



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118340** (13) **C2**

(51) МПК (2018.01)

**C12N 15/863** (2006.01)

**A61K 39/00**

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 7/00**

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 05223</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>28.10.2013</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	M Wachsmann et al: "Antigen-presenting capacity of epidermal cells infected with vaccinia virus recombinants containing the herpes simplex virus glycoprotein D, and protective immunity", The journal of general virology, 1 September 1989, P. 2513-2520
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.01.2019</b>		Perkus M. E. et al: "Cloning and expression of foreign genes in Vaccinia virus, using a host range selection system", Journal of virology vol. 63, no. 9, 1 September 1989, P. 3829-3836
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/719,429</b>		J A Tine et al: "NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, mutant antigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria.", Infection and immunity, vol. 64, no. 9, 1 September 1996, P. 3833-3844
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>28.10.2012</b>		"Vaccinia virus WR, complete genome - Nucleotide - NCBI", GenBank Accession Number AY243312, 14 June 2006, XP055095213, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/29692106">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/29692106</a>
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		cited in the application WO 2006073431 A2, 13.07.2006
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>27.07.2015, Бюл.№ 14</b>		Karen Baur et al: "Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus Ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses", Journal of virology, vol. 84, no. 17, 10 June 2010, P. 8743-8752,
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.01.2019, Бюл.№ 1</b>		Davison A J et al: "Structure of vaccinia virus early promoters", Journal of molecular biology, vol. 210, no. 4, 20 December 1989, P. 749-769
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2013/003239, 28.10.2013</b>		Sonia T. Wennier et al: "A Novel Naturally Occurring Tandem Promoter in Modified Vaccinia Virus Ankara Drives Very Early Gene Expression and Potent Immune Responses", Plos one, vol. 8, no. 8, 12 August 2013, P. e73511
<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Штайгервальд Робін (DE), Брінкманн Кай (DE)</b>		
<b>(73)</b> Власник(и):	<b>БАВАРІАН НОРДІК А/С, Hejreskovvej 10A, DK-3490 Kvistgaard, Denmark (DK)</b>		

**(54) ПРОМОТОР PR13.5 ДЛЯ СТИЙКИХ Т-КЛІТИННИХ ТА ГУМОРАЛЬНИХ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ**

**(57) Реферат:**

UA 118340 C2

Винахід стосується композиції і способу індукції стійких CD8 Т-клітинних та гуморальних імунних реакцій на специфічний антиген шляхом проведення однієї чи більше імунізацій рекомбінантного модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA) ссавця.

[001] MVA походить від штаму вірусу вісповакцини Анкара, що вражає шкіру (хоріоалантоїсного вірусу вісповакцини Анкара (CVA)), який впродовж багатьох років підтримувався в Інституті вакцинації, Анкара, Турція, і використовувався в якості основи для вакцинації людей. Однак через часті тяжкі поствакцинальні ускладнення, пов'язані з вірусами вісповакцини (VACV), було здійснено декілька спроб створення більш атенуйованої і безпечної протівіспяної вакцини.

[002] У період з 1960 по 1974 професору Anton Mayr вдалося успішно атенувати CVA шляхом більше ніж 570 послідовних пасажів у клітинах CEF (Mayr et al., 1975, Passage History: Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3: 6-14). У рамках початкового етапу розробки протівіспяної вакцини на основі MVA було проведено доклінічні дослідження MVA-517 (що відповідає 517-му пасажу) в комбінації з Lister Elstree (Stickl, 1974, Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA". Prev.Med. 3(1): 97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel, 1971, Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus"). Munch Med Wochenschr. 113: 1149-1153) у суб'єктів, схильних до небажаних реакцій на введення протівіспяної вакцини. У 1976-му MVA, отриманий з посівного матеріалу MVA-571 (що відповідає 571-му пасажу), був зареєстрований у Німеччині в якості первинної вакцини у двоетапній програмі ін'єкційної протівіспяної вакцинації. Згодом MVA-572 було вакциновано приблизно 120000 європеїдів, більшість з яких - діти від 1 до 3 років. При цьому не було повідомлень про тяжкі побічні ефекти, попри те що чимало суб'єктів належали до популяції з високим ризиком ускладнень, пов'язаних із звичайним вірусом вісповакцини (Mayr et al., 1978, The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behaviour in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl). Zentralbl. Bacteriol. (B) 167: 375-390). MVA-572 було депоновано у Європейській колекції клітинних культур тварин, Лабораторія дослідження та виробництва вакцин, Лабораторна служба громадської охорони здоров'я, Науково-виробничий центр мікробіології, Портон Даун, Солсбері, Уїлтшир SP4 0JG, Сполучене Королівство, під номером ECACC V9401 2707.

[003] Оскільки для атенуації MVA було використано численні пасажі, існує низка різноманітних штамів або ізолятів, залежно від номера пасажу в клітинах CEF. Всі штами MVA отримані від доктора Mayr, і більшість походить від MVA-572, який застосовувався в рамках програми ерадикації віспи в Німеччині, або від MVA-575, який інтенсивно використовувався в якості ветеринарної вакцини. MVA-575 було депоновано 7 грудня 2000 у Європейській колекції клітинних культур тварин (ECACC) під реєстраційним номером V001 20707.

[004] Шляхом серійного культивування (більше ніж 570 пасажів) CVA у первинних фібробластах ембріона курчати було отримано атенуйований вірус CVA - MVA (модифікований вірус вісповакцини Анкара). Компанією Bavarian Nordic було здійснено додаткові пасажі MVA, який отримав назву MVA-BN. У MVA, як і у MVA-BN, відсутні приблизно 13 % (26,5 кб, що відповідають шести великим і численним дрібним делеційним сайтам) геному, порівняно з предковим вірусом CVA. Делеції зачіпають деякі гени вірулентності і тропізму, а також великий фрагмент гена, що кодує білок включень типу А (ATI), і ген, що кодує структурний білок, який спрямовує зрілі вірусні частинки у тільця-включення типу А. Зразок MVA-BN було депоновано 30 серпня 2000 у Європейській колекції клітинних культур тварин (ECACC) під номером V00083008.

[005] MVA-BN може прикріплюватись до клітин людини і проникати в них, де вірусні гени вкрай ефективно експресуються. При цьому не відбувається збірки та виходу дочірніх віріонів. MVA-BN та його похідні вводили багатьом типам тварин і більше ніж 2000 людей, зокрема тим, що мають імунodefіцит. Всі вакцинації було визнано в цілому безпечними і такими, що добре переносяться.

[006] У багатьох різних публікаціях побутує думка, що всі штами MVA однакові і являють собою високоатенуйовані безпечні живі вірусні вектори. Однак в результаті доклінічних випробувань було показано, що MVA-BN демонструє найвищі атенуйованість та ефективність, порівняно з іншими штамми MVA (WO 02/42480). MVA-BN, варіантні штами MVA, як, наприклад, депоновані у ECACC під номером V00083008, здатні до репродуктивної реплікації у фібробластах ембріона курчати (CEF) in vitro, але не здатні до репродуктивної реплікації у клітинах людини, в яких можуть репродуктивно реплікуватися MVA 575 або MVA 572. Наприклад, MVA-BN не здатний до репродуктивної реплікації у кератиноцитах людини лінії HaCaT, клітинах нирки ембріона людини лінії 293, клітинах остеосаркоми людини лінії 143B і клітинах аденокарциноми шийки матки людини лінії HeLa. Крім того, штами MVA-BN не реплікуються при моделюванні на мишах, які не здатні до продукування зрілих В- і Т-клітин і в зв'язку з цим мають дуже послаблений імунітет та є вкрай сприйнятливими до вірусу, що реплікується. Додатковою або альтернативною властивістю штамів MVA-BN є здатність до

індукції принаймні суттєво схожого рівня імунітету при проведенні вакцинації в режимі прайм-буст з використанням вірусу вісповакцини як для первинної імунізації, так і для реімунізації, порівняно з вакцинацією в режимі прайм-буст з використанням ДНК для первинної імунізації та вірусу вісповакцини – для реімунізації.

5 [007] Термін "не здатний до репродуктивної реплікації" використовується у даній заявці, як визначено у WO 02/42480 та патенті США 6761893, які включені у даний документ за допомогою посилання. Таким чином, даний термін відноситься до вірусу, який через 4 дні від початку інфекції демонструє ступінь ампліфікації, який складає менше ніж 1, що виявляється за допомогою методів, описаних у патенті США 6761893, який включений до даного документу за допомогою посилання. "Ступінь ампліфікації" вірусу являє собою співвідношення кількості вірусів, що походять з інфікованої клітини (Вихід), до вихідної кількості вірусів, використаних для інфікування клітин (Вхід). Співвідношення між Виходом і Входом, що складає "1", описує статус ампліфікації, за якого кількість вірусів, що походять з інфікованої клітини, співпадає з вихідною кількістю вірусів, використаних для інфікування клітин.

15 [008] Згідно з одним із варіантів реалізації винаходу MVA-BN або його похідні характеризуються індукуванням принаймні суттєво схожого рівня імунітету при проведенні вакцинації в режимі прайм-буст з використанням вірусу вісповакцини як для первинної імунізації, так і для реімунізації, порівняно з вакцинацією в режимі прайм-буст з використанням ДНК для первинної імунізації та вірусу вісповакцини – для реімунізації. Вірус вісповакцини розглядається як такий, що індукує принаймні суттєво схожий рівень імунітету при проведенні вакцинації в режимі прайм-буст з використанням вірусу вісповакцини як для первинної імунізації, так і для реімунізації, порівняно з вакцинацією в режимі прайм-буст з використанням ДНК для первинної імунізації та вірусу вісповакцини - для реімунізації у випадку, якщо відповідь ЦТЛ, оцінена за допомогою "аналізу 1" або "аналізу 2", розкритих у WO 02/42480, бажано за допомогою обох аналізів, є принаймні суттєво схожою при проведенні вакцинації в режимі прайм-буст з використанням вірусу вісповакцини як для первинної імунізації, так і для реімунізації, порівняно з вакцинацією в режимі прайм-буст з використанням ДНК для первинної імунізації та вірусу вісповакцини - для реімунізації. Більш бажано, щоб відповідь ЦТЛ після проведення вакцинації в режимі прайм-буст з використанням вірусу вісповакцини як для первинної імунізації, так і для реімунізації, оцінена за допомогою принаймні одного з аналізів, була більш інтенсивною, порівняно з вакцинацією в режимі прайм-буст з використанням ДНК для первинної імунізації та вірусу вісповакцини - для реімунізації. Найбільш бажано, щоб відповідь ЦТЛ була більш інтенсивною за її оцінки за допомогою обох аналізів.

25 [009] У WO 02/42480 розкритий спосіб отримання вірусів вісповакцини, які мають властивості MVA-BN. Високоатенуйований вірус MVA-BN може бути отриманий, наприклад, за допомогою додаткових пасажів модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA), такого як MVA-572 або MVA-575.

[0010] Таким чином, було показано, що MVA-BN має найвищий профіль атенуйованості, порівняно з іншими штамми MVA, і є безпечним навіть для тварин із тяжким імунodefіцитом.

40 [0011] Попри те, що реплікація MVA у клітинах ссавців різко пригнічена, його гени ефективно транскрибуються, при цьому вірусна реплікація блокується на рівні збірки та виходу вірусу. (Sutter and Moss, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89: 10847-10851; Carroll and Moss, 1997, Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology 238: 198-211.) Попри високу атенуйованість та знижену вірулентність MVA-BN, доклінічні дослідження показали, що він викликає як гуморальну, так і клітинну імунні реакції на VACV та продукти гетерологічних генів, клонованих у геном MVA (Harrer et al., 2005, Therapeutic Vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antiviral Therapy 10: 285-300; Cosma et al., 2003, Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nefspecific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine 22(1): 21-29; Di Nicola et al., 2003, Clinical protocol. Immunization of patients with malignant melanoma with autologous CD34(+) cell-derived dendritic cells transduced ex vivo with a recombinant replication-deficient vaccinia vector encoding the human tyrosinase gene: a phase I trial. Hum Gene Ther. 14(14): 1347-1 360; Di Nicola et al., 2004, Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+) derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 10(16): 5381-5390).

55 [0012] MVA-BN та вакцини на основі рекомбінантного MVA-BN можуть бути отримані, пасировані, продуковані та вироблені в клітинах CEF, що культивуються в середовищі без сироватки. З урахуванням відомих характеристик, багато рекомбінантних варіантів MVA-BN

було запропоновано для доклінічної та клінічної розробки. Між MVA-BN, основою вірусного вектора, та різними вакцинами на основі рекомбінантного MVA не було виявлено відмінностей у атенуванні (недостатності реплікації в лініях клітин людини) або безпечності (за результатами доклінічних досліджень токсичності або клінічних досліджень).

5 [0013] Індукція сильних гуморальних та клітинних імунних реакцій на продукт чужорідного гена, експресований VACV-вектором, ускладнена через те, що продукт чужорідного гена має конкурувати з більше ніж 150 антигенами вектора VACV за розпізнавання та індукцію специфічних антитіл і Т-клітин. Особливою проблемою є імунодомінантність CD8 Т-клітинних антигенних детермінант вектора, яка перешкоджає індукції сильної CD8 Т-клітинної реакції на продукт чужорідного гена. (Smith et al., Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. *J. Immunol.* 175:8431-8437, 2005). Це стосується VACV-векторів, що реплікуються, таких як Dryvax, а також векторів, що не реплікуються, наприклад, NYVAC і MVA.

10 [0014] Для експресії рекомбінантного антигена ("неоантигена") вектором VACV можуть використовуватися тільки поксвірус-специфічні промотори, але не звичайні еукаріотичні промотори. Це зумовлено особливостями біології поксвірусів, що реплікуються в цитоплазмі та привносять свою власну, незалежну від клітини машинерію транскрипції, яка не розпізнає типові еукаріотичні промотори.

20 [0015] Цикл вірусної реплікації поділений на дві основні фази: ранню фазу, що включає перші дві години від початку інфекції до реплікації ДНК, і пізню фазу, що починається разом із реплікацією вірусної ДНК на 2-4 годину від початку інфекції.

25 [0016] Пізня фаза охоплює решту циклу вірусної реплікації від ~2-20 год. від початку інфекції до виходу дочірніх віріонів з інфікованої клітини. Існує низка типів поксвірусних промоторів, що відрізняються періодами циклу вірусної реплікації, протягом яких вони активні, та називаються відповідно до цього, наприклад, ранні та пізні промотори. (Дивись, наприклад, Davison and Moss, *J. Mol. Biol.* 210:771-784, 1989; Davison and Moss, *J. Mol. Biol.* 210:749-769, 1989; та Hirschmann et al., *Journal of Virology* 64:6063-6069, 1990, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання).

30 [0017] У той час як ранні промотори можуть бути активні також на пізньому етапі інфекції, активність пізніх промоторів обмежується пізньою фазою. Промотори третього класу, названі проміжними промоторами, активні протягом переходу від ранньої до пізньої фази і залежні від реплікації вірусної ДНК. Останнє стосується також пізніх промоторів, однак транскрипція з проміжних промоторів починається раніше, ніж із типових пізніх промоторів і потребує іншого набору транскрипційних факторів.

35 [0018] Останніми роками стає все більш очевидно, що вибір часового класу поксвірусного промотора для експресії неоантигена має глибокий вплив на силу та якість неоантиген-специфічної імунної реакції. Було показано, що Т-клітинні реакції на неоантигени, експресовані під контролем пізнього промотора, слабкіші, ніж на такий самий антиген, експресований під контролем раннього промотора. (Bronte et al., Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3183-3188, 1997. Coupar et al., Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. *Eur. J. Immunol.* 16:1479-1487, 1986).

45 [0019] Ще більш вражаюче, недавно було показано, що при повторних аутологічних імунізаціях VACV, як і VACV-вектором MVA, дефектним по реплікації, CD8 Т-клітинні реакції на антигени, що знаходяться під контролем виключно пізнього промотора, можуть бути повністю відсутні. Це порушення призвело до того, що антиген-специфічна CD8 Т-клітинна реакція майже не виявляється після вторинної імунізації. (Kastenmuller et al., Cross-competition of CD8+T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J. Exp. Med.* 204:2187-2198, 2007).

50 [0020] Відтак рання експресія неоантигенів VACV-векторами, схоже, є визначальною для ефективних неоантиген-специфічних CD8 Т-клітинних реакцій. Було також показано, що антиген, експресований VACV-вектором у ранній фазі, конкурує не лише з антигенами, експресованими в пізній фазі, але також і з іншими антигенами, експресованими в ранній фазі, за імунодомінантність протягом CD8 Т-клітинної реакції. (Kastenmuller et al., 2007). Специфічні властивості ранніх ділянок поксвірусних промоторів, отже, можуть бути вкрай важливими для індукції неоантиген-специфічної Т-клітинної реакції. Крім того, згідно із загальноприйнятою точкою зору, більша кількість антигена сприяє індукції сильніших антиген-специфічних імунних реакцій (для інформації щодо поксвірусів, див., наприклад, Wyatt et al., Correlation of

immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. *Vaccine* 26:486-493, 2008).

[0021] Раніше було описано промотор, що поєднує в собі 4 ранніх промоторних елемента та пізній промоторний елемент гена ATI (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 65:5584-5588, 1991; Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. *Vaccine* 26:486-493, 2008). Було показано, що він забезпечує підвищену ранню експресію антигена. Однак Т-клітинні реакції, індуковані антигеном, експресія якого знаходиться під контролем такого промотора, було досліджено тільки після однократної імунізації і очевидно не відрізнялись від реакцій, що мали місце у випадку експресії під контролем типового промотора Pr7.5K. (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 65:5584-5588, 1991.)

[0022] Jin et al. у *Arch. Virol.* 138:315-330, 1994, було описано конструювання рекомбінантних промоторів VACV, що складаються із промотора ATI VACV у поєднанні з тандемними повторами (2 - 38 копій) мутантного промотора Pr7.5, функціонально пов'язаного з геном CAT. До 10 копій мутантного промотора Pr7.5 включно ефективно підвищували ранню експресію генів. Подальше збільшення кількості копій, схоже, має пригнічуючу дію. Для всіх конструктів кількість білка CAT, яка виробляється в присутності цитозин арабінозиду (AraC) (тобто якщо цикл вірусної реплікації був зупинений у ранній фазі), складала менше ніж одну десяту кількості, яка виробляється за відсутності AraC (Jin et al. *Arch. Virol.* 138:315-330, 1994).

[0023] Недавно було показано, що повторні імунізації мишей рекомбінантним MVA, який експресує OVA під контролем гібридного ранньо-пізнього промотора (pHyb), що містить п'ять копій сильного раннього елемента, приводять до розвитку виняткових гострих CD8 Т-клітинних реакцій та реакцій CD8 Т-клітин пам'яті, порівняно з OVA, експресія якого знаходиться під контролем Pr7.5- та PrS (Baur et al., *Journal of Virology*, Vol. 84 (17): 8743-8752 (2010)). Крім того, після трьох чи більше імунізацій білок B8R, що походить із MVA, замінюється OVA, експресованим під контролем pHyb, в якості імунодомінантного CD8 Т-клітинного антигена. Id.

[0024] Assarsson et al. в *P.N.A.S.* 105: 2140-45, 2008, оцінили одночасні рівні експресії 223 анотованих генів вірусу вісповакцини протягом інфекції та визначили їхню динаміку за допомогою геномних мікрочіпів високої щільності. Вони виявили, що багато генів штаму WR вірусу вісповакцини мають високі рівні транскрипції. Assarsson et al. навели приклади вискоекспресованих генів: передранніх VACWR-059 (білок, що зв'язує дволанцюгову РНК) і VACWR-184 (продукт невідомий); раннього VACWR-018 (продукт невідомий); ранньо-пізнього VACWR-131 (капсидний білок); та пізнього VACWR-169 (продукт невідомий). Assarsson et al. вказали на те, що внаслідок винятково високих рівнів експресії ці гени можуть становити особливий інтерес для майбутніх досліджень, але не визначили, які промотори ініціюють транскрипцію цих генів.

[0025] Yang et al. у *P.N.A.S.* 107:11513-11518, 2010, застосували глибоке секвенування РНК для аналізу динаміки транскриптомів вірусу вісповакцини (VACV) протягом інфекції. До реплікації вірусної ДНК було виявлено транскрипти зі 118 ORF VACV; після реплікації було описано транскрипти з 93 додаткових ORF. Висока роздільна здатність дозволила визначити чіткі межі багатьох мРНК, включаючи наскрізні транскрипти, і розміщення сайтів ініціації транскрипції та промоторів, що перекриваються.

[0026] Orubu et al у *PLoS ONE* 7(6):e40167, 2012, показали, що сильні ранні промотори, під контролем яких знаходиться експресія нефункціональних або другорядних відкритих рамок зчитування (ORF) MVA, можуть бути використані для імуногенної експресії рекомбінантного антигена. Точна заміна MVA-ортологів C11R, F11L, A44L і B8R на модельний антиген, розташований таким чином, щоб використовувати той самий кодон ініціації трансляції, зробила можливою ранню експресію трансгена, подібну чи дещо більш інтенсивну, ніж та, що досягається за допомогою широко використовуваного промотора p7.5 або коротких синтетичних промоторів. Аналогічно, частота антиген-специфічних CD8+Т-клітин, індукованих шляхом однократного введення або первинної імунізації аденовірусом і реімунізації rMVA у мишей, при використанні ендегенних промоторів у їхніх вихідних геномних локусах була такою самою або дещо підвищеною, порівняно з типовими конструктами. Посилення імуногенності, що спостерігається при використанні промоторів C11R або F11L, порівняно з p7.5, було подібне до посилення імуногенності, що мало місце при порівнянні промотора mH5 з p7.5.

[0027] Сильні Т-клітинні гуморальні імунні реакції на антигени, кодовані рекомбінантними поксвірусами, можуть підвищити ефективність вакцини. Отже, в даній області техніки існує потреба у композиціях та способах, які викликають сильні Т-клітинні та гуморальні імунні реакції

на антигени, що кодуються рекомбінантними поксвірусами, такими як MVA. Винахід задовольняє цю потребу.

#### КОРОТКА СУТЬ ВИНАХОДУ

[0028] Винахід пропонує рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), що містить промотор Pr13.5, функціонально пов'язаний з нуклеотидною послідовністю, яка кодує неоантиген, і способи їх застосування. В одному варіанті реалізації винаходу винахід пропонує спосіб індукції стійкої CD8 Т-клітинної реакції на неоантиген у свавця, бажано людини, що включає проведення однієї чи більше імунізацій вірусом MVA свавця, у тому числі людини.

[0029] В різних варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні 1 копію нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 основ, яка принаймні на 95 %, 98 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0030] В різних варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні 1 копію другої нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 31 нуклеотиду, яка принаймні на 95 %, 98 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0031] В різних варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 нуклеотидів, яка на 100 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0032] В різних варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить SEQ ID NO:2.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0033] На Фігурі 1 представлено upstream-послідовність гена MVA013.5L (SEQ ID NO:3). Наведено послідовності промоторів Pr13.5-short та Pr13.5-long. Підкреслений пунктирною лінією: Pr13.5-long (Пол. 15878-15755). Підкреслений жирною лінією: Pr13.5-short (Пол. 15808-15755). Підкреслені суцільною лінією: Стартовий кодон ATG гена MVA013.5 (Пол. 15703-15701). Стоп-кодон TAA гена MVA014L (Пол. 15878-15856). Чорні стрілки знизу: сайти ініціації транскрипції, визначені за допомогою ПЛР із швидкою ампліфікацією кінців кДНК (Пол. 15767 та 15747). Сірі стрілки зверху: сайти ініціації транскрипції, наведені Yang et al., 2010, suppl. data. Поміщений у рамку: коровий промотор, наведений Yang et al., 2010, suppl. data (Пол. 15913-15899). Положення наведено для послідовності DQ983238.1 у GenBank.

[0034] На Фігурі 2 представлено послідовність і положення промоторів Pr13.5-long та Pr13.5-short у геномі MVA (SEQ ID NO:3). У upstream-послідовності гена MVA013.5 розташований прямий повтор, що складається із 44 п. о. Поміщена у рамку: повторювана послідовність, що складається із 44 п. о., розташована в upstream-послідовності промотора 13.5, відмежованого спейсером, що складається із 36 п. о. Підкреслений пунктирною лінією: Pr13.5-long (Пол. 15878-15755). Підкреслений жирною лінією: Pr13.5-short (Пол. 15808-15755). Підкреслений суцільною лінією: стартовий кодон ATG гена MVA013.5 (Пол. 15703-15701). Положення наведено для послідовності DQ983238.1 у GenBank.

[0035] На Фігурі 3 представлено результати вимірювання рівнів мРНК гена овальбуміну у клітинах HeLa, інфікованих зазначеними конструктами, за допомогою RT-qPCR у зазначені моменти від початку інфекції.

[0036] На Фігурі 4 представлено результати вимірювання білкової експресії Ova за допомогою FACS у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) у клітинах HeLa, інфікованих зазначеними конструктами, у зазначені моменти від початку інфекції. Середнє значення інтенсивності флуоресценції для клітин дикого типу (які не містять гену Ova), що складає 399 СІФ, являє собою фоновий рівень флуоресценції.

[0037] На Фігурі 5 представлено середнє співвідношення клітин Ova+/B8R+ у мишей, вакцинованих зазначеними конструктами, після першої, другої і третьої імунізацій.

[0038] На Фігурі 6 представлено середнє співвідношення Ova+/B8R+Т-клітинних реакцій у мишей на 10-й тиждень після третьої імунізації зазначеними конструктами.

[0039] Фігури 7A і 7B ілюструють утворення антитіл після першої, другої і третьої імунізацій зазначеними конструктами. А. Середнє геометричне титру (СГТ) антитіл. В. Співвідношення СГТ порівняно з промотором PrS. Промотори MVA50L+PrSSL і MVA170R+PrSSL є промоторами MVA відповідних генів, злитими із 5'-кінцем синтетичного короткого сильного пізнього промотора PrSSL (Short Strong Late) безпосередньо upstream від ATG гена овальбуміну. (AATTTTAAATATATAA; SEQ ID NO:7; PCT WO 2010/060632 A1.)

[0040] На Фігурах 8A-8F представлено вирівнювання послідовності SEQ ID NO:1 з нуклеотидними послідовностями різних поксвірусних промоторів Pr13.5 за допомогою BLAST. Ідентичні нуклеотиди позначені точками, відсутні нуклеотиди позначені тире, а заміни представлені буквами.

[0041] На Фігурах 9A-9D наведено облікові номери та назви послідовностей, використаних для вирівнювання, зображеного на Фігурах 8A-8F.

## ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

[0042] Клітини HeLa інфікували MVA-BN, після чого отримували РНК. Синтезували специфічні праймери до різних ORF MVA і проводили ПЛР із швидкою ампліфікацією кінців кДНК (FirstChoice® RLM-RACE Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) для отримання ПЛР-продуктів, що відповідають РНК MVA, які кодують ці ORF. ПЛР-продукти секвенували з метою визначення сайтів ініціації транскрипції. Виходячи з цих даних було визначено промотори для транскрипції мРНК, які кодують ці ORF. З метою контролю експресії гена овальбуміну (OVA) в MVA-конструкти вставляли промотори MVA для наступних ORF: MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) та MVA170R (B3R; WR 185).

[0043] Клітини HeLa інфікували рекомбінантними вірусами MVA in vitro, а білкову експресію овальбуміну оцінювали за допомогою аналізу FACS. Аналіз FACS не виявив білкової експресії овальбуміну на 2-у або навіть 4-ю годину від початку інфекції для конструктів, що містять промотори MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) і MVA170R (B3R; WR 185). При цьому для промотора MVA13.5 (CVA022; WR 018) інтенсивну експресію овальбуміну було виявлено вже після 2-х годин.

[0044] Імовірний коровий елемент промотора для ORF MVA13.5L було раніше визначено у Yang et al., 2010, як такий, що містить 15 нт корову послідовність та нетрансльовану лідерну послідовність розміром 177 нт. Проте у даному дослідженні встановлено, що сайти ініціації транскрипції, які використовуються ORF MVA13.5L, розташовані більше ніж на 100 нуклеотидів downstream від сайту ініціації, визначеного Yang et al. Відповідно, промотор MVA13.5, визначений винахідниками, відрізняється від корового елемента промотора, визначеного Yang et al.

[0045] Промотор MVA13.5, визначений винахідниками, містить повтор, що складається із більше ніж 40 нуклеотидів: TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID NO:1). Повторювана послідовність зустрічається також у багатьох інших поксвірусів, наприклад, вірусу віспи коней, вірусу віспи мавп, вірусу віспи корів, вірусу натуральної віспи, вірусу вісповакцини, вірусу віспи верблюдів, вірусу віспи кроликів, вірусу віспи мишей та вірусу віспи гололапих піщанок (Фігури 8 та 9).

[0046] Було створено два MVA-конструкти з промоторами, що містять одну копію (MVA13.5 short; SEQ ID NO:1) або дві копії (MVA13.5 long; SEQ ID NO:2) повтору, який контролює експресію гена овальбуміну (OVA). Після інфікування клітин HeLa обома конструктами in vitro було виявлено інтенсивну експресію овальбуміну (Фіг. 4).

[0047] За допомогою RT-qPCR було оцінено динаміку експресії РНК овальбуміну під контролем різних промоторів у інфікованих клітинах HeLa in vitro. Як MVA13.5 short, так і MVA13.5 long продемонстрували високі рівні ранньої експресії РНК (Фіг. 3). MVA13.5 long продемонстрував найвищі рівні ранньої білкової експресії.

[0048] CD8 Т-клітинні реакції на OVA, експресований з рекомбінантних конструктів під контролем промоторів PrS, Pr7.5 opt+spacer, Pr13.5 short і Pr13.5 long, було оцінено у мишей після однієї, двох і трьох імунізацій рекомбінантним MVA (Фіг. 5-6). OVA-специфічні та B8R(вірус)-специфічні CD8 Т-клітинні реакції було оцінено шляхом визначення кількості CD8 Т-клітин, які специфічно зв'язуються з гексамерами МНС І класу. Декстрамери МНС І класу утворюють комплекси із відповідними Н-2Кb-зв'язуючими пептидами: SIINFEKL (SEQ ID NO:4) для OVA або TSYKFESV (SEQ ID NO:5) для вірусного пептиду B8R.

[0049] Середнє співвідношення OVA-специфічних до B8R-специфічних CD8 Т-клітин склало приблизно 2,5 для MVA13.5-long після 3-х імунізацій. Три інших конструкти продемонстрували середнє співвідношення, що складало менше ніж 1. Таким чином, інверсія ієрархії імунодомінантності може бути досягнута шляхом застосування для експресії неоантигена промотора Pr13.5 long, але не інших промоторів.

[0050] Гуморальні імунні реакції на OVA, експресований з рекомбінантних конструктів під контролем різних промоторів, було оцінено у мишей після однієї, двох і трьох імунізацій рекомбінантним MVA (Фіг. 7A-B). Гуморальна імунна реакція для MVA13.5 long була суттєво більш інтенсивною, ніж реакція, яка спостерігається при застосуванні рекомбінантного MVA, що містить промотор PrS. Відтак застосування промотора Pr13.5 long для контролю експресії неоантигена MVA забезпечує несподівано чудові результати.

## Промотори Pr13.5

[0051] Винахід охоплює виділені нуклеїнові кислоти, які містять або складаються з промотора Pr13.5. У межах даного винаходу "промотор Pr13.5" містить принаймні 1 копію нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 основ, яка принаймні на 95 % ідентична SEQ ID NO:1. Таким чином, у різних варіантах реалізації винаходу "промотор Pr13.5" може відноситись до нуклеотидної послідовності MVA, синтетичної послідовності або



аналогічної поксвірусної послідовності з поксвірусом, відмінного від MVA. У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні 1 копію нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 основ, яка принаймні на 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1. Довжина нуклеотидної послідовності складає бажано 40, 41, 42, 43, 44 або 45 основ.

[0052] Процент ідентичності може бути визначений шляхом візуальної оцінки і математичного розрахунку. Крім того, процент ідентичності двох нуклеотидних послідовностей може бути визначений шляхом порівняння інформації про послідовності за допомогою комп'ютерної програми GAP, версія 6.0, описаної Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) і запропонованої Генетичною комп'ютерною групою Університету Вісконсину (UWCGC). Бажані параметри за замовчуванням для програми GAP включають: (1) унітарну матрицю порівняння (що має значення 1 для співпадінь і 0 для неспівпадінь) для нуклеотидів і вагову матрицю порівняння Gribbskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, як описано Schwartz and Dayhoff, eds. у Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) штраф за кожний пропуск, що складає 3,0, і додатковий штраф 0,10 за кожний символ на місці кожного пропуску; та (3) відсутність штрафів за кінцеві пропуски. Можуть використовуватися й інші програми, що застосовуються фахівцями в галузі порівняння послідовностей.

[0053] У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 функціонально пов'язаний з гетерологічною нуклеотидною послідовністю. У межах даного винаходу "гетерологічна нуклеотидна послідовність" означає нуклеотидну послідовність, яка в природі не пов'язана з промотором. У межах даного винаходу "функціонально пов'язаний" означає, що промотор може контролювати експресію гетерологічної нуклеотидної послідовності в клітині, інфікованій поксвірусом. У бажаному варіанті реалізації винаходу гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує неоантиген. У межах даного винаходу неоантиген означає антиген, який не експресується поксвірусним вектором у природних умовах.

[0054] Промотор Pr13.5 може бути функціонально пов'язаний з гетерологічною нуклеотидною послідовністю за допомогою технології рекомбінантних ДНК. У різних варіантах реалізації винаходу гетерологічна нуклеотидна послідовність вводиться у 13.5 ORF поксвірусу.

[0055] У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 являє собою поксвірусний промотор природного походження. Наприклад, промотор Pr13.5 може походити від промотора Pr13.5 модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA), вірусу віспи мавп, вірусу віспи корів, вірусу натуральної віспи, вірусу вісповакцини, вірусу віспи верблюдів, вірусу віспи кроликів, вірусу віспи мишей або вірусу віспи гололапих піщанок. Джерела бажаних промоторів Pr13.5 можуть бути вибрані серед вірусів, представлених на Фігурі 9. Бажані промотори Pr13.5 можуть бути вибрані серед послідовностей, представлених на Фігурі 8.

[0056] У різних варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 являє собою синтетичний промотор Pr13.5.

[0057] Промотор Pr13.5 може містити 1, 2, 3, 4, 5, 6 чи більше копій послідовності, що складається із принаймні 40, 41, 42, 43, 44 або 45 нуклеотидів, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0058] У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить 1 копію нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1.

[0059] У деяких варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить 1 копію нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1 та 1, 2, 3, 4, 5, 6 чи більше копій послідовності, що складається із принаймні 40, 41, 42, 43 або 44 нуклеотидів, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0060] У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні 1 копію нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 основ, яка принаймні на 98 % ідентична SEQ ID NO:1.

[0061] У деяких варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить 1 копію нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 40 основ, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1, та 1, 2, 3, 4, 5, 6 чи більше копій другої нуклеотидної послідовності, що складається із принаймні 31 нуклеотиду, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO:1. У бажаному варіанті реалізації винаходу друга нуклеотидна послідовність містить принаймні 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 або 45 основ.

[0062] У бажаному варіанті реалізації винаходу повторювані послідовності розмежовані 20-80 нуклеотидами, більш бажано 30-40 нуклеотидами, найбільш бажано 33, 35, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 нуклеотидами.

[0063] У бажаному варіанті реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить принаймні одну копію послідовності:  
 TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTATTGCTCTTGTGACTAGAGACTTT  
 AGTTAAGGTACTGTAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID  
 NO:2).

[0064] У деяких варіантах реалізації винаходу промотор Pr13.5 містить одну чи більше нуклеотидних замінів, представлених на Фігурі 8.

[0065] Винахід охоплює способи експресії неоантигена, що включають функціональне пов'язування промотора Pr13.5 з гетерологічною нуклеотидною послідовністю.

Рекомбінантні поксвіруси, що містять промотори Pr13.5

[0066] Винахід пропонує рекомбінантний поксвірусний вектор, що містить промотор Pr13.5, функціонально пов'язаний з гетерологічною нуклеотидною послідовністю. В одному варіанті реалізації винаходу гетерологічна нуклеотидна послідовність вставлена у 13.5 ORF поксвірусу таким чином, щоб функціонально пов'язати гетерологічну нуклеотидну послідовність з ендегенним вірусним промотором Pr13.5. В іншому варіанті реалізації винаходу гетерологічна нуклеотидна послідовність пов'язана з промотором Pr13.5 і вставлена у геномний сайт, відмінний від 13.5 ORF.

[0067] У бажаному варіанті реалізації винаходу поксвірусний вектор походить від поксвірусів, що належать до підродини Chordoroxvirinae. Поксвіруси включають віруси, що належать до родів Orthoroxvirus, Pararoxvirus, Aviroxvirus, Caprioxvirus, Leprioxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus і Yatapoxvirus. Найбільш бажаними є поксвіруси, що належать до родів Orthoroxvirus і Aviroxvirus.

[0068] Інші поксвіруси, такі як вірус віспи єнотів та вірус віспи мишей, можуть бути використані в даному винаході, наприклад, для виробництва вакцини для імунізації диких тварин. До даного винаходу включені також представники родів Caprioxvirus та Leprioxvirus, оскільки вони придатні для використання в якості векторів для великої рогатої худоби та кроликів відповідно.

[0069] В інших варіантах реалізації винаходу поксвірус походить від вірусів роду Aviroxvirus. Приклади вірусів роду Aviroxvirus, придатних для використання у даному винаході, включають будь-які віруси віспи птахів, такі як вірус віспи курей, вірус віспи канарок, вірус віспи юнко, вірус віспи майн, вірус віспи голубів, вірус віспи папуг, вірус віспи перепелів, вірус віспи павичів, вірус віспи пінгвінів, вірус віспи горобців, вірус віспи шпаків та вірус віспи індиків. Бажаними вірусами роду Aviroxvirus є вірус віспи канарок та вірус віспи курей.

[0070] У бажаному варіанті реалізації винаходу поксвірус являє собою вірус вісповакцини, найбільш бажано MVA. Винахід охоплює рекомбінантні віруси MVA, створені на основі будь-яких можливих вірусів MVA. Бажаними вірусами MVA є варіантні штами MVA - MVA-BN, як, наприклад, депонований у ECACC під номером V00083008; MVA-575, депонований 7 грудня 2000 у Європейській колекції клітинних культур тварин (ECACC) під реєстраційним номером V001 20707; і MVA-572, депонований у Європейській колекції клітинних культур тварин як ECACC V9401 2707. Бажаними є також похідні від депонованих штамів.

[0071] У бажаному варіанті реалізації винаходу MVA має здатність до репродуктивної реплікації у фібробластах ембріона курчати (CEF) чи інших лініях клітин птахів in vitro або у яйці, що містить ембріон, in vivo, але не здатний до репродуктивної реплікації у людських клітинах, в яких можуть репродуктивно реплікуватися MVA 575 або MVA 572. У найбільш бажаному варіанті реалізації винаходу MVA не здатний до репродуктивної реплікації у кератиноцитах людини лінії HaCaT, клітинах нирки ембріона людини лінії 293, клітинах остеосаркоми людини лінії 143B та клітинах аденокарциноми шийки матки людини лінії HeLa.

[0072] У бажаних варіантах реалізації винаходу модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA) відрізняється здатністю до репродуктивної реплікації у фібробластах ембріона курчати (CEF) in vitro, а також більшою, ніж у MVA-575, атенуйованістю в кератиноцитах людини лінії HaCaT, у клітинах остеосаркоми людини лінії 143B та клітинах аденокарциноми шийки матки людини лінії HeLa. У бажаному варіанті реалізації винаходу вірус MVA дозволяє досягнути у клітинах CEF ступеня ампліфікації, що складає більше ніж 500.

[0073] Будь-який антиген, включаючи антигени, що індують Т-клітинну реакцію, може бути експресований рекомбінантним MVA, пропонованим у даному винаході. Бажаними є вірусні, бактеріальні, грибові та ракові антигени. Вкрай бажаними антигенами є антигени HIV-1, антигени вірусу лихоманки денге, специфічний антиген простати (PSA) та простатична кисла фосфатаза (PAP), антигени HER-2/Neu, антигени сибірської виразки, антигени вірусу кору, вірусу грипу, пікорнавірусу, коронавірусу та антигени респіраторно-синцитіального вірусу. У

бажаному варіанті реалізації винаходу антиген являє собою чужорідний антиген або неоантиген.

[0074] Винахід охоплює способи створення рекомбінантних поксвірусів, бажано MVA, що включають вставку гетерологічної нуклеотидної послідовності у поксвірус таким чином, щоб

гетерологічна нуклеотидна послідовність була функціонально пов'язана з промотором Pr13.5.

[0075] Винахід охоплює застосування рекомбінантних поксвірусів, пропонованих у даному винаході, у виробництві ліків або вакцини для лікування або профілактики інфекцій та захворювань ссавців, у тому числі людини.

[0076] Винахід охоплює застосування рекомбінантних поксвірусів, пропонованих у даному винаході, для лікування або профілактики інфекцій та захворювань ссавців, у тому числі людини.

[0077] Винахід охоплює використання рекомбінантних поксвірусів, пропонованих у даному винаході, в якості вакцин, особливо для лікування або профілактики інфекцій та захворювань ссавців, у тому числі людини.

Набори, що містять рекомбінантний MVA

[0078] Винахід пропонує набори, що містять рекомбінантний поксвірусний вектор, бажано вірус MVA згідно даного винаходу. Набор може містити принаймні один, два, три, чотири чи більше контейнерів або флаконів з рекомбінантним поксвірусним вектором, бажано вірусом MVA, разом з інструкціями по введенню вірусу ссавцям, у тому числі людині. В інструкціях може бути вказано, що рекомбінантний вірус вводиться ссавцеві, бажано людині, в однократному або багатократному (тобто 2, 3, 4, 5, 6 і т. д.) дозуванні у визначені моменти часу (наприклад, через принаймні 4 тижні, через принаймні 6 тижнів, через принаймні 8 тижнів після попереднього введення). У бажаному варіанті реалізації винаходу в інструкціях вказано, що рекомбінантний вірус призначений для введення ссавцям, бажано людині, у принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3 або принаймні 4 дозуваннях.

Способи індукування CD8 Т-клітинної та/або гуморальної імунної реакції

[0079] Винахід пропонує способи індукування CD8 Т-клітинної та/або гуморальної імунної реакції у господаря. У бажаних варіантах реалізації винаходу спосіб включає проведення принаймні однієї, двох, трьох, чотирьох або п'яти імунізацій ссавця, у тому числі людини, рекомбінантним поксвірусом, бажано MVA, що містить промотор Pr13.5.

Введення господареві

[0080] Рекомбінантний поксвірус, бажано MVA згідно даного винаходу, може застосовуватись для лікування або профілактики інфекцій цілої низки ссавців, включаючи людей і навіть людей з імунodefіцитом. Таким чином, даний винахід пропонує також фармацевтичну композицію та вакцину для індукування імунної реакції у ссавця, у тому числі людини.

[0081] У бажаному варіанті реалізації винаходу вакцина містить рекомбінантний поксвірус, бажано MVA, в інтервалі концентрацій від  $10^4$  до  $10^9$  дози, що інфікує 50 % культури клітин TCID<sub>50</sub>/мл, бажано в інтервалі концентрацій від  $10^5$  до  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, більш бажано в інтервалі концентрацій від  $10^6$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл і найбільш бажано в інтервалі концентрацій від  $10^7$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, особливо  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл.

[0082] Бажана доза для вакцинації ссавця, бажано людини, складає від  $10^6$  до  $10^9$  TCID<sub>50</sub>, більш бажано  $10^7$  TCID<sub>50</sub> або  $10^8$  TCID<sub>50</sub>, особливо  $10^8$  TCID<sub>50</sub>.

[0083] Звичайно фармацевтична композиція може включати один чи більше фармацевтично прийнятних та/або схвалених носіїв, добавок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розріджувачів та/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути вода, фізіологічний розчин, гліцерол, етанол, масло, зволожуючі або емульгуючі агенти, рН-буферні речовини або подібні до них. Придатні носії зазвичай являють собою великі, повільно метаболізовані молекули, такі як білки, полісахариди, полілактиди, полігліколіди, полімерні амінокислоти, сополімери амінокислот, ліпідні агрегати або подібні до них.

[0084] Для виготовлення вакцин рекомбінантний поксвірус, бажано MVA згідно даного винаходу, може бути перетворений у фізіологічно прийнятну форму. Це може бути зроблено на основі досвіду виготовлення поксвірусних вакцин, що застосовувались для протипіспаної вакцинації (як описано Stickl et al. 1974).

[0085] Наприклад, очищений вірус може зберігатись за  $-80^\circ\text{C}$  з титром, що складає  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, у суміші з приблизно 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, рН 7,4. Для виготовлення вакцини для ін'єкції можна, наприклад, ліофілізувати  $10^2$ - $10^8$  вірусних частинок у 100 мкл - 1 мл фосфатно-сольового буфера (ФСБ) в присутності 2 % пептону та 1 % альбуміну людини в ампулі, бажано скляній ампулі. Крім того, вакцина для ін'єкції може бути виготовлена шляхом ступінчастої ліофілізації вірусу у лікарському препараті. Лікарський препарат може містити

допоміжні добавки, такі як маніт, декстран, цукор, гліцин, лактоза або полівінілпіролідон або інші добавки, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні білки (наприклад, сироватковий альбумін людини), придатні для введення *in vivo*. Потім скляна ампула запаюється, після чого вона може зберігатися за температур від 4 °C до кімнатної

5 впродовж кількох місяців. При цьому коли ампула не використовується, бажано зберігати її за температур до -20 °C.

[0086] У цілях вакцинації або лікування ліофілізат може бути розчинений у водному розчині, бажано фізіологічному розчині або буфері Тріс, і застосовуватись систематично або місцево, тобто парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язево, інтраназально або будь-

10 яким іншим шляхом введення, відомим кваліфікованому фахівцеві. Спосіб застосування, доза та кількість введень можуть бути оптимізовані спеціалістами в даній області техніки у відомому порядку. Проте найчастіше при вакцинації ссавця, бажано людини, друге введення здійснюють приблизно на другий - шостий тиждень після першого введення вакцини. Третє, четверте і

15 подальші введення найчастіше здійснюють приблизно на другий - шостий тиждень після попереднього введення.

[0087] Даний винахід пропонує способи імунізації ссавців, у тому числі людини. В одному варіанті реалізації винаходу здійснюється імунізація ссавців, у тому числі щурів, кроликів, мишей та людей, що включає введення дози рекомбінантного MVA ссавцеві, бажано людині. В

20 одному варіанті реалізації винаходу перша доза містить  $10^8$  TCID<sub>50</sub> рекомбінантного вірусу MVA, а друга і додаткові дози (тобто третя, четверта, п'ята і т. д.) містять  $10^8$  TCID<sub>50</sub> вірусу. Введення можуть здійснюватись у першому дозуванні (для первинної імунізації) та другому або подальших дозуванні(ях) (для реімунізації).

[0088] Імунізація може здійснюватись систематично або місцево, тобто парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язево, інтраназально або будь-яким іншим шляхом

25 введення, відомим кваліфікованому фахівцеві.

CD8 Т-клітинні та гуморальні імунні реакції

[0089] Імунізації рекомбінантним MVA, пропонованим у даному винаході, можуть індукувати стійку CD8 Т-клітинну реакцію. У бажаних варіантах реалізації винаходу після першої, другої, третьої, четвертої, п'ятої і т. д. імунізацій рекомбінантний MVA індукуює у ссавця, бажано людини, стійку CD8 Т-клітинну реакцію на кодований антиген, більш інтенсивну, ніж CD8 Т-клітинна реакція на імунодомінантну вірусну CD8 Т-клітинну антигенну детермінанту, кодовану вектором MVA, наприклад, TSYKFESV (SEQ ID NO:5). У бажаному варіанті реалізації винаходу після першої, другої, третьої, четвертої, п'ятої і т. д. імунізацій у ссавця, бажано людини, індукується імунодомінантна Т-клітинна реакція на кодований антиген. У бажаному варіанті реалізації

35 винаходу після другої, третьої, четвертої, п'ятої і т. д. імунізацій рекомбінантний MVA індукуює у ссавця, бажано людини, CD8 Т-клітинну реакцію на кодований антиген, яка охоплює принаймні 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % або 35 % від загальної кількості CD8 Т-клітин. У бажаному варіанті реалізації винаходу після другої, третьої, четвертої, п'ятої і т. д. імунізацій рекомбінантний MVA підсилює CD8 Т-клітинну реакцію на кодований антиген у ссавця, бажано людини, принаймні в

40 2, 3, 4, 5 або 10 разів тобто від 1 % до 2 %, 3 %, 4 %, 5 % або 10 % від загальної кількості CD8 Т-клітин, порівняно з реакцією на кодований антиген після однократного введення або підсилює CD8 Т-клітинну реакцію на кодований антиген у ссавця, бажано людини, принаймні в 2, 3, 4, 5 або 10 раз, порівняно з Т-клітинної реакцією на вірусний антиген (наприклад, B8R). У бажаному варіанті реалізації винаходу рекомбінантний MVA викликає CD8 Т-клітинну реакцію на

45 кодований антиген у ссавця, бажано людини, принаймні в 2, 3, 4, 5 або 10 разів більш інтенсивну, ніж Т-клітинна реакція на вірусний антиген (наприклад, B8R) після однократного введення. У найбажанішому варіанті реалізації винаходу CD8 Т-клітинна реакція на кодований антиген у ссавця, бажано людини, значно посилюється внаслідок 2, 3, 4 або 5 і т.д. імунізацій, порівняно з реакцією на пізній вірусний антиген (наприклад, B8R).

[0090] Інтенсивність CD8 Т-клітинної реакції може бути визначена, наприклад, шляхом забору приблизно 100-120 мкл крові у FACS/гепариновий буфер. МКПК можуть бути отримані шляхом лізису еритроцитів за допомогою лізуючого буфера для ЧКК. Потім може бути проведене одночасне фарбування OVA- і B8R-специфічних CD8 Т-клітин у зразках МКПК за допомогою анти-CD8 $\alpha$ -FITC, CD44-PerCPCy5.5 та декстрамерів MHC I класу у комплексі з

55 відповідними H-2Kb-зв'язуючими пептидами: SIINFEKL (SEQ ID NO:4) або TSYKFESV (SEQ ID NO:5). Декстрамер MHC I класу SIINFEKL (SEQ ID NO:4) може бути помічений PE, а декстрамер TSYKFESV (SEQ ID NO:5) – APC. Пофарбовані клітини можна аналізувати за допомогою проточної цитометрії в системі BD Biosciences BD LSR II. Можливо отримувати по десять тисяч CD8+Т-клітин у кожному зразку.

[0091] Крім того, інтенсивність CD8 Т-клітинної реакції може бути визначена шляхом забору крові у імунізованого ссавця, бажано людини, та відділення моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК). Вони можуть бути ресуспендовані у поживному середовищі, що містить 5 мкг/мл брефелдину А (BFA, "GolgiPlug", BD Biosciences) та 1 мкМ тестованих пептидів, включаючи пептиди проти імунодомінантних антигенних детермінант MVA (тобто TSYKFESV; SEQ ID NO:5) ("B8R") і пептиди, що походять від експресованого неоантигена. Потім МКПК можна інкубувати протягом 5 год. за 37 °C у 5 % CO<sub>2</sub>, збирати, ресуспендувати у 3 мл холодного ФСБ/10 % ФТС/2 мМ ЕДТК і залишати на ніч за 4 °C. Наступного дня МКПК можуть бути пофарбовані антитілами анти-CD8a-Рас-Blue (клон 53-6.7), анти-CD62L-PE-Су7, анти-CD44-APC-Alexa 750 та анти-CD4-PerCP-Су5.5 (всі антитіла від BD Biosciences). МКПК можна інкубувати із вказаними антитілами у необхідних розведеннях протягом 30 хв за 4 °C у темряві. Після промивки клітини можуть бути зафіксовані та пермеабілізовані за допомогою набору Cytotfix/Cytoperm™ Plus (BD Biosciences) згідно з інструкціями виробника. Після промивки МКПК може бути проведене фарбування внутрішньоклітинного інтерферону-γ (IFN-γ) за допомогою FITC-кон'югованого анти-IFN-γ антитіла (BD biosciences), розведеного у пермеабілізуючому буфері для відмивки (BD Biosciences). Пофарбовані клітини можна аналізувати за допомогою проточної цитометрії.

[0092] Імунізації рекомбінантним MVA, пропонованим у даному винаході, можуть індукувати стійку гуморальну імунну реакцію. Гуморальні імунні реакції можуть бути оцінені за допомогою твердофазного ІФА.

[0093] У межах даного винаходу "стійка CD8 Т-клітинна реакція" означає більший процент неоантиген-специфічних CD8 Т-клітин, ніж процент, який спостерігається для такого самого MVA-конструкта, що містить промотор PrS (5'AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAA 3"; SEQ ID NO:6), після однократної імунізації. У деяких варіантах реалізації винаходу при CD8 Т-клітинної реакції спостерігається принаймні в 1,5 або 2 рази більше неоантиген-специфічних CD8 Т-клітин, ніж для такого самого MVA-конструкта, що містить промотор PrS (SEQ ID NO:6), після однократної імунізації.

[0094] У межах даного винаходу "стійка гуморальна імунна реакція" означає титр антитіл, більш високий, ніж титр антитіл, який спостерігається для такого самого MVA-конструкта, що містить промотор PrS (SEQ ID NO:6), після однократної імунізації. У деяких варіантах реалізації винаходу титр антитіл принаймні в 1,5 або 2 рази більший, ніж титр антитіл, що спостерігається для такого самого MVA-конструкта, що містить промотор PrS (SEQ ID NO:6), після однократної імунізації.

[0095] Тип індукованої рекомбінантним MVA реакції на неоантиген - "стійка CD8 Т-клітинна реакція" або "стійка гуморальна імунна реакція" - може бути визначений, як описано нижче у прикладах. Наприклад, як MVA13.5 short, так і MVA13.5 long індукують "стійку CD8 Т-клітинну реакцію", як визначено в даному документі. MVA13.5 long індукує "стійку гуморальну імунну реакцію", як визначено в даному документі.

[0096] Незважаючи на те що спосіб бажано включає однократне введення вектора, у деяких варіантах реалізації винаходу можуть здійснюватися дві, три, чотири, п'ять, шість, сім чи більше імунізацій ссавця, бажано людини, рекомбінантним MVA.

[0097] У бажаних варіантах реалізації винаходу кодований антиген являє собою бактеріальний, вірусний або пухлинний антиген. У бажаному варіанті реалізації винаходу антиген є чужорідним антигеном для ссавця, у тому числі людини.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1. Конструювання MVA-рекомбінантів

[0098] Клітини HeLa інфікували MVA-BN при множинності зараження (MOI), що складала 10 (10 TCID<sub>50</sub> на клітину), а на 2-у та 8-у години від початку інфекції отримували тотальну РНК. Синтезували специфічні праймери до різних ORF MVA і проводили ПЛР із швидкою ампліфікацією кінців кДНК (FirstChoice® RLM-RACE Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) для отримання ПЛР-продуктів, що відповідають РНК MVA, які кодують ці ORF. ПЛР-продукти секвенували з метою визначення сайтів ініціації транскрипції. Виходячи з цих даних було визначено промотори для транскрипції РНК, які кодують ці ORF. У MVA-конструкти вставляли промотори MVA для наступних ORF (Baur et al., Journal of Virology, Vol. 84 (17): 8743–8752 (2010)) для контролю експресії гена овальбуміну (OVA): MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) та MVA170R (B3R; WR 185).

##### Приклад 2. Промотор-залежні рівні експресії РНК in vitro

[0099] Інфікування клітин HeLa рекомбінантними вірусами MVA при MOI, що складала 10, здійснювали за допомогою прикріплення вірусів на льоду протягом 1 год. Після прикріплення клітини промивали і збирали у нульовий момент часу (0 год.) або інкубували за 37 °C для збору

в інші моменти часу. Зразки відбирали на 0,5, 1, 2, 4 і 8 год. від початку інфекції. Клітини гомогенізували, і екстрагували тотальну РНК. Проводили ДНКазне розщеплення РНК, після чого за допомогою оліго(dT)-праймування була синтезована кДНК. Отримані зразки кДНК використовували в якості матриці для одночасної ампліфікації кДНК OVA та актину за допомогою Taqman-qPCR. Реакцію проводили в циклері AB7500 від Applied Biosystem. Результати представлені на Фігурі 3.

Приклад 3. Промотор-залежні рівні білкової експресії in vitro

[00100] Клітини HeLa культивували у DMEM із додаванням 10 % ФТС. Клітини HeLa інфікували при MOI рекомбінантного вірусу MVA, що складала 10 (10 TCID<sub>50</sub> на клітину). Інфіковані клітини відбирали на 1, 2, 4, 6, 8 і 24 год. від початку інфекції, фіксували і пермеабілізували. У половині клітин кожного зразка проводили фарбування білка OVA за допомогою антитіл кролика до OVA курчати, а в другій половині проводили фарбування антигенів MVA за допомогою поліклональних антитіл кролика до VACV. Зразки аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD Biosciences) та програмного забезпечення FlowJo. Результати представлені на Фігурі 4.

Приклад 4. Імунізації та забір крові у мишей

[00101] У цьому дослідженні використовували групи мишей (C57/Bl6). У кожній групі проводили сумарно три імунізації. В якості контролю імунних реакцій використовували ФСБ-ін'єктовану групу. Для оцінки імунних реакцій протягом дослідження забирали кров із хвостової вени.

[00102] Мишей імунізували інтраперитонеально при 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> відповідних вірусів MVA у розчині ФСБ (300 мкл, загальний об'єм) на 0, 4 і 8 тижні. Забори крові для аналізу Т-клітин проводили на перший тиждень після кожної імунізації, а забори крові для аналізу антитіл - на третій тиждень після кожної імунізації.

Приклад 5. Фарбування Т-клітин і визначення антитіл

[00103] У кожної миші забирали приблизно 100-120 мкл крові у FACS/гепариновий буфер. МКПК отримували шляхом лізису еритроцитів за допомогою лізуючого буфера для ЧКК. Потім проводили одночасне фарбування OVA- і B8R-специфічних CD8 Т-клітин у зразках МКПК за допомогою анти-CD8α-FITC, CD44-PerCPCy5.5 і декстрамерів МНС І класу, у комплексі з відповідними Н-2Кb-зв'язуючими пептидами: SIINFEKL (SEQ ID NO:4) або TSYKFESV (SEQ ID NO:5). Декстрамер МНС І класу SIINFEKL (SEQ ID NO:4) був помічений PE, а декстрамер TSYKFESV (SEQ ID NO:5) – APC. Пофарбовані клітини аналізували за допомогою проточної цитометрії у системі BD Biosciences BD LSR II. Отримували по десять тисяч CD8+Т-клітин у кожному зразку. Результати представлені на Фігурах 5-6.

[00104] Отримували сироватку з цільної крові. Для визначення специфічних антитіл проводили твердофазний ІФА овальбуміну та твердофазний ІФА MVA (набір Serazym від Seramun Diagnostika GmbH, Heidesee, Germany). Результати представлені на Фігурі 7.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BAVARIAN NORDIC A/S

<120> ПРОМОТОР PR13.5 ДЛЯ СТІЙКИХ Т-КЛІТИННИХ ТА ГУМОРАЛЬНИХ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ

<130> BN83PCT

<140> 61/719,429

<141> 2012-10-28

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> ДНК

<213> Вірус вісповакцини

<400> 1

taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agta

44

<210> 2

<211> 124

<212> ДНК

<213> Вірус вісповакцини

<400> 2

taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agtattgctc ttgtgactag

60

agacttttagt taaggtagtg taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt

120

agta

124

<210> 3

<211> 273

<212> ДНК

<213> Вірус вісповакцини

<400> 3

tagacgacat gatagaggag gtatccattg acgataatcg tttatcaaca ctaccgtag

60

aaattagaca ttgtattttc tggtagcgt tctataaaa atagaaacta taatcatata

120

atagtgtagg ttggtagtag tgctcttgtag actagagact ttagttaagg tactgtaaaa

180

atagaaacta taatcatata atagtgtagg ttggtagtag ggtactcgtg attaatttta

240

ttgttaaact tgctcctaag tcttattaat atg

273

<210> 4

<211> 8

<212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Пептид OVA

<400> 4

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
 1. 5

<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Пептид B8R

<400> 5

Thr Ser Tyr Lys Phe Glu Ser Val  
 1. 5

<210> 6  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний промотор

<400> 6  
 aaaaattgaa attttatttt ttttttttgg aatataa

37

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний промотор

<400> 7  
 aatttttaaat atataa

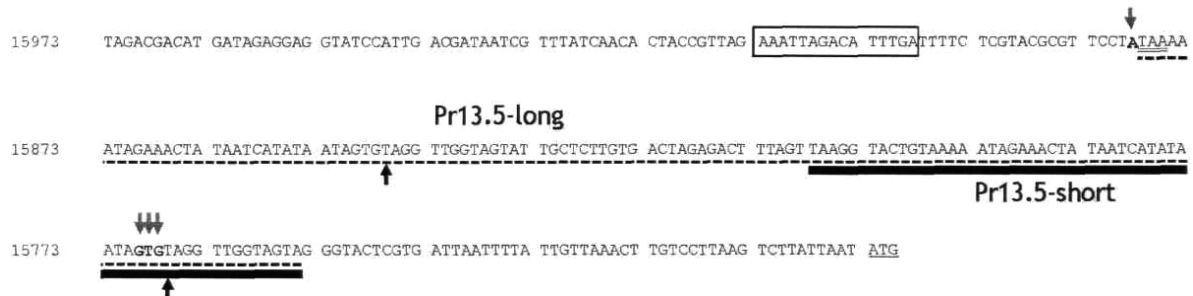
16

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

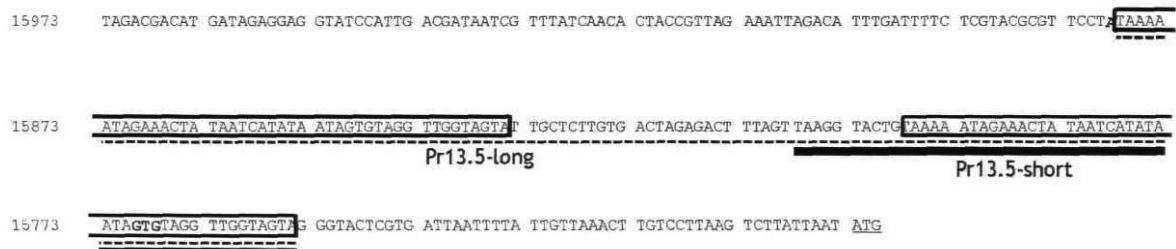
- 5 1. Рекombінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA) для застосування при індукції стійкої CD8 Т-клітинної реакції на неоантиген у людини, що включає проведення одного чи більше введень людині зазначеного рекombінантного модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA);
- 10 причому рекombінантний MVA містить промотор Pr13.5, функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, що кодує неоантиген,
- причому промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається зі щонайменше 40 основ, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 1, і де щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності розмежовані 30-40 нуклеотидами.
- 15 2. MVA для застосування за п. 1, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка щонайменше на 98 % ідентична SEQ ID NO: 1.



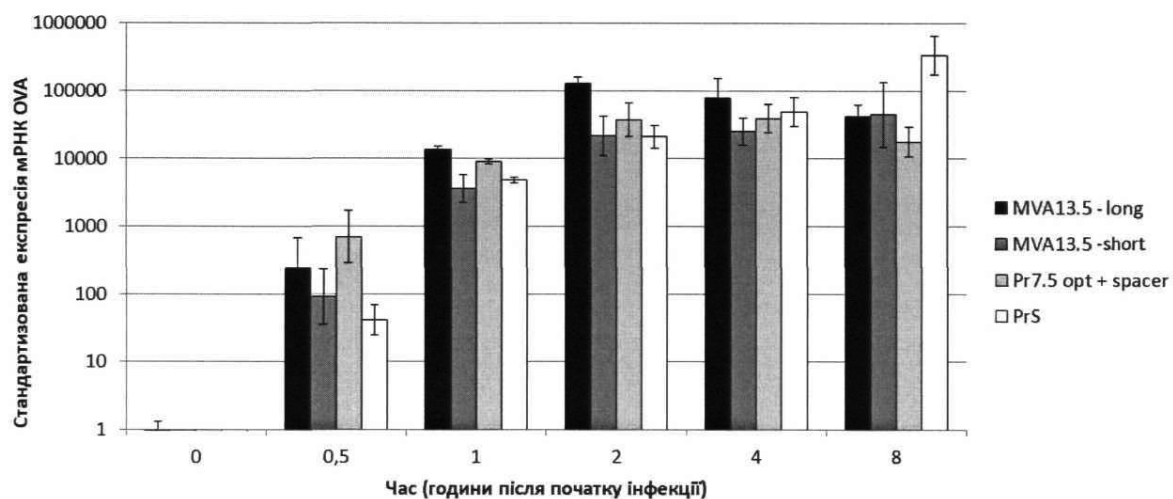
3. MVA для застосування за пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка на 100 % ідентична SEQ ID NO: 1.
- 5 4. MVA для застосування за п. 1, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 нуклеотидів, яка щонайменше на 100 % ідентична SEQ ID NO: 1.
5. MVA для застосування за п. 1, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить SEQ ID NO: 2.
- 10 6. Рекombінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), що містить промотор Pr13.5, функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, яка кодує неоантиген, причому промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 1, і де щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності розмежовані 30-40 нуклеотидами.
- 15 7. Рекombінантний MVA за п. 6, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка щонайменше на 98 % ідентична SEQ ID NO: 1.
8. Рекombінантний MVA за пп. 6-7, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка на 100 % ідентична SEQ ID NO: 1.
- 20 9. Рекombінантний MVA за п. 6, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 нуклеотидів, яка на 100 % ідентична SEQ ID NO: 1.
10. Рекombінантний MVA за п. 6, який **відрізняється** тим, що промотор Pr13.5 містить SEQ ID NO: 2.
- 25 11. Рекombінантний поксвірус, що містить промотор Pr13.5, функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, яка кодує неоантиген, причому промотор Pr13.5 містить щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності, що складається із щонайменше 40 основ, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 1, і де щонайменше 2 копії нуклеотидної послідовності розмежовані 30-40 нуклеотидами.



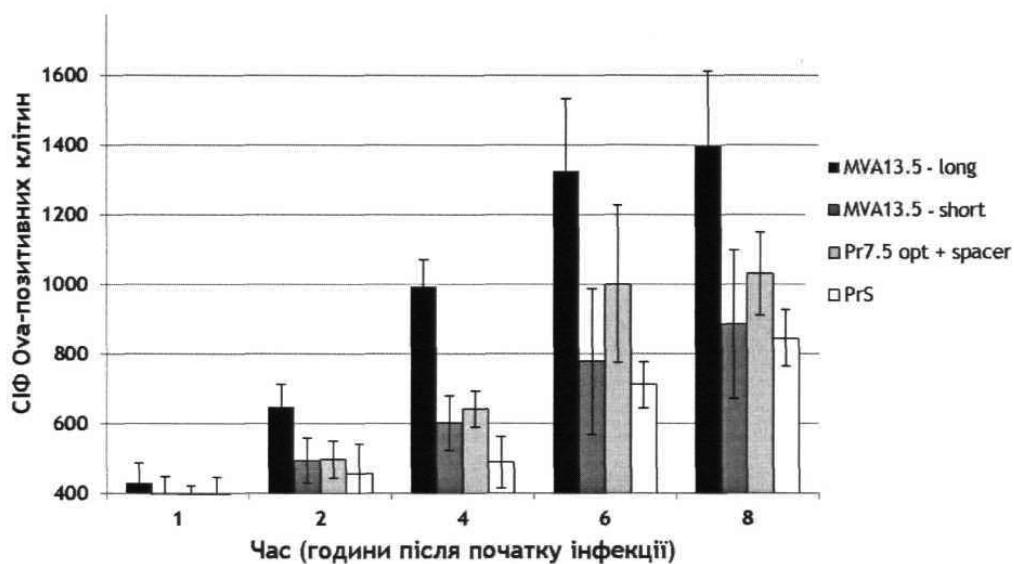
Фігура 1



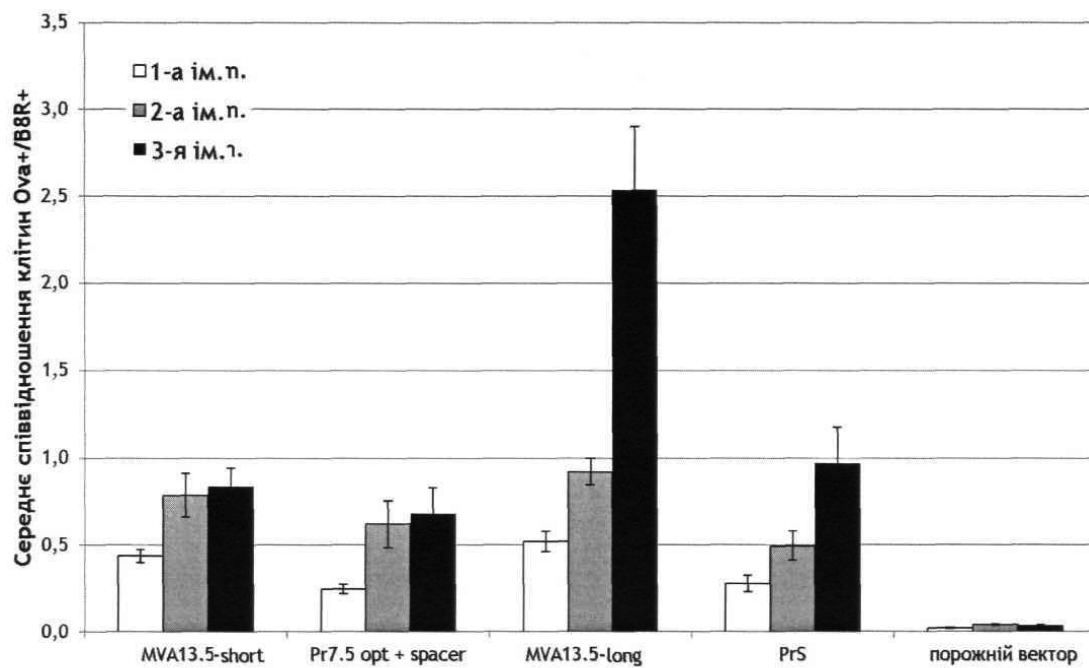
Фігура 2



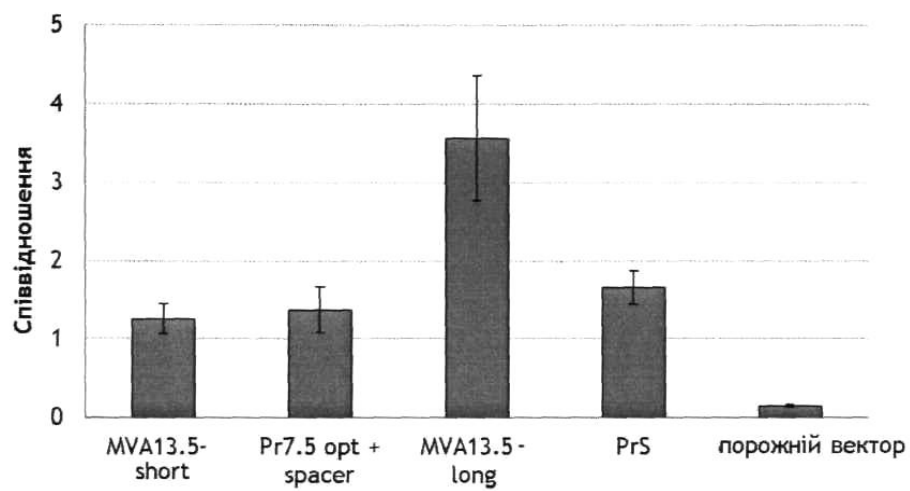
Фігура 3



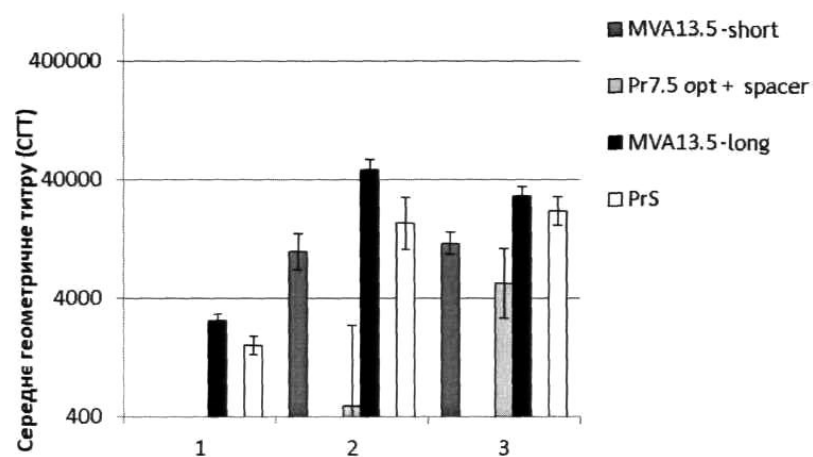
Фігура 4



Фігура 5



Фігура 6



Фігура 7А

Промотор	Співвідношення СТГ порівняно з PrS		
	1 <sup>а</sup> імунізація	2 <sup>а</sup> імунізація	3 <sup>а</sup> імунізація
PrS	1,0	1,0	1,0
Pr13.5-short	0,1	0,6	0,5
Pr13.5-long	1,6	2,8	1,3
Pr7.5 opt + spacer	0,0	0,0	0,2
MVA50L + PrSSL	0,1	0,2	0,1
MVA170 + PrSSL	0,0	0,8	0,5

Фігура 7В

<b>Вихідна посл.</b>	<b>1</b>	<b>TAAAAATAGAAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA</b>	<b>44</b>
<u>383866716</u>	20492	.....	20449
<u>383866716</u>	20410	.....-	20369
<u>373449558</u>	15874	.....	15831
<u>373449558</u>	15954	.....	15911
<u>373449318</u>	15878	.....	15835
<u>373449318</u>	15958	.....	15915
<u>373449318</u>	182742	.....	182785
<u>373449318</u>	182822	.....	182865
<u>373449076</u>	15864	.....	15821
<u>373449076</u>	15944	.....	15901
<u>373449076</u>	182666	.....	182709
<u>373449076</u>	182746	.....	182789
<u>373448847</u>	15961	.....	15918
<u>373448847</u>	16041	.....	15998
<u>373448604</u>	15956	.....	15913
<u>373448604</u>	16036	.....	15993
<u>373448604</u>	182785	.....	182828
<u>373448604</u>	182865	.....	182908
<u>373448367</u>	15865	.....	15822
<u>373448367</u>	15945	.....	15902
<u>373448367</u>	182603	.....	182646
<u>373448367</u>	182683	.....	182726
<u>373448133</u>	15832	.....	15789
<u>373448133</u>	15912	.....	15869
<u>373447891</u>	15957	.....	15914
<u>373447891</u>	16037	.....	15994
<u>373447891</u>	182788	.....	182831
<u>373447891</u>	182868	.....	182911
<u>373447653</u>	15866	.....	15823
<u>373447653</u>	15946	.....	15903
<u>373447653</u>	182609	.....	182652
<u>373447653</u>	182689	.....	182732
<u>373447414</u>	15833	.....	15790
<u>373447414</u>	15913	.....	15870
<u>373447414</u>	182552	.....	182595
<u>373447414</u>	182632	.....	182675
<u>373447175</u>	15860	.....	15817
<u>373447175</u>	15940	.....	15897
<u>373447175</u>	182579	.....	182622
<u>373447175</u>	182659	.....	182702
<u>325558812</u>	28969	.....	28926
<u>325558812</u>	28889	.....T.....	28847
<u>325558595</u>	30006	.....	29963
<u>325558595</u>	29924	.....	29884
<u>325558381</u>	27900	.....	27857
<u>325558381</u>	27817	.....C.....	27777
<u>325558165</u>	30228	.....	30185
<u>325558165</u>	30148	.....T.....	30106
<u>325557951</u>	27554	.....	27511
<u>325557951</u>	27472	.....C.....	27432
<u>167412463</u>	12323	.....	12280
<u>167412463</u>	12403	.....	12360

Фігура 8А

<u>160857876</u>	13468	.....	13425
<u>160857876</u>	13548	.....	13505
<u>149786253</u>	9445	.....	9402
<u>149786253</u>	9525	.....	9482
<u>119352440</u>	15780	.....	15737
<u>119352440</u>	15860	.....	15817
<u>90819652</u>	18373	.....	18330
<u>90819652</u>	18453	.....	18410
<u>115607420</u>	9159	.....	9116
<u>115607420</u>	9239	.....	9196
<u>115607419</u>	9159	.....	9116
<u>115607419</u>	9239	.....	9196
<u>115607418</u>	9359	.....	9316
<u>115607418</u>	9439	.....	9396
<u>115607417</u>	9359	.....	9316
<u>115607417</u>	9439	.....	9396
<u>111184167</u>	24167	.....	24124
<u>111184167</u>	24247	.....T.....	24204
<u>109726482</u>	7441	.....	7398
<u>109726482</u>	7517	.....	7474
<u>109726279</u>	7443	.....	7400
<u>109726279</u>	7519	.....	7476
<u>109726076</u>	7652	.....	7609
<u>109726076</u>	7728	.....	7685
<u>109725872</u>	7441	.....	7398
<u>109725872</u>	7517	.....	7474
<u>109725669</u>	7441	.....	7398
<u>109725669</u>	7517	.....	7474
<u>109725465</u>	7441	.....	7398
<u>109725465</u>	7517	.....	7474
<u>109725262</u>	7511	.....	7468
<u>109725262</u>	7587	.....	7544
<u>109725056</u>	7650	.....	7607
<u>109725056</u>	7726	.....	7683
<u>109724854</u>	7371	.....	7328
<u>109724854</u>	7447	.....	7404
<u>109724650</u>	7785	.....	7742
<u>109724650</u>	7861	.....	7818
<u>109724445</u>	7649	.....	7606
<u>109724445</u>	7725	.....	7682
<u>109724243</u>	7579	.....	7536
<u>109724243</u>	7655	.....	7612
<u>109724039</u>	7441	.....	7398
<u>109724039</u>	7517	.....	7474
<u>94490104</u>	7441	.....	7398
<u>94490104</u>	7517	.....	7474
<u>94489896</u>	7422	.....	7379
<u>94489896</u>	7498	.....	7455
<u>94489695</u>	7441	.....	7398
<u>94489695</u>	7517	.....	7474
<u>94489496</u>	7441	.....	7398
<u>94489496</u>	7517	.....	7474

**Фігура 8В**

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

**Фігура 8С**

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

**Фігура 8D**



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

## Φίγυρα 8E

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

## Φίγυρα 8F

<a href="#">gi 383866716 JQ410350.1</a>	Вірус віспи мишей з колекції AKTK:VR-1431, повний геном
<a href="#">gi 373449558 JN654986.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP21, повний геном
<a href="#">gi 373449318 JN654985.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP20, повний геном
<a href="#">gi 373449076 JN654984.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP19, повний геном
<a href="#">gi 373448847 JN654983.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP17, повний геном
<a href="#">gi 373448604 JN654982.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP16, повний геном
<a href="#">gi 373448367 JN654981.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP15, повний геном
<a href="#">gi 373448133 JN654980.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP13, повний геном
<a href="#">gi 373447891 JN654979.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP12, повний геном
<a href="#">gi 373447653 JN654978.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP11, повний геном
<a href="#">gi 373447414 JN654977.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP10, повний геном
<a href="#">gi 373447175 JN654976.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Dryvax, клон DPP9, повний геном
<a href="#">gi 325558812 HQ420898.1</a>	Вірус віспи корів Germany_2002_MKY, повний геном
<a href="#">gi 325558595 HQ420897.1</a>	Вірус віспи корів Germany_1998_2, повний геном
<a href="#">gi 325558381 HQ420896.1</a>	Вірус віспи корів Germany_1990_2, повний геном
<a href="#">gi 325558165 HQ420895.1</a>	Вірус віспи корів Germany_1980_EP4, повний геном
<a href="#">gi 325557951 HQ420894.1</a>	Вірус віспи корів France_2001_Nancy, повний геном
<a href="#">gi 167412463 EU410304.1</a>	Вірус вісповакцини GLV-1h68, повний геном
<a href="#">gi 160857876 AM501482.1</a>	Вірус вісповакцини Анкара, хоріоалантоїсний вірус вісповакцини Анкара (CVA), екзом
<a href="#">gi 149786253 EF675191.1</a>	Штам вірусу вісповакцини MVATGN33.1, модифікований вірус Анкара, повний геном
<a href="#">gi 119352440 DQ121394.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Lister, клон VACV107, повний геном
<a href="#">gi 90819652 DQ439815.1</a>	Штам вірусу вісповакцини DUKE, повний геном
<a href="#">gi 115607420 DQ983239.1</a>	Штам вірусу вісповакцини AGR-MVA-572, прегеономна послідовність
<a href="#">gi 115607419 DQ983238.1</a>	Штам вірусу вісповакцини MVA-BN, геномна послідовність
<a href="#">gi 115607418 DQ983237.1</a>	Штам вірусу вісповакцини MVA-572, геномна послідовність
<a href="#">gi 115607417 DQ983236.1</a>	Штам вірусу вісповакцини MVA-I721, геномна послідовність
<a href="#">gi 111184167 DQ792504.1</a>	Ізолят вірусу віспи лошадей MNR-76, повний геном
<a href="#">gi 109726482 DQ437592.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Syria 1972 V72-199, повний геном
<a href="#">gi 109726279 DQ437591.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Sumatra 1970 V70-222, повний геном
<a href="#">gi 109726076 DQ437590.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Somalia 1977, повний геном
<a href="#">gi 109725872 DQ437589.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Pakistan 1969 (Rafiq Lahore), повна послідовність
<a href="#">gi 109725669 DQ437588.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Nepal 1973, повний геном
<a href="#">gi 109725465 DQ437587.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Iran 1972 2602 Tabriz, повний геном
<a href="#">gi 109725262 DQ437586.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи India 1964 7125 Vellore, повний геном

## Фігура 9А

<a href="#">gi 109725056 DQ437585.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи India 1964 7124 Vellore, повний геном
<a href="#">gi 109724854 DQ437584.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Germany 1958 Heidelberg, повний геном
<a href="#">gi 109724650 DQ437583.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Congo 1970, повний геном
<a href="#">gi 109724445 DQ437582.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи China Horn 1948, повний геном
<a href="#">gi 109724243 DQ437581.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Bangladesh 1975 v75-550 Banu, повний геном
<a href="#">gi 109724039 DQ437580.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Afghanistan 1970 Variolator 4, повний геном
<a href="#">gi 94490104 DQ441448.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Yugoslavia 1972 V72-164, повний геном
<a href="#">gi 94489896 DQ441447.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи United Kingdom 1952 Butler, повний геном
<a href="#">gi 94489695 DQ441446.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи United Kingdom 1947 Higgins (Staffordshire), повний геном
<a href="#">gi 94489496 DQ441445.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи United Kingdom 1946 Hinden (Middlesex), повний геном
<a href="#">gi 94489293 DQ441444.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи United Kingdom 1946 Harvey, повний геном
<a href="#">gi 94489094 DQ441443.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Tanzania 1965 kembula, повний геном
<a href="#">gi 94488894 DQ441442.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Sumatra 1970 V70-228, повний геном
<a href="#">gi 94488693 DQ441441.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Sudan 1947 (Rumbec), повний геном
<a href="#">gi 94488492 DQ441440.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Sudan 1947 (Juba), повний геном
<a href="#">gi 94488292 DQ441439.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Somalia 1977 (V77-1605), повний геном
<a href="#">gi 94488092 DQ441438.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Somalia 1977 (V77-1252), повний геном
<a href="#">gi 94487887 DQ441437.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Sierra Leone 1969 (V68-258), повний геном
<a href="#">gi 94487685 DQ441436.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи South Africa 1965 (103 T'vaal, Nelspruit), повний геном
<a href="#">gi 94487484 DQ441435.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи South Africa 1965 (102 Natal, Ingwavuma), повний геном
<a href="#">gi 94487278 DQ441434.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Niger 1969 (001, importation from Nigeria), повний геном
<a href="#">gi 94487078 DQ441433.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Kuwait 1967 (K1629), повний геном
<a href="#">gi 94486875 DQ441432.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Korea 1947 (Lee, Masterseed), повний геном
<a href="#">gi 94486673 DQ441431.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Japan 1951 (Stillwell, Masterseed), повний геном
<a href="#">gi 94486471 DQ441430.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Japan 1951 (Harper, Masterseed), повний геном
<a href="#">gi 94486268 DQ441429.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Japan 1946 (Yamada MS-2(A) Tokyo), повний геном
<a href="#">gi 94486065 DQ441428.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи India 1953 (New Delhi), повний геном
<a href="#">gi 94485863 DQ441427.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи India 1953 (Kali-Muthu-M50 Madras), повний геном

## Фігура 9В

<a href="#">gi 94485659 DQ441426.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Guinea 1969 (005), повний геном
<a href="#">gi 94485457 DQ441425.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Ethiopia 1972 (Eth17 R14-1X-72 Addis), повний геном
<a href="#">gi 94485254 DQ441424.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Ethiopia 1972 (Eth16 R14-1X-72 Addis), повний геном
<a href="#">gi 94485053 DQ441423.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Congo 9 1970 (v74-227 Gispén), повний геном
<a href="#">gi 94484855 DQ441422.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Bangladesh 1974 (Solaiman), повний геном
<a href="#">gi 94484657 DQ441421.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Bangladesh 1974 (Shahzaman), повний геном
<a href="#">gi 94484460 DQ441420.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Bangladesh 1974 (nur islam), повний геном
<a href="#">gi 94484252 DQ441419.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo), повний геном
<a href="#">gi 94484050 DQ441418.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Botswana 1973 (v73-225), повний геном
<a href="#">gi 94483847 DQ441417.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Botswana 1972 (v72-143), повний геном
<a href="#">gi 94483641 DQ441416.1</a>	Штам вірусу натуральної віспи Benin, Dahomey 1968 (v68-59), повний геном
<a href="#">gi 90660453 DQ437594.1</a>	Вірус віспи гололапих піщанок, штам Dahomey 1968, повний геном
<a href="#">gi 90660233 DQ437593.1</a>	Вірус віспи корів Germany 91-3, повний геном
<a href="#">gi 38348858 AY313847.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Acambis, клон 2000, повний геном
<a href="#">gi 37551435 AY313848.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Acambis, клон 3, повний геном
<a href="#">gi 88900616 DQ377945.1</a>	Штам вірусу вісповакцини 3737, повний геном
<a href="#">gi 44971363 AY484669.1</a>	Вірус віспи кроликів, повний геном
<a href="#">gi 47088326 AY603355.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Acambis 3000, модифікований вірус Анкара (MVA), повний геном
<a href="#">gi 56713341 AY678275.1</a>	Штам вірусу вісповакцини LC16m8, повний геном
<a href="#">gi 56713625 AY678277.1</a>	Штам вірусу вісповакцини LC16mO, повний геном
<a href="#">gi 56713624 AY678276.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Lister, повний геном
<a href="#">gi 18482913 AF438165.1</a>	Вірус віспи верблюдів M-96 Kazakhstan, повний геном
<a href="#">gi 22123748 AF012825.2</a>	Штам вірусу віспи мишей Moscow, повний геном
<a href="#">gi 19717929 AY009089.1</a>	Вірус віспи верблюдів CMS, повний геном
<a href="#">gi 2772662 U94848.1</a>	Штам вірусу вісповакцини Анкара, повна геномна послідовність
<a href="#">gi 29692106 AY243312.1</a>	Вірус вісповакцини WR, повний геном
<a href="#">gi 5830555 Y16780.1</a>	Вірус малої віспи, повний геном
<a href="#">gi 885796 U18340.1</a>	Вірус натуральної віспи Somalia-1977, ліва варіабельна ділянка
<a href="#">gi 885724 U18338.1</a>	Вірус натуральної віспи Garcia-1966, ліва близькотермінальна ділянка
<a href="#">gi 885686 U18337.1</a>	Вірус натуральної віспи Congo-1965, ліва близькотермінальна ділянка
<a href="#">gi 456758 X69198.1</a>	Вірус натуральної віспи DNA, повний геном
<a href="#">gi 6969640 AF095689.1</a>	Вірус вісповакцини (штам Tian Tan), повний геном
<a href="#">gi 623595 L22579.1</a>	Вірус великої віспи (штам Bangladesh-1975), повний геном

## Фігура 9С

<a href="#"><u>gi 335691 M22812.1</u></a>	Вірус вісповакцини, геном, ліва ділянка
<a href="#"><u>gi 335317 M35027.1</u></a>	Вірус вісповакцини Copenhagen, повний геном
<a href="#"><u>gi 325559026 HQ420899.1</u></a>	Вірус віспи корів Norway_1994_MAN, повний геном
<a href="#"><u>gi 325514012 HQ407377.1</u></a>	Вірус віспи корів Austria 1999, повний геном
<a href="#"><u>gi 325559238 HQ420900.1</u></a>	Вірус віспи корів UK2000_K2984, повний геном
<a href="#"><u>gi 30795158 AF482758.2</u></a>	Вірус віспи корів Brighton Red, повний геном
<a href="#"><u>gi 325557737 HQ420893.1</u></a>	Вірус віспи корів Finland_2000_MAN, повний геном
<a href="#"><u>gi 68449479 DQ011157.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп USA_2003_039, повний геном
<a href="#"><u>gi 68449280 DQ011156.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Liberia_1970_184, повний геном
<a href="#"><u>gi 68448677 DQ011153.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп USA_2003_044, повний геном
<a href="#"><u>gi 59858806 AY753185.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп COP-58, повний геном
<a href="#"><u>gi 58220470 AY741551.1</u></a>	Ізолят вірусу віспи мавп Sierra Leone, повний геном
<a href="#"><u>gi 51342166 AY603973.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп MPXV-WRAIR7-61, повний геном
<a href="#"><u>gi 30519405 X94355.2</u></a>	Вірус віспи корів GRI-90, повний геном
<a href="#"><u>gi 323098609 HQ857563.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп D14L knockout, повний геном
<a href="#"><u>gi 323098410 HQ857562.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп V79-I-005, повний геном
<a href="#"><u>gi 300872625 HM172544.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Zaire 1979-005, повний геном
<a href="#"><u>gi 56236951 AY743598.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Congo-8, часткова послідовність
<a href="#"><u>gi 68449077 DQ011155.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Zaire_1979-005, повний геном
<a href="#"><u>gi 68448876 DQ011154.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Congo_2003_358, повний геном
<a href="#"><u>gi 17529780 AF380138.1</u></a>	Штам вірусу віспи мавп Zaire-96-I-16, повний геном

## Фігура 9D

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601