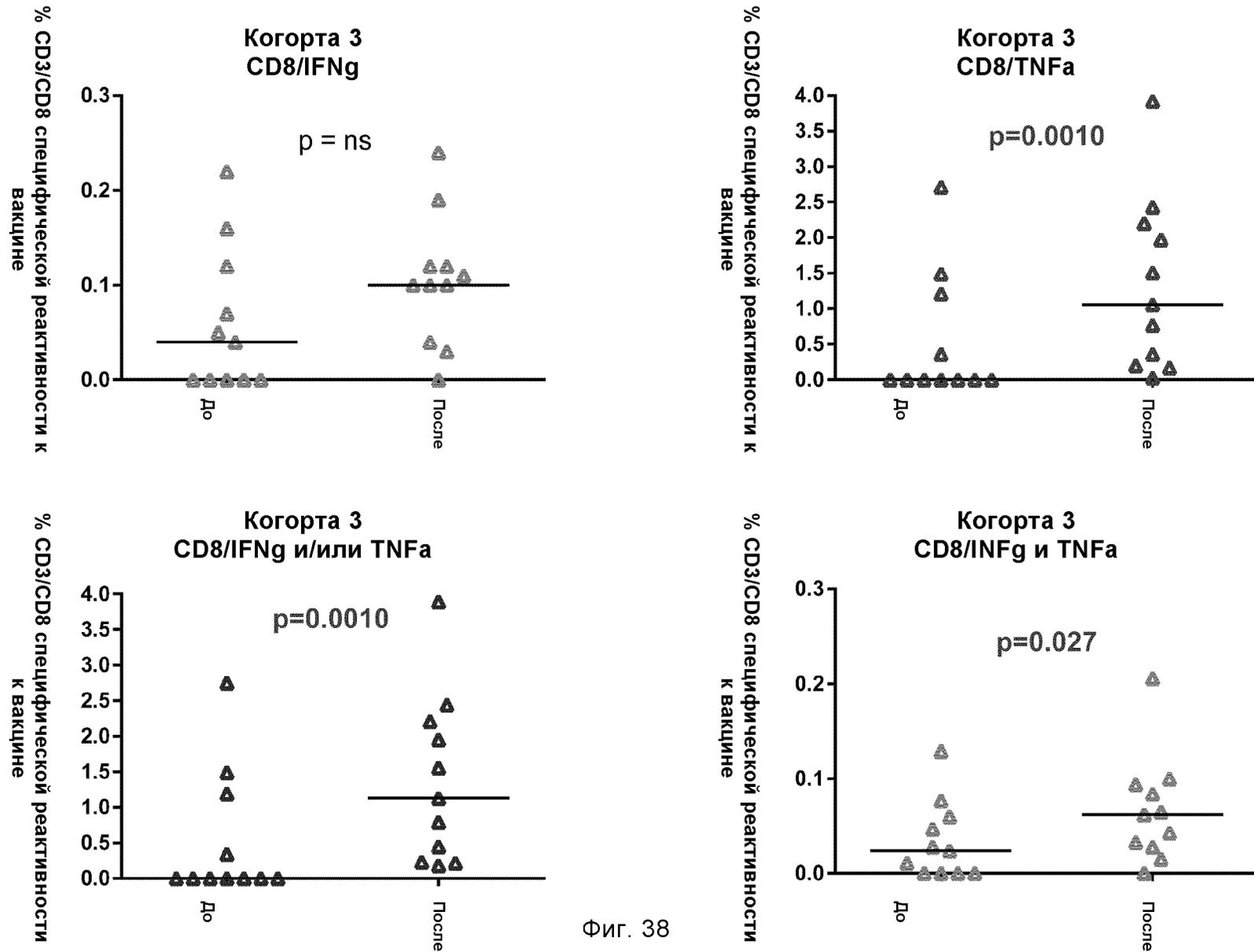
36/60

# ЕВОV001 ICS – Цитокины в CD4+ Т-клетках когорты 3 (INO4201 ВК)



Фиг. 37

# ЕВОV001 ICS – Цитокины в CD8+ Т-клетках когорты 3



Фиг. 38

## Респондеры, ответившие на вакцину: Всего (n=75) субъектов на когорту

- Респондера, ответившего на вакцину, определяют как соответствующего порогу и имеющего больше БОЕ после дня 0
- Порог = среднее + 2 x STDEV общего ответа популяции в день 0 для каждого пула

	4201-003	4201-004	4201-007	4201-008	4202-013	4202-025	4203-001	4203-006	4203-011	4203-016	4203-019	4203-020	4203-029	4203-031	4204-004
<b>Когорта</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>GP1</b>	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет
<b>GP2</b>	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет
<b>GP3</b>	Нет														
<b>GP4</b>	Нет	Нет	Нет	Нет	Н	Нет									
<b>Любой пул</b>	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет

	4201-001	4201-005	4201-010	4202-006	4202-014	4202-016	4202-020	4203-005	4203-007	4203-013	4203-018	4203-021	4203-026	4203-032	4203-035
<b>Когорта</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>GP1</b>	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет
<b>GP2</b>	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Отв.	Нет	Нет							
<b>GP3</b>	Нет	Нет	Ответ	Нет											
<b>GP4</b>	Нет														
<b>Любой пул</b>	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет

	4201-002	4201-006	4201-012	4202-007	4202-015	4202-017	4202-026	4203-003	4203-009	4203-015	4203-023	4203-024	4203-028	4203-030	4203-037
<b>Когорта</b>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>GP1</b>	Нет	Нет	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет
<b>GP2</b>	Нет	Нет	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Нет								
<b>GP3</b>	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Отв.	Нет							
<b>GP4</b>	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Отв.	Нет							
<b>Любой пул</b>	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет

39/60

Фиг. 39

## Респондеры, ответившие на вакцину: Всего (n=75) субъектов на когорту

- Респондеров, ответивших на вакцину, определяют как соответствующих порогу и имеющих больше БОЕ после дня 0
- Порог = среднее + 2 x STDEV общего ответа популяции в день 0 для каждого пула

	4201-009	4201-011	4201-014	4201-017	4202-011	4202-027	4202-028	4202-030	4202-031	4203-014	4203-017	4203-040	4203-042	4203-043
<b>Когорта</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>GP1</b>	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет
<b>GP2</b>	Ответ	Нет	Нет	Отв.	Нет	Ответ	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет
<b>GP3</b>	Нет	Нет	Нет	Отв.	Нет	Нет	Отв.	Нет						
<b>P4</b>	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Отв.	Нет						
<b>Любой пул</b>	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет

	4201-018	4201-019	4201-020	4201-021	4201-022	4202-023	4202-024	4202-033	4203-034	4203-044	4203-045	4203-046	4203-047	4203-049	4203-050
<b>Когорта</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>GP1</b>	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Ответ
<b>GP2</b>	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
<b>GP3</b>	Нет														
<b>P4</b>	Нет														
<b>Любой пул</b>	Ответ	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Ответ	Нет	Нет	Ответ	Нет	Нет	Нет	Ответ	Нет	Ответ

40/60

Фиг. 40

## Медианные ответы по когорте и пулу (n=75)

Когорта	Медианный ответ согласно ELISpot					Все субъекты
	1	2	3	4	5	
Вазовый уровень EBOV	26.7	25.0	20.8	27.9	13.3	21.7
<b>EBOV-Нед. 2</b>	33.3	8.3	20.0	21.7	15.0	19.2
<b>EBOV-Нед. 6</b>	60.0	83.3	133.3	102.5	90.8	83.3
<b>EBOV-Нед. 14</b>	58.3	75.4	77.5	105.8	58.3	77.5
Пул GP 1-базовый уровень	6.7	3.3	5.0	6.3	1.7	4.2
<b>Пул GP 1-Нед. 2</b>	6.7	3.3	5.0	3.3	1.7	5.0
<b>Пул GP 1-Нед. 6</b>	17.5	30.0	23.3	25.8	13.3	23.3
<b>Пул GP 1-Нед. 14</b>	28.3	18.3	23.3	29.2	23.3	25.0
Пул GP 2-базовый уровень	6.7	3.3	3.3	10.8	3.3	6.3
<b>Пул GP 2-Нед. 2</b>	0.8	3.3	3.3	9.2	3.3	5.0
<b>Пул GP 2-Нед. 6</b>	11.7	30.0	28.3	21.7	15.8	18.3
<b>Пул GP 2-Нед. 14</b>	13.3	18.3	16.7	23.3	16.7	19.2
Пул GP 3-базовый уровень	0.0	5.0	0.0	3.3	3.3	3.3
<b>Пул GP 3-Нед. 2</b>	3.3	0.0	3.3	3.3	1.7	2.5
<b>Пул GP 3-Нед. 6</b>	5.0	16.7	10.0	8.3	1.7	8.3
<b>Пул GP 3-Нед. 14</b>	3.3	5.0	10.0	12.5	1.7	5.8
Пул GP 4-базовый уровень	1.7	6.7	5.0	5.8	1.7	3.3
<b>Пул GP 4-Нед. 2</b>	5.0	3.3	8.3	5.0	5.0	5.0
<b>Пул GP 4-Нед. 6</b>	8.3	29.2	36.7	30.0	19.2	21.7
<b>Пул GP 4-Нед. 14</b>	21.7	14.2	31.7	26.7	13.3	21.7

Ответ на EBOV = обобщенный ответ пулов 1-4

Фиг. 41

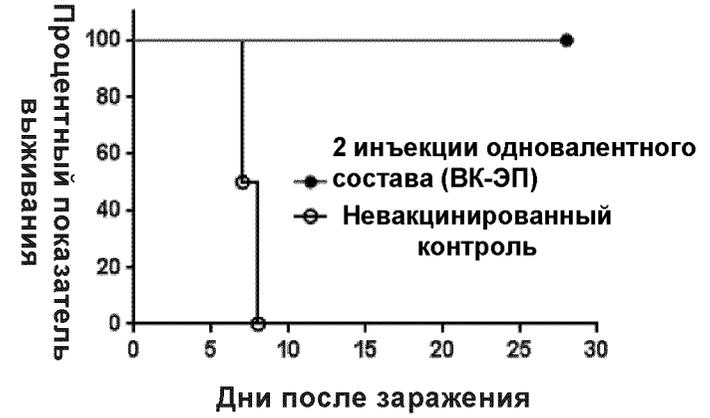
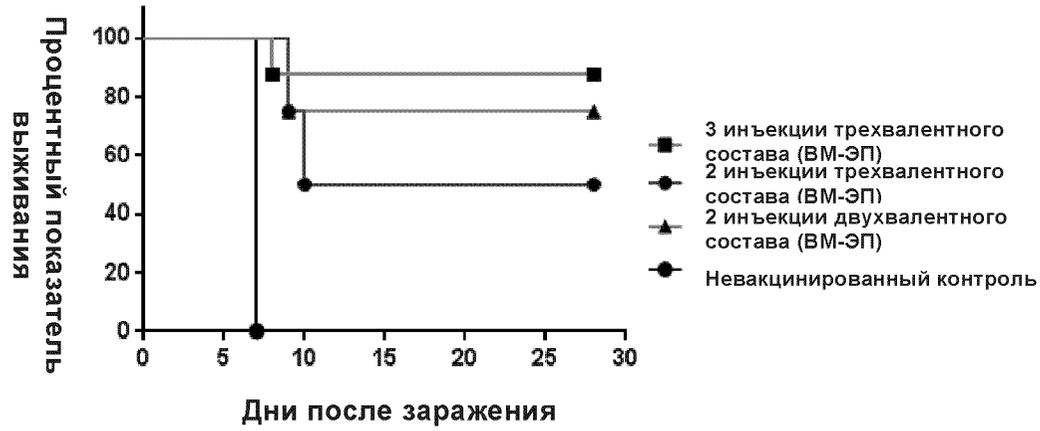
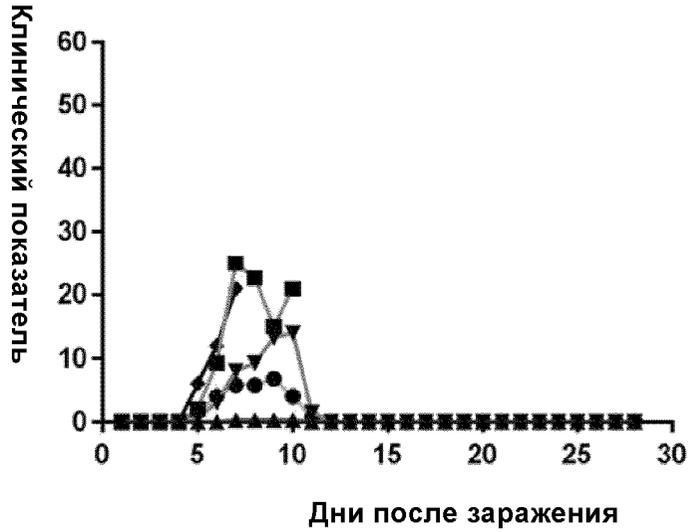
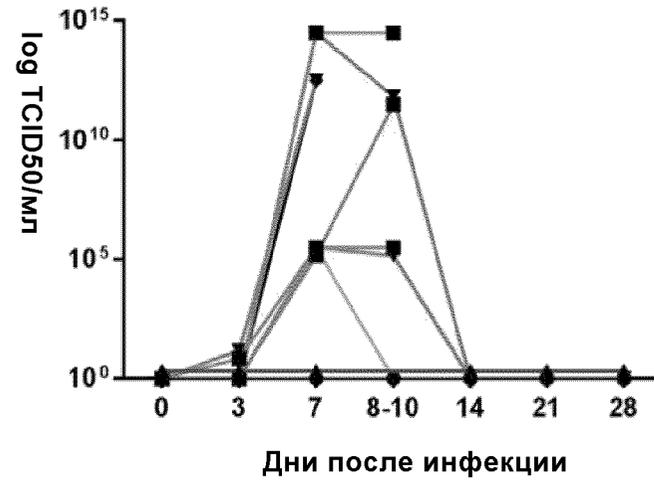
## Средние ответы по когорте и пулу (n=75)

Когорта	Медианный ответ согласно ELISpot					Все субъекты
	1	2	3	4	5	
Вазовый уровень EBOV	124.6	116.3	85.6	148.9	44.6	103.4
EBOV-Нед. 2	112.5	66.9	158.7	154.1	41.7	107.2
EBOV-Нед. 6	147.1	206.0	295.3	291.3	88.3	203.5
EBOV-Нед. 14	128.3	121.8	160.6	280.1	128.1	163.9
Пул GP 1-базовый уровень	17.9	8.9	5.8	7.2	2.7	8.5
Пул GP 1-Нед. 2	21.9	6.0	8.4	11.4	3.1	10.3
Пул GP 1-Нед. 6	29.4	62.4	22.1	47.1	24.0	37.5
Пул GP 1-Нед. 14	38.7	33.8	25.3	69.6	31.7	40.3
Пул GP 2-базовый уровень	8.8	17.4	9.2	18.5	5.8	11.8
Пул GP 2-Нед. 2	4.2	20.7	9.8	23.7	6.6	12.6
Пул GP 2-Нед. 6	26.4	52.7	27.8	40.2	26.2	34.9
Пул GP 2-Нед. 14	24.0	31.0	21.9	58.7	53.4	37.8
Пул GP 3-базовый уровень	27.8	8.2	26.6	44.8	12.0	23.6
Пул GP 3-Нед. 2	21.1	15.0	46.6	43.6	13.4	28.1
Пул GP 3-Нед. 6	25.0	35.5	80.5	66.0	5.2	41.6
Пул GP 3-Нед. 14	19.1	27.2	36.1	60.6	6.7	30.0
Пул GP 4-базовый уровень	69.9	81.8	44.1	78.4	24.1	59.4
Пул GP 4-Нед. 2	65.3	25.2	93.9	75.4	18.6	56.2
Пул GP 4-Нед. 6	66.2	55.4	164.9	137.9	32.9	89.6
Пул GP 4-Нед. 14	46.6	29.9	77.2	91.2	36.3	55.8

Ответ на EBOV = обобщенный ответ пулов 1-4

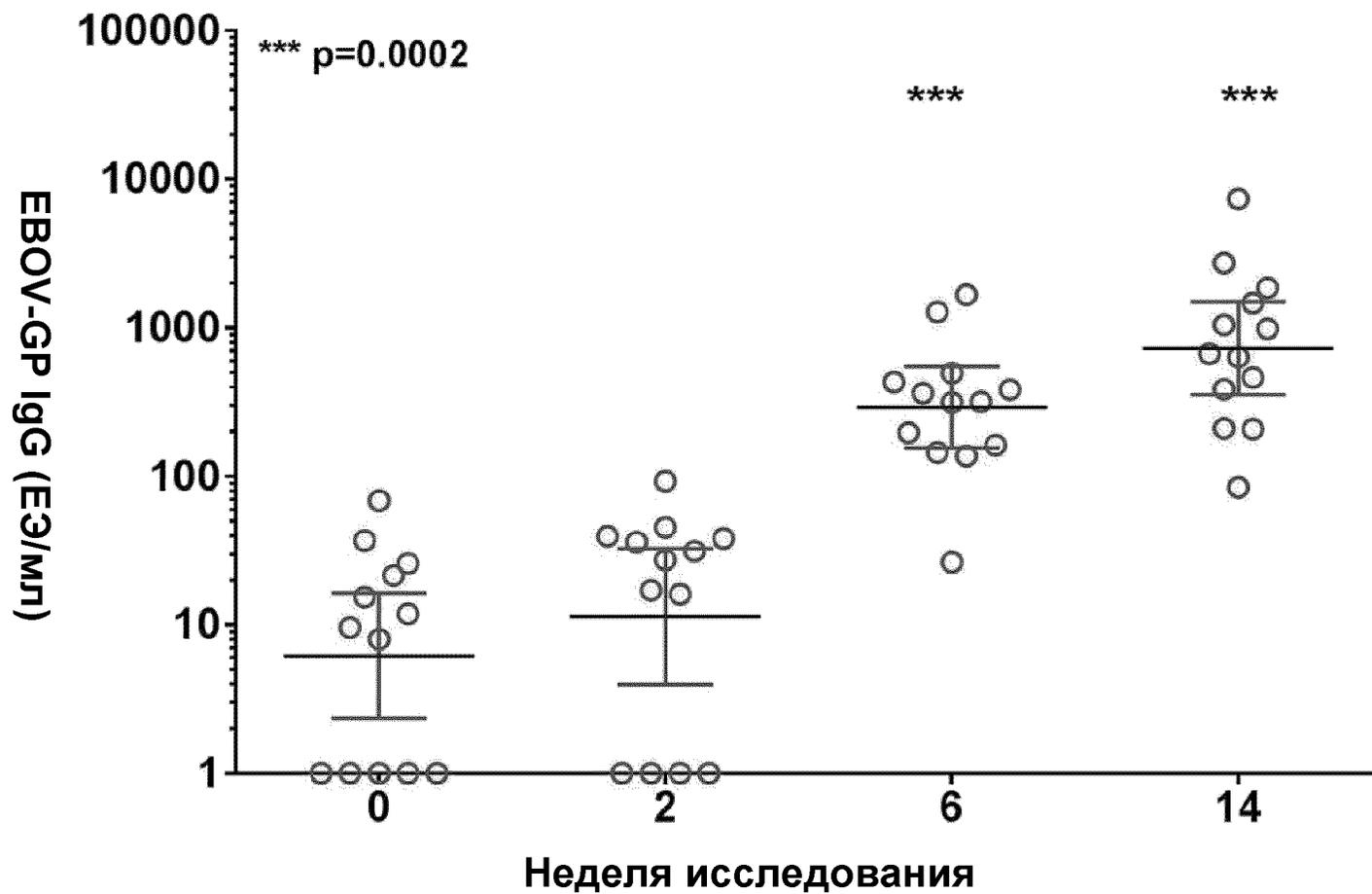
Фиг. 42



**A****B****C**

44/60

Фиг. 44А - 44С

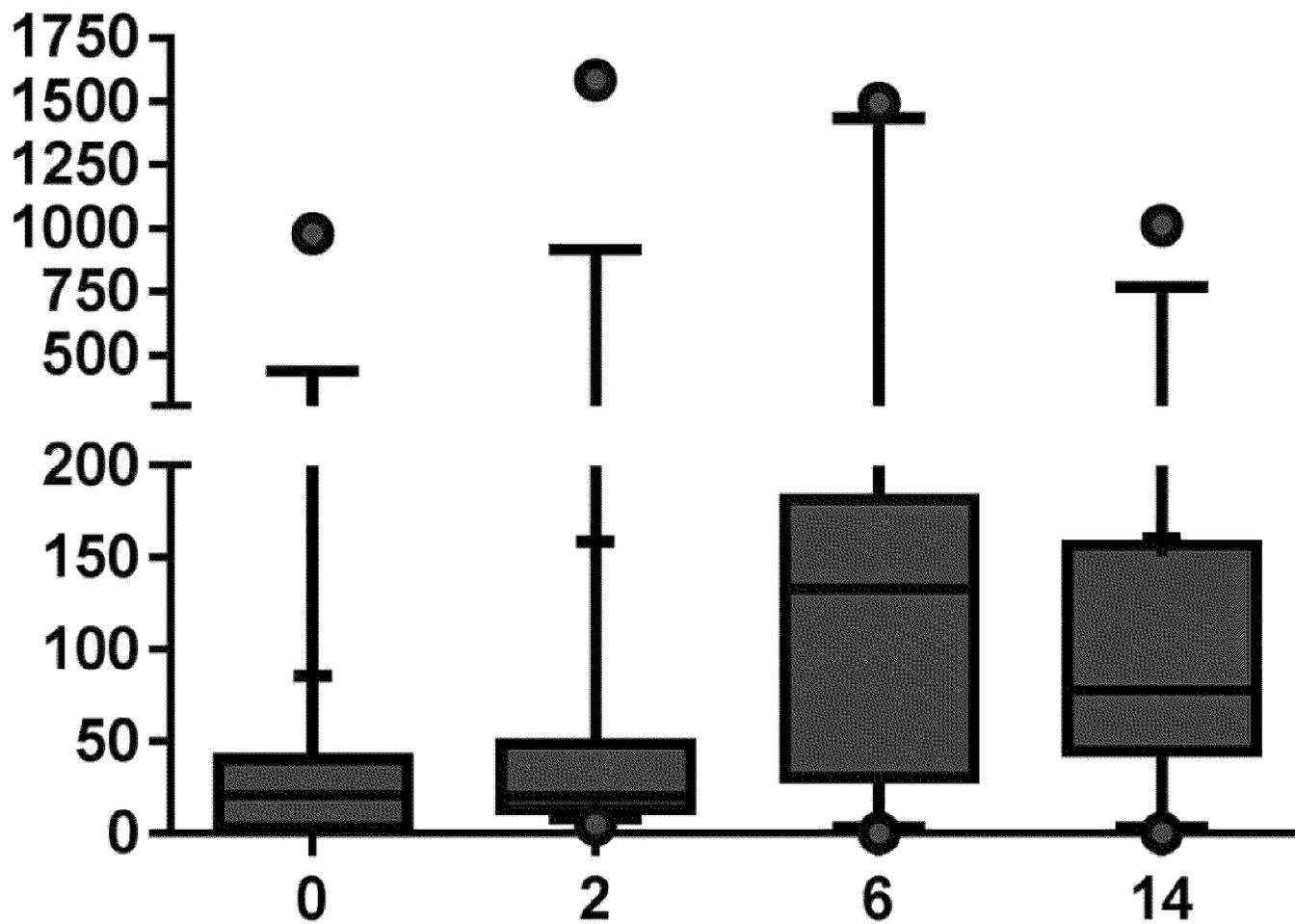


45/60

	ЕВОV-GP IgG (ЕЭ/мл)
ЕЭ/мл в неделю 2 (диапазон)	11,4 (1-68,7)
ЕЭ/мл в неделю 6 (диапазон)	290,8 (1-92,5)
ЕЭ/мл в неделю 14 (диапазон)	726,6 (84,3-7379,4)

Фиг. 45

ЕВОУ-GR-специфические БОЕ на  $10^6$  РВМС



46/60

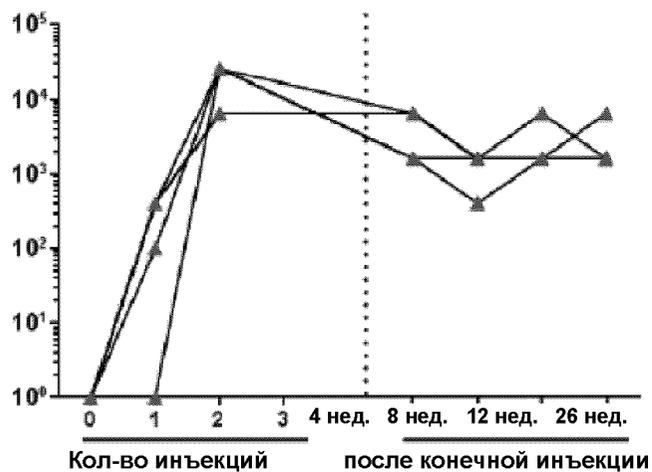
Неделя исследования

Фиг. 46

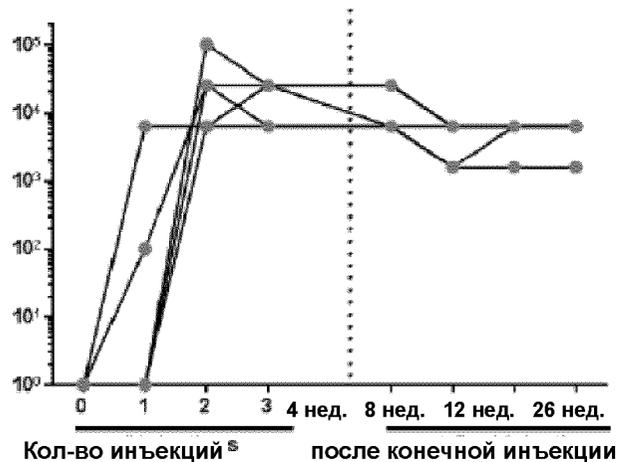
## Длительная иммуногенность с составами ДНК-вакцин против GP Эбола у ННР

### Общий титр GP-специфических IgG

Двухвалентный состав GP ДНК, 2 инъекции ВМ



Трехвалентный состав GP ДНК, 3 инъекции ВМ



Сильные ответы антител более чем через 6 месяцев после вакцинации

Фиг. 47

## Исследование вторичного иммунного ответа с ДНК-вакциной EBOV GP: ВМ доставка

Группа	Вакцина	Конструкции	Схема	n	Доза
1	Трехвалентная	PGX4201 + pGX4202 + pGX4203 + опт. IL-12 (pGX6006)	0-4-8 (3 инъекции)	5	3 мг + 3 мг + 3 мг + 0,2 мг
2	Трехвалентная	pGX4201 (более ранняя констр.) + pGX4202 (Guinea-GP) + pGX4203 [новая констр.] + opt IL-12 (pGX6006)	0-4 (2 инъекции)	5	3 мг + 3 мг + 3 мг + 0,2 мг
3	Двухвалентная	pGX4201 + pGX4202 + опт. IL-12 (pGX6006)	0-4 (2 инъекции)	5	4,5 мг + 4.5 мг + 0,2 мг
4	Трехвалентная	pGX4201 + pGX4202 + PGX4203 + опт. IL-12 (pGX6006)	0 (1 инъекция)	5	3 мг + 3 мг + 3 мг + 0,2 мг

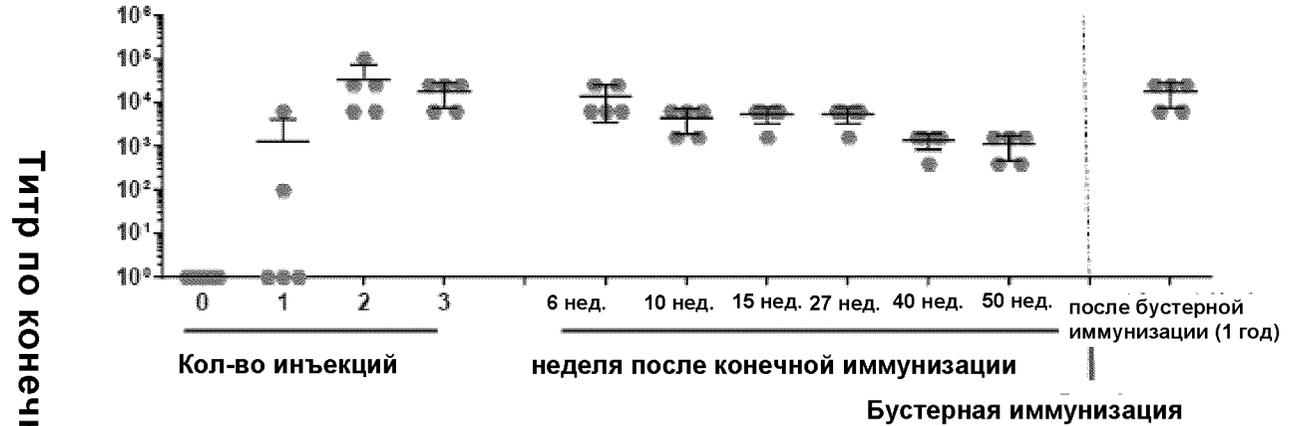


- иммунизированные животные янв.-мар. 2016 года
- последующие иммунные ответы наблюдались в течение 12 месяцев после конечной дозы
- обеспечение бустерной иммунизации по прошествии 1 года Февраль 2017

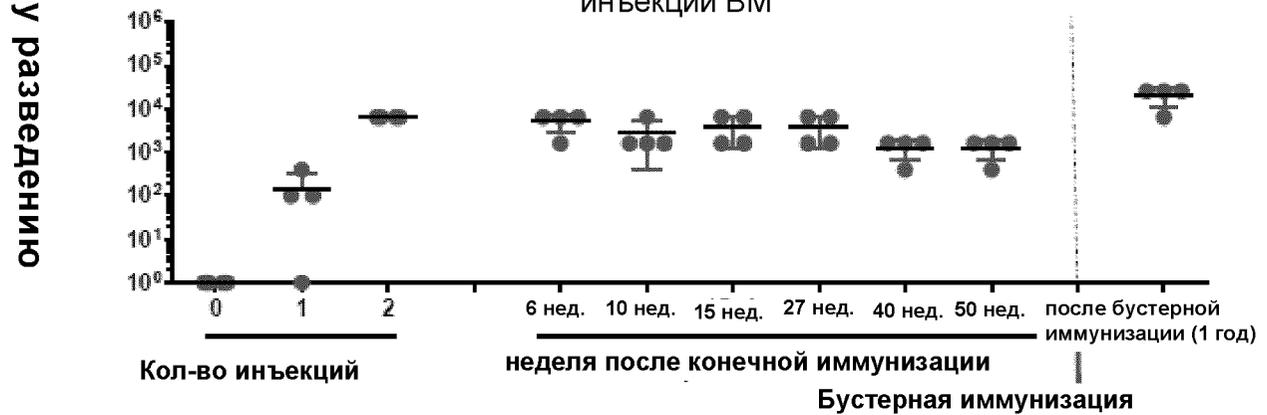
Фиг. 48

# Общие конечные титры IgG

Трехвалентный состав GP ДНК, 3 инъекции ВМ



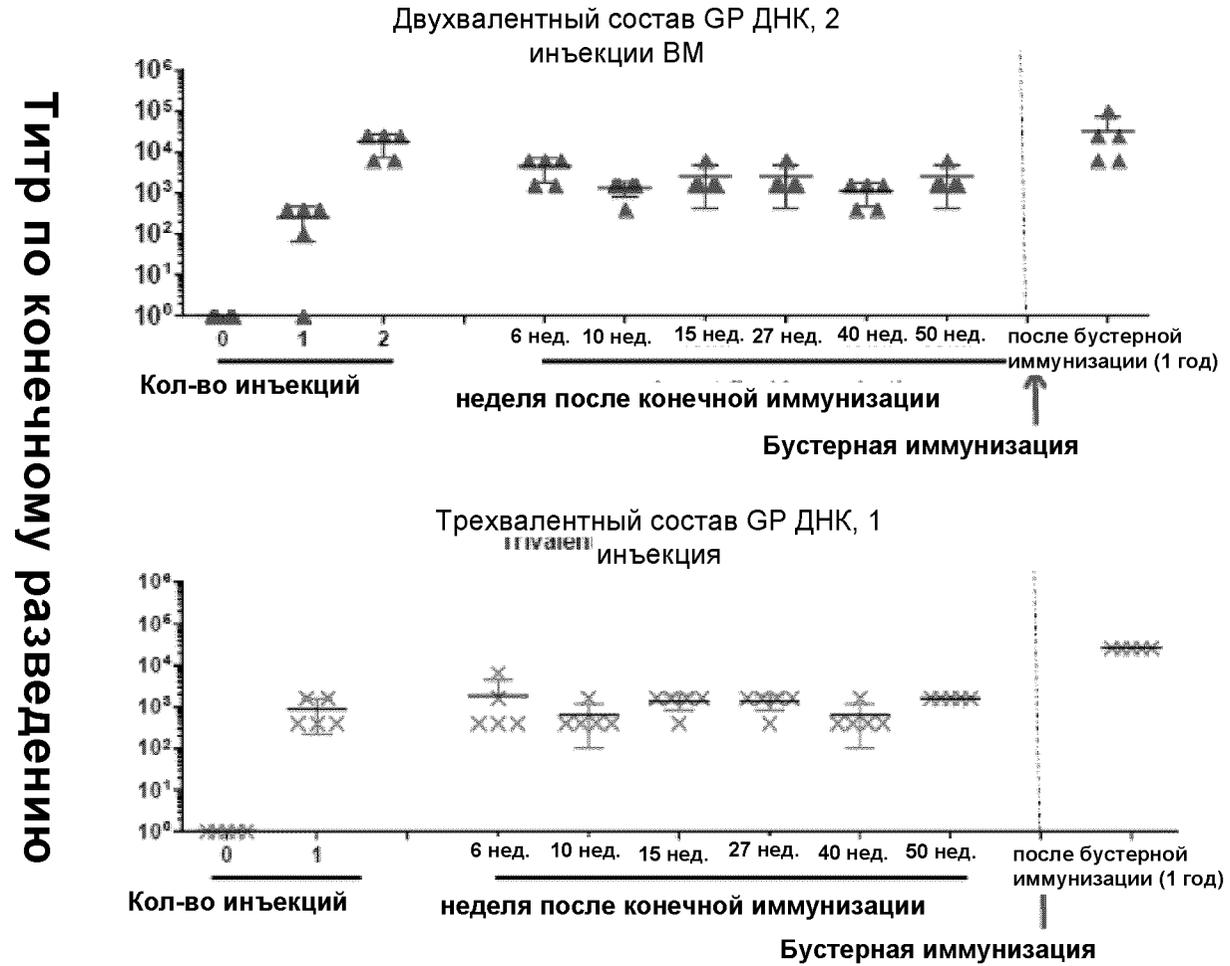
Трехвалентный состав GP ДНК, 2 инъекции ВМ



Повышение общих ответов антител IgG после бустерной иммунизации по прошествии 1 года

Фиг. 49

## Общие конечные титры IgG



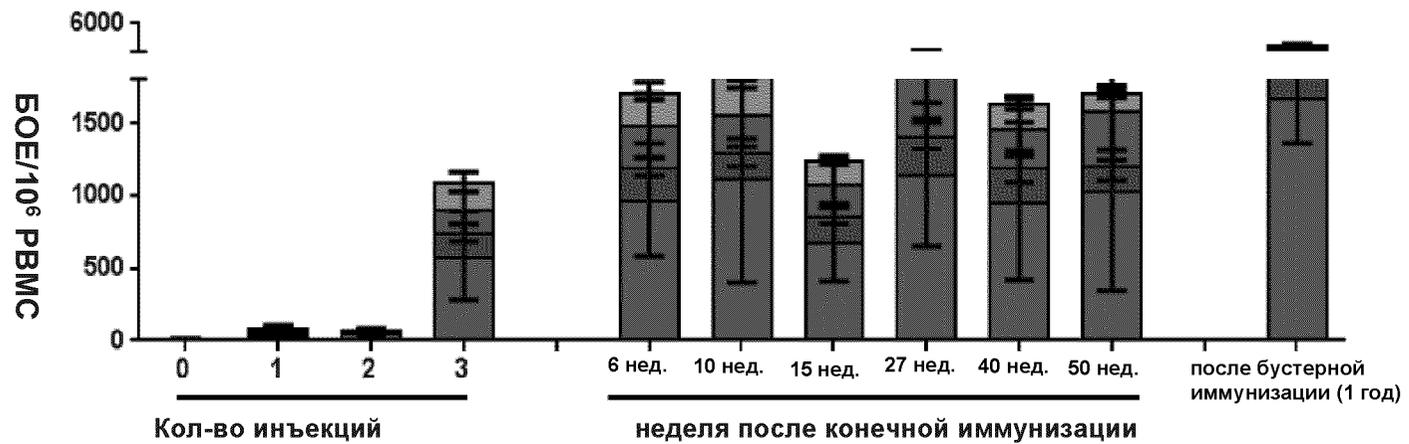
50/60

Повышение ответов суммарных антител IgG после бустерной иммунизации по прошествии 1 года

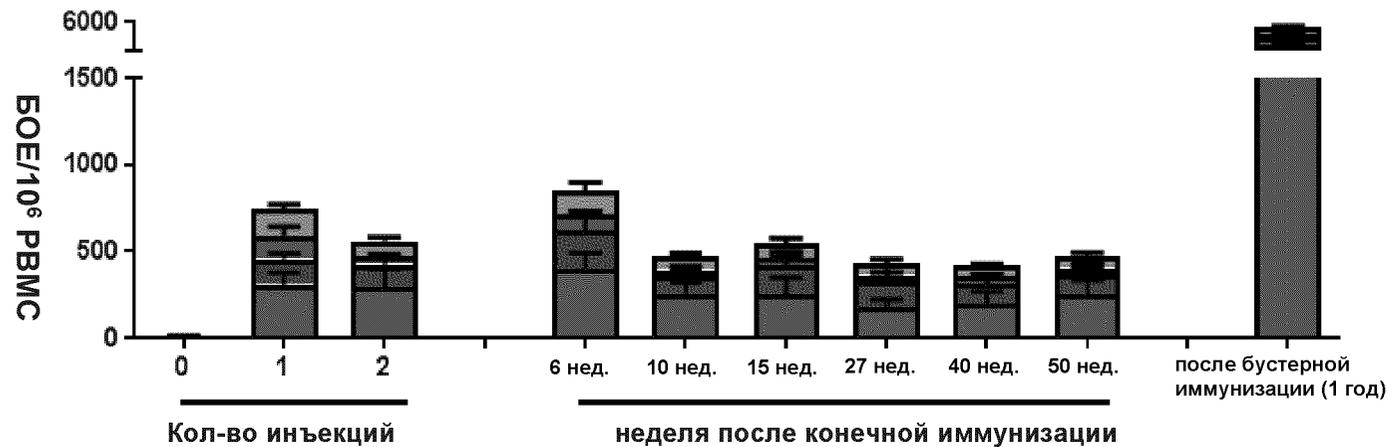
Фиг. 50

# ELISPOT

## Трехвалентный состав GP ДНК 3 инъекции ВМ-ЭП



## Трехвалентная GP ДНК-вакцина - 2 инъекции ВМ-ЭП



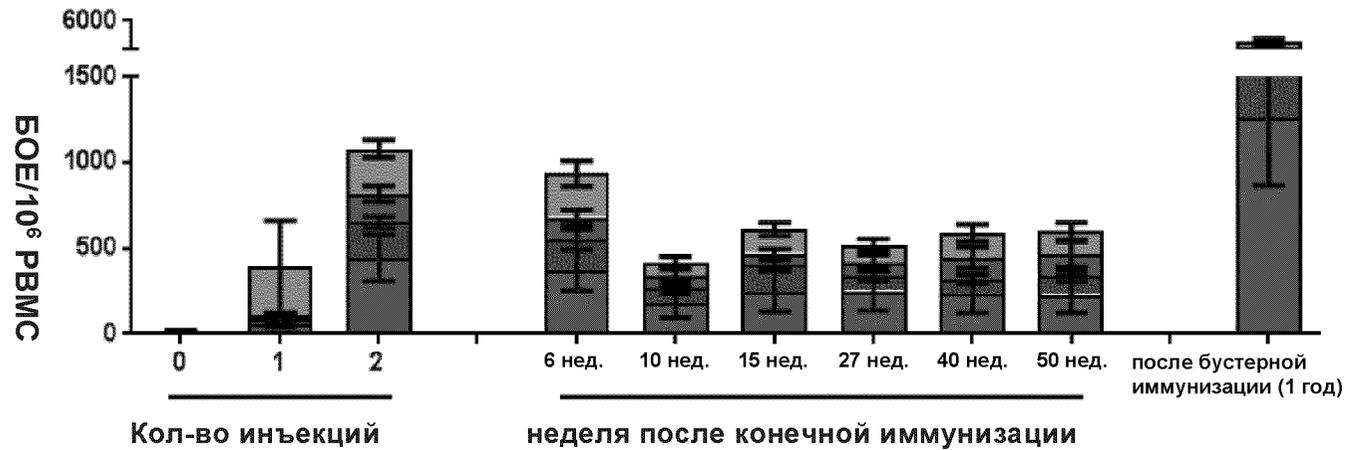
51/60

Повышение ответов IFN $\gamma$  ELISPOT после бустерной иммунизации по прошествии 1 года. Величина бустерной иммунизации была не такой высокой в группе, получавшей 3 инъекции.

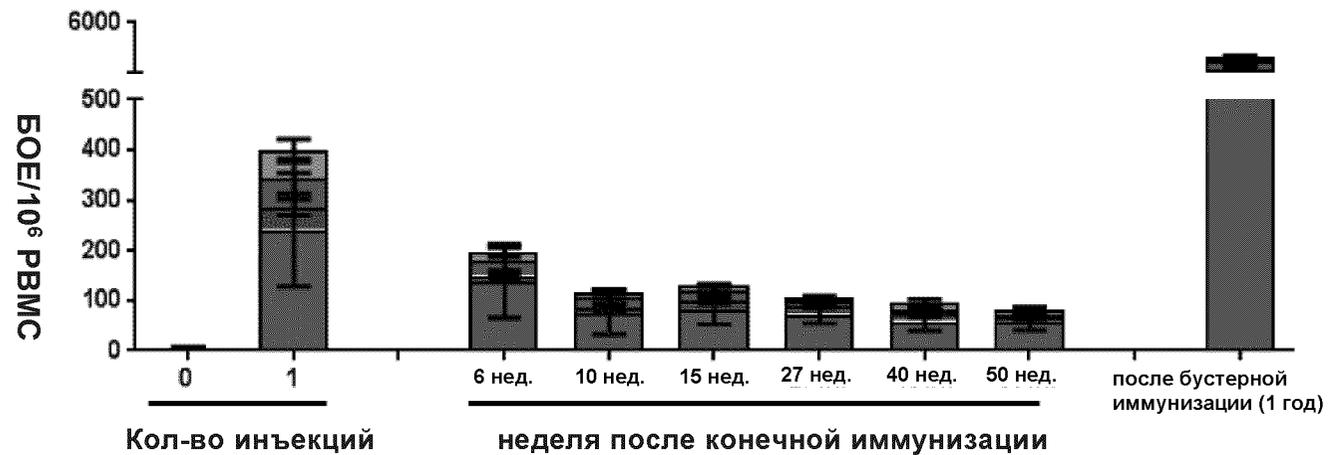
Фиг. 51

## ELISPOT

### Двухвалентный состав GR ДНК 2 инъекции ВМ-ЭП



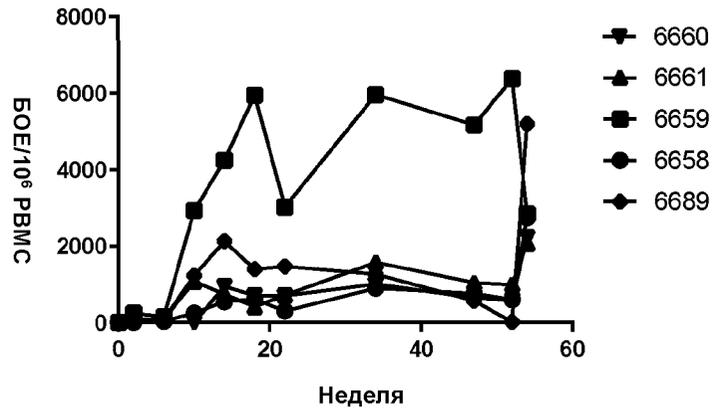
### Трехвалентный состав GR ДНК 1 инъекция ВМ-ЭП



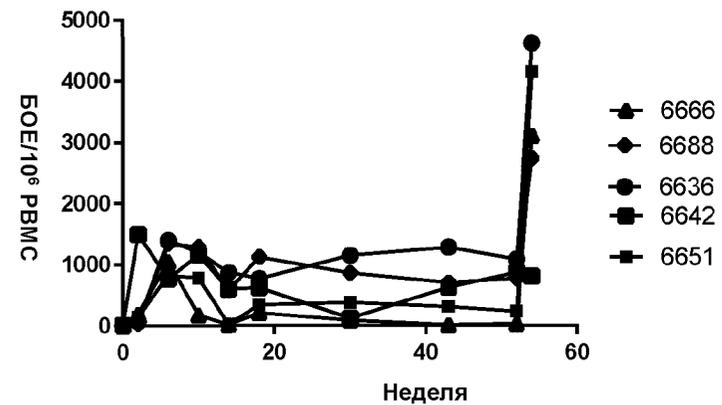
Повышение ответов IFN $\gamma$  ELISPOT после бустерной иммунизации по прошествии 1 года. Удивительно высокая бустерная иммунизация в группе с одной иммунизацией.

Фиг. 52

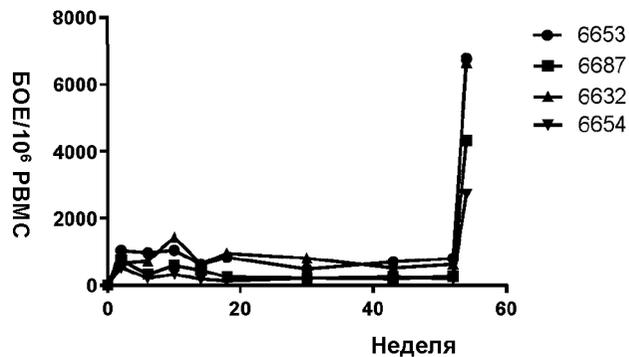
Трехвалентный состав GR ДНК 3 инъекции VM-ЭП



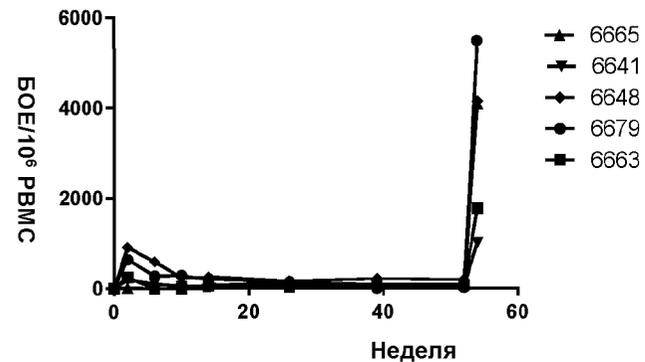
Трехвалентный состав GR ДНК 2 инъекции VM-ЭП



Двухвалентный состав GR ДНК 2 инъекции VM-ЭП



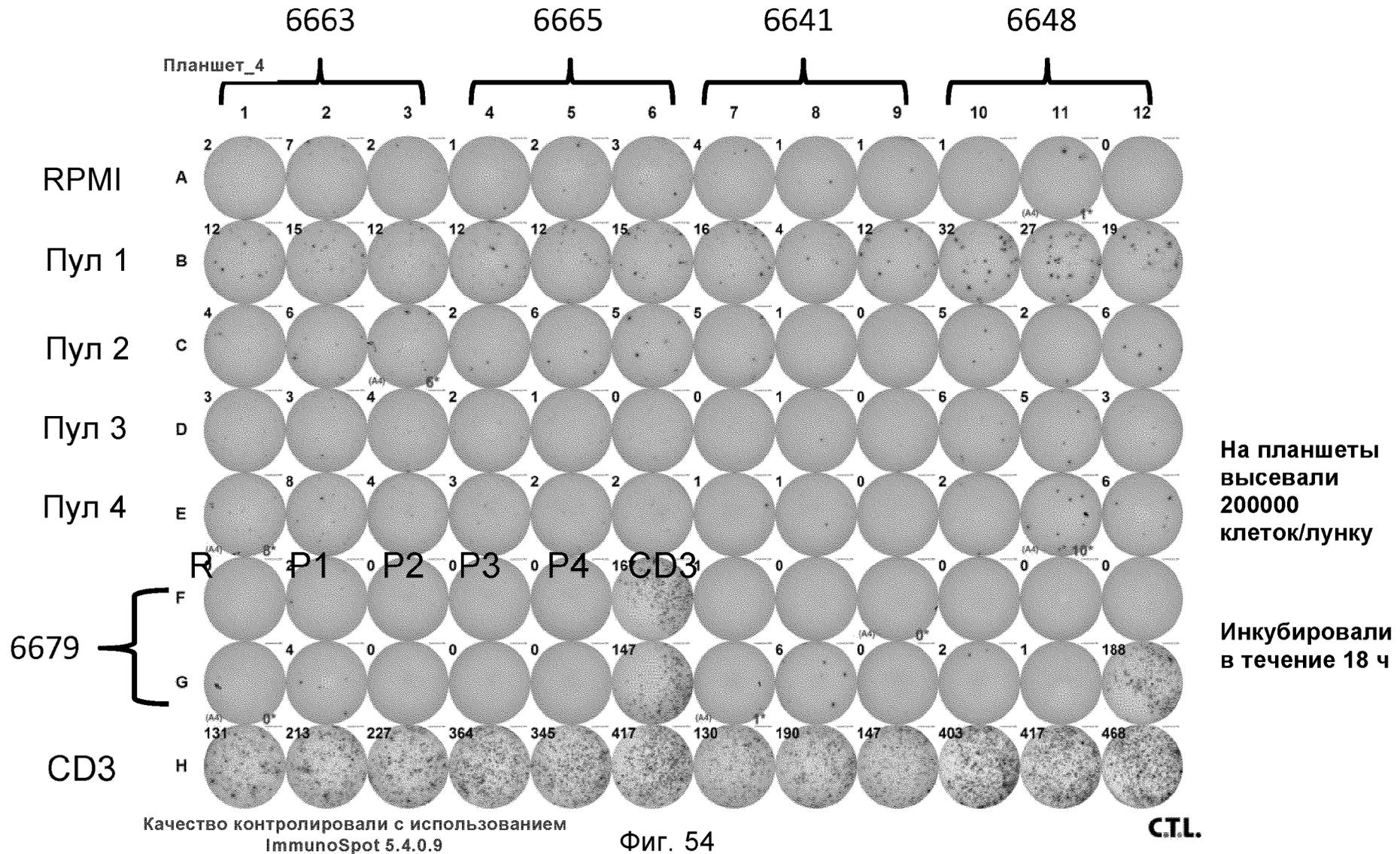
Трехвалентный состав GR ДНК 1 инъекция VM-ЭП



- У 17/19 животных наблюдались повышенные Т-клеточные ответы после бустерной иммунизации.
- У 1/19 животных сохранялся тот же уровень Т-клеточных ответов.
- У 1/19 животных наблюдались ухудшенные Т-клеточные ответы после бустерной иммунизации. Это было животное, значения которого были неизменно высокими за последний год в группе, получавшей 3 инъекции.

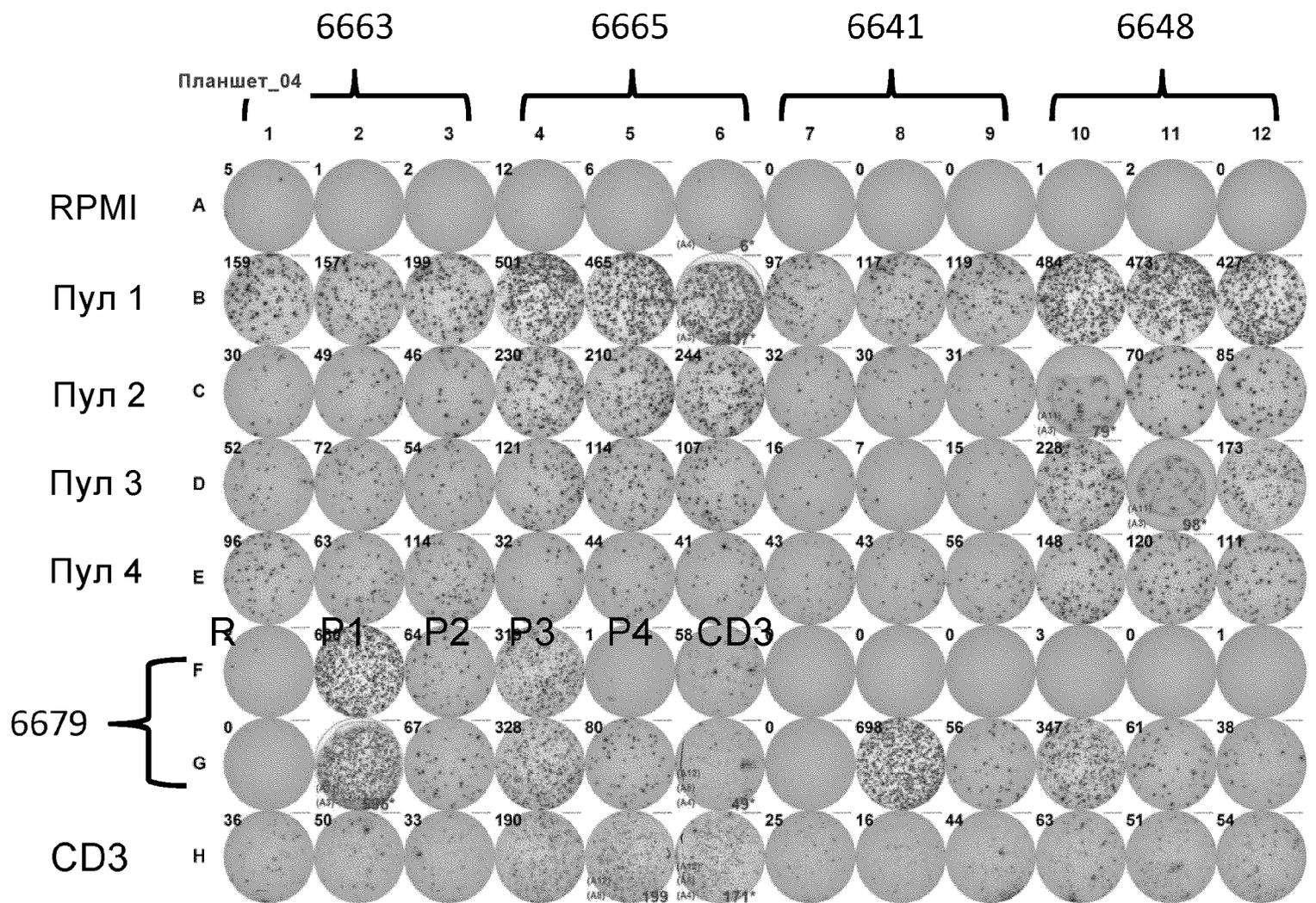
Фиг. 53

# Пример: Однократная иммунизация IFN $\gamma$ ELISPOT – момент времени 12 месяцев (до конечной бустерной иммунизации)



54/60

# Пример: Однократная иммунизация IFN $\gamma$ ELISPOT После бустерной иммунизации по прошествии 1 года



На планшеты  
высевали  
200000  
клеток/лунку  
Инкубировал  
и в течение 18  
ч

(тот же запас  
пептидов, что и в  
предыдущем  
опыте.  
Применяли  
новую пробирку  
CD3, вследствие  
чего он может  
быть ниже)

55/60

Качество контролировали с использованием  
ImmunoSpot 5.4.0.9

Фиг. 55

CTL.

## Обобщенные результаты – длительный вторичный иммунный ответ

- Вакцина EBOV-GP ДНК обеспечивает длительные иммунные ответы
- Сильный ответ после бустерной иммунизации по прошествии 1 года
  - Этот ответ удивительно высок в группе, которая получала однократную VM инъекцию
- Следующие стадии: исследование вторичного иммунного ответа с внутрикожной доставкой
  - Работа над обеспечением безопасности слота контрольного заражения для этого исследования

## **EVOV-001: Клиническое испытание ДНК-вакцины INO-4212**

- В начальном исследовании приняли участие 75 здоровых добровольцев в 5 когортах
- 3-дозовая схема (недели 0, 4,12)
- стабильный при 2-8 °С состав вакцины: Не требует холодной цепи с замораживанием
- стабильность в течение 1 года при комнатной температуре (25 °С)

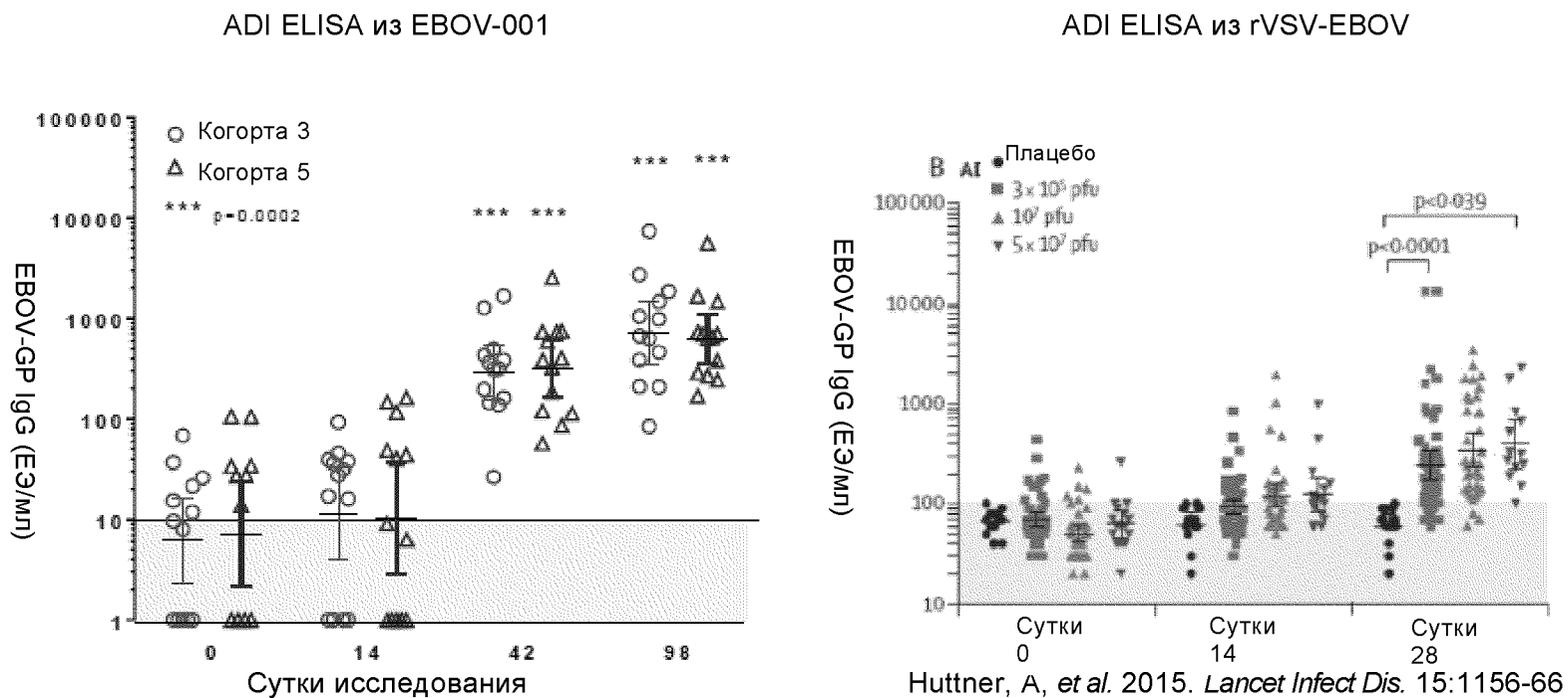
### **Описания когорт**

<b>Когорта</b>	<b>Вакцина</b>		<b>Схема вакц. (Недели)</b>	<b>№ Добровольцы (фактические)</b>	<b>Вакц. Путь</b>	<b>Доза</b>
<b>1</b>	<b>INO-4201</b>	Консенсус Pre-2014	<b>0-4-12</b>	<b>15 (14)</b>	<b>ВМ</b>	<b>2 мг</b>
<b>2</b>	<b>INO-4202</b>	2014 Guinea	<b>0-4-12</b>	<b>15 (15)</b>	<b>ВМ</b>	<b>2 мг</b>
<b>3</b>	<b>INO-4201</b>	Консенсус Pre-2014	<b>0-4-12</b>	<b>15 (13)</b>	<b>ВК</b>	<b>2 мг</b>
<b>4</b>	<b>INO-4212</b>	(4201 + 4202)	<b>0-4-12</b>	<b>15 (14)</b>	<b>ВМ</b>	<b>4 мг</b>
<b>5</b>	<b>INO-4212 + INO-9012</b>	4212 +IL-12 человека	<b>0-4-12</b>	<b>15 (14)</b>	<b>ВМ</b>	<b>4 мг + 1 мг</b>

Фиг. 57

## Сравнение связывающих антител в EBOV-001 к rVSV EBOV.

Во всех 5 когортах EBOV-001 наблюдались значительные повышения как в неделю 6, так и в неделю 14 по сравнению с неделями 0



		Сутки 42	Сутки 98
Когорта 3	INO-4201 ID	290.8	726.6
Когорта 5	INO-4212 + IL12 IM	320.6	629.6

	Сутки 28
$3 \times 10^5$ PFU	241.4
$1 \times 10^7$ PFU	342.3
$5 \times 10^7$ PFU	392.8

Фиг. 58

## EBOV-001: Когорты расширения ВК доставки

На основании наблюдаемой сероконверсии в когорте 3 (ВК доставка) были добавлены 6 дополнительных когорт ВК для исследования различных доз, схем дозирования и влияния ДНК IL-12 в качестве иммуноадьюванта

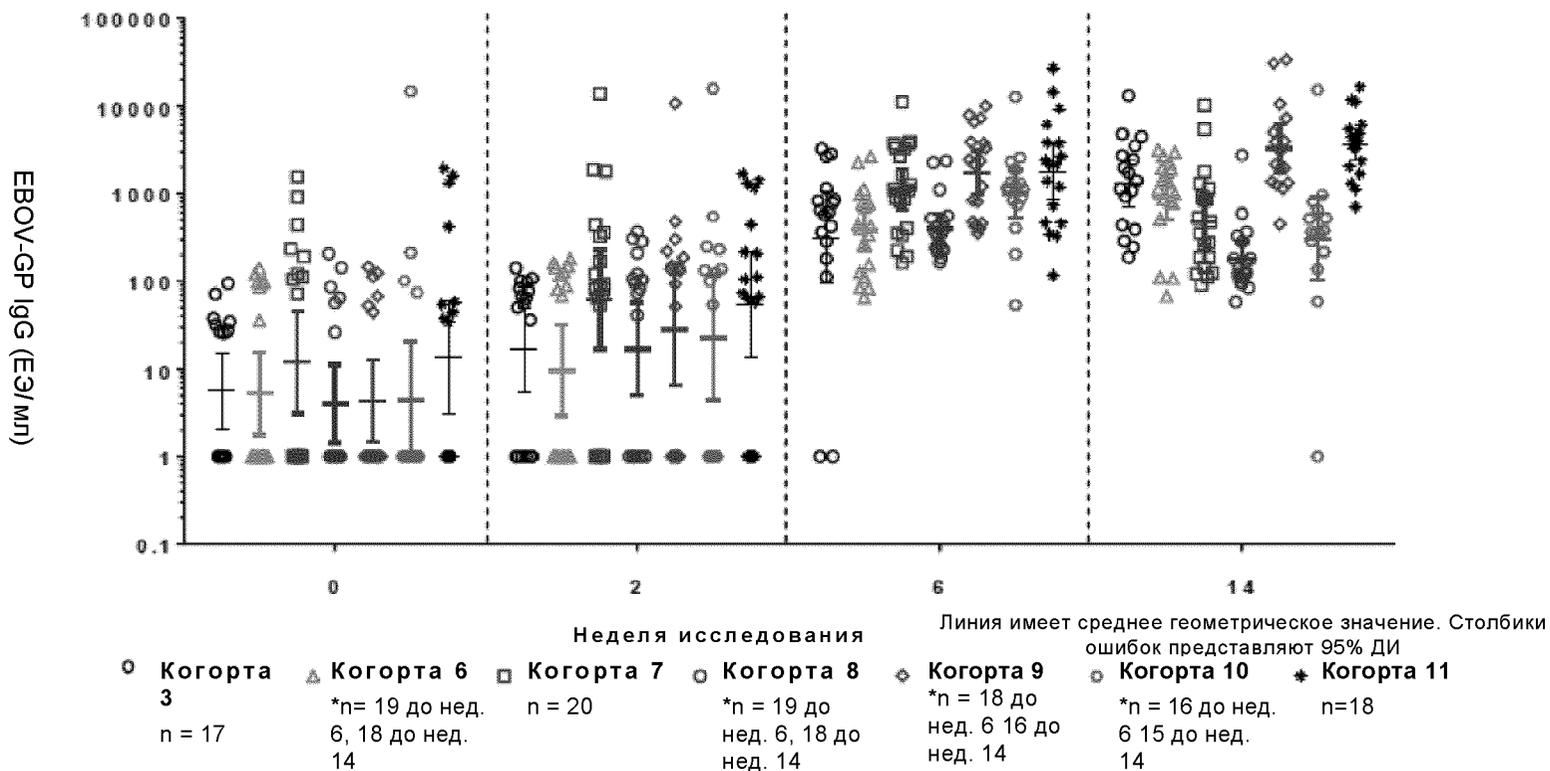
Когорта	Вакцина	Схема дозирования (недели)	Кол-во добровольцев	Вакц. Путь	Доза (мг)
1	INO-4201	0-4-12	15	ВМ	2
2	INO-4 202	0-4-12	15	ВМ	2
3	INO-4201	0-4-12	20*	ВК	2
4	INO-4212	0-4-12	15	ВМ	4
5	INO-4212 + INO-9012	0-4-12	15	ВМ	4 + 1
6	INO-4201	0-4-12	20	ВК	1
7	INO-4201	0-4	20	ВК	2
8	INO-4201	0-4	20	ВК	1
9	INO-4201 + INO-9012	0-4-12	20	ВК	1,6 + 0,4
10	INO-4201 + INO-9012	0-4	20	ВК	1,6 + 0,4
11	INO-4201 + INO-9012	0-4-12	20	ВК	0,8 + 0,2
		ВСЕГО	200		

\* Часть 2 включала дополнительно 5 субъектов, которые будут зачислены в когорту 5

Фиг. 59

# когорты ВК до недели 14

ADI ELISA - Отсутствие вычитания базовой линии



\* 5 субъектов в когортах 6-11 отзывали согласие в исслед. до 14 недели

Когорта	3	6	7	8	9	10	11
Вакцина	INO-4201	INO-4201	INO-4201	INO-4201	INO-4201 + INO-9012	INO-4201 + INO-9012	INO-4201 + INO-9012
Схема (недели)	0-4-12	0-4-12	0-4	0-4	0-4-12	0-4	0-4-12
Путь	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
D(мг)	2	1	2	1	1.6 + 0.4	1.6 + 0.4	0.8 + 0.2

**Все ВК когорты; серореактивность PD2 у 125/127 (98,4%)**

60/60

Фиг. 60

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202392207**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:  
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

A61K 35/76, A61K 48/00, A61K 39/12, A61P 31/14, A61P 37/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US20150335726 A1 (WEINER et al), 26.11.2015 п-фы 0009, 0010, 0011, 0013-0015, 0051, 0116, 0126; SEQ ID NO: 1.	1-15
Y	US20160045589 A1 (WEINER et al), 18.02.2016 п-фы 0015, 0140	1-15
Y	GenBank: LG017609.1. 2034 bp DNA linear PAT 07-JAN-2016	1-15
A	JP4198148 B2(US HEALTH), 17.12.2008 стр. 1-3	1-15
A	EP 2484770 B1 (CUREVAC GMBH) 2015-03-04 п-фы 00691,0178,0179	1-15
A	US 9133483 B2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2015-09-15 реферат, стр.28,35,47-49	
A	WU OU et al. Induction of immune responses against multiple species of Ebola virus using DNA and retroviral-based virus-like particles bearing the envelope glycoprotein of a species Zaire Ebola virus. INFECTIOUS DISEASES AND VACCINES. MOLECULAR THERAPY. Vol.18, supp.1, 8253, may 2010. DOI:https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)38090-X реферат	1-15

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

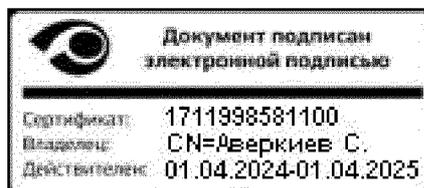
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи  
евразийской заявки или после нее«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию  
и т.д."P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки,  
но после даты испрашиваемого приоритета"«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и при-  
веденный для понимания изобретения«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,  
порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,  
порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими документами  
той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 10 июля 2024 (10.07.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202392207**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*A61K 35/76* (2015.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)

СПК:

**A61K 39/12**  
**A61K 35/76**  
A61K 2039/53  
A61K 2039/58  
C12N 2760/14134  
C12N 2760/14234

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202392207**

**ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
А	JP5940064 B2 (ANDREW GILL), 29.06.2009 Ф-ЛА П.1, раздел flaviviruses	1-15