



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123385** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 14/135 (2006.01)

C12N 15/45 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2015 01765**
(22) Дата подання заявки: **15.03.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **01.04.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/678,367, 12005594.2**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **01.08.2012, 01.08.2012**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.06.2015, Бюл.№ 12**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **31.03.2021, Бюл.№ 13**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2013/055483, 15.03.2013**
(72) Винахідник(и): **Кемінай Цедрік (DE), Штайгервальд Робін (DE), Чаплін Пол (DE)**
(73) Володілець (володільці): **БАВАРІАН НОРДІК А/С, Hejreskovvej 10A, DK-3490 Kvistgaard, Denmark (DK)**
(74) Представник: **Бочаров Максим Анатолійович**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2012085936 A2, 28.06.2012
Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA / Linda S. Wyatt, Stephen S. Whitehead, Katherine A. Venanzi et al. // Vaccine – 1999. - Vol. 18. - P. 392-397
Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology / Leon de Waal, Linda S. Wyatt, Selma Yüksel et al. // Vaccine – 2004. - Vol. 22. - P. 923–926
Magdalena M. G. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors / M. Magdalena Gherardi, Mariano Esteban // Journal of General Virology – 2005. - Vol. 86. - P. 2925–2936
Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells / Stephan Halle, Hélène C. Dujardin, Nadja Bakocevic et al. // Journal of experimental medicine – 2009. - Vol. 206 (12). - P. 2593–2601
WO 2009038270 A1, 26.03.2009
FR 2798857 A1, 30.03.2001
WO 0228422 A2, 11.04.2002
US 2012009254 A1, 12.01.2012
Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice / Yuanhui Fu, Jinsheng He, Xianxian Zheng et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2009. - Vol. 381 (4). - P. 528–532
Fretzayas A. The Challenges of RSV Vaccines. Where do we Stand? / Andrew Fretzayas, Maria Moustaki // Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. - 2010. - Vol. 5 (2). - P. 99-108

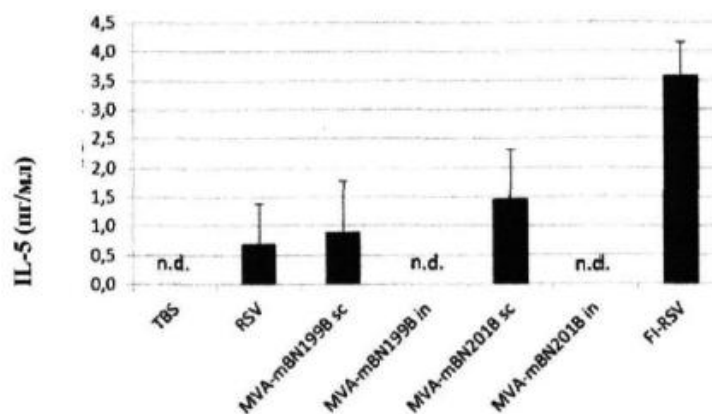
UA 123385 C2

- (56) Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge / Adriaan F.G. Antonis, Robbert G. van der Mostb, Yasemin Saez et al. // *Vaccine*. - 2007. - Vol. 25 (25). - P. 4818–4827
- RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection / Hongzhan Wu, Vida A. Dennis, Shreekumar R. Pillai et al. // *Virus Research*. - 2009. - Vol. 145 (1). - P. 39–47
- A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus / Lien Anh Ha Doa, H. Rogier van Doorna, Juliet E. Bryant et al. // *Journal of Virological Methods*. - 2012. - Vol. 179. - P. 250–255
- Development of a quantitative TaqMan RT-PCR for respiratory syncytial virus / G. Dewhurst-Maridor, V. Simonet, J.E. Bornand et al. // *Journal of Virological Methods*. - 2004. - Vol. - 120. - P. 41–49
- Hurwitz J. L. Respiratory syncytial virus vaccine development / Julia L Hurwitz // *Expert Review of Vaccines*. - 2011. - Vol. 10 (10). - P. 1415–1433

(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ МОДИФІКОВАНИЙ ВІРУС ВІСПОВАКЦИНИ АНКARA (MVA) ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АБО ПОПЕРЕДЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙ ВІРУСУ RSV

(57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантного модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (MVA), який містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн F респіраторно-синцитіального вірусу (RSV), нуклеотидну послідовність, яка кодує RSV-нуклеокапсидний білок N та один матриксний білок M2 RSV; і одну або дві нуклеотидні послідовності, які кодують мембранний глікопротеїн G RSV. Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить рекомбінантний вірус MVA, вакцини, застосування рекомбінантного вірусу MVA для лікування або попередження інфекції вірусу RSV та способу лікування, або попередження інфекції вірусу RSV у суб'єкта.



Фиг. 12

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід відноситься до рекомбінантного модифікованого вірусу вісповакцини Анкара (вірус MVA) як покращеної вакцини проти інфекції респіраторно-синцитіального вірусу (вірус RSV) і пов'язаних із ним продуктів, способів і застосувань. Зокрема, цей винахід відноситься до генно-інженерного рекомбінантного вектора MVA, що містить принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV. Винахід також відноситься до продуктів, способів і їх застосувань, наприклад, придатним для дії на імунну відповідь у суб'єкта, або придатним для діагностики інфекції RSV, а також визначення того, чи є небезпека рецидиву інфекції RSV у суб'єкта.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

RSV є важливим респіраторним патогеном. Гостра інфекція нижніх дихальних шляхів (LRT) викликає значну захворюваність і смертність серед новонароджених і дітей у віці до п'яти років у всьому світі [A.M. Aliyu et al. (2010), *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 3(1):147-155]. RSV є найбільш клінічно важливою причиною інфекції LRT; первинне інфікування RSV зазвичай виникає до 2 років [W.P. Glezen (1987), *Ped. Virol.* 2:1-4; Y. Murata (2009), *Clin. Lab. Med.* 29(4):725-739]. Оскільки первинна інфекція RSV не викликає повний імунітет до RSV, часті повторні інфекції трапляються впродовж усього життя, з найбільш важкими інфекціями, що розвиваються у дуже молодих, дуже літніх пацієнтів і у пацієнтів будь-якого віку з послабленим імунітетом [Y. Murata (2009)].

У 40 % людей, інфікованих RSV, зрештою розвиваються серйозні захворювання LRT, що вимагають госпіталізації, з важкістю і інтенсивністю захворювання, залежних від величини і інтенсивності інфекції і відповіді організму [Aliyu et al. (2010)]. RSV також може викликати серйозну хворобу нижніх дихальних шляхів у пацієнтів будь-якого віку, що загрожує імунній, дихальній або серцевій системі, а також може сприяти розвитку астми у дітей надалі. В одних лише Сполучених Штатах RSV є причиною 126000 госпіталізацій і 300 випадків смерті дітей на рік [Y. Murata (2009)]. Крім того, RSV нараховує більше 80000 госпіталізацій і більше ніж 13000 випадків смерті у зимовий період серед літніх пацієнтів і пацієнтів з базовими серцево-легеневими або імуносупресивними станами [Y. Murata (2009)]. Не дивлячись на важливість RSV як респіраторного патогену, на ринку на цей час немає безпечної і ефективної вакцини від RSV.

RSV є оболонковим РНК вірусом з сімейства Paramyxoviridae, підродини Pneumovirinae [Aliyu et al. (2010)]. Кожен віріон RSV містить несеgmentовану, негативно полярну, одноланцюжкову молекулу РНК із близько 15191 нуклеотидів, що містить десять генів, що кодують одинадцять окремих білків (M2 містить дві відкриті рамки зчитування), у тому числі вісім структурних (G, F, SH, M1, N, P, M2.1 і L) і три не структурні білки (NS1, NS2 і M2.2) [Y. Murata (2009)]. Геном транскрибується послідовно від NS1 до L у наступному порядку: 3'-NS1-NS2-N-P-M1-SH-G-F-M2.1-M2.2-L-5'.

Оболонка вірусу містить три трансмембранні глікопротеїни (глікопротеїн прикріплення (G), глікопротеїн злиття (F) і невеликий гідрофобний білок (SH)), а також матриксний білок (M1) [Y. Murata (2009)]. Під час реплікації вірус RSV спочатку прикріплюється до клітини-мішені в процесі, опосередкованому сильно глікозилізованим білком G. Потім вірус зливається з клітиною-господарем у процесі, опосередкованому білком F, завдяки чому проникає через клітинну мембрану і надходить до клітини-господаря; білок F також необхідний для формування синцитіїв, характерних для RSV-інфікованих клітин. Процеси прикріплення і злиття доповнюються білком SH. Білок M1 регулює збірку зрілого RSV, взаємодіючи з білками оболонки F і G і з нуклеокапсидними білками N, P і M2.1 (дивись нижче). В оболонці вірусна РНК заключається в капсид за допомогою транскриптазного комплексу, що складається з нуклеокапсидного білка (N), фосфопротеїну (P), фактора елонгації транскрипції (M2.1) і білків РНК-полімерази (L) [Y. Murata (2009)]. N асоціюється з геномною РНК, а P є кофактором L, вірусною РНК-полімеразою. M2.1 є фактором елонгації, необхідним для вірусної транскрипції, а M2.2 регулює транскрипцію вірусного генома. Нарешті, NS1 і NS2 інгібують тип I активності інтерферону.

Клінічні ізоляти RSV класифікуються відповідно до антигенної групи (A або B), і, у свою чергу, підрозділяються на декілька генотипів (наприклад, A2 або A_{Long} для групи A; і B1, CH-18537 або 8/60 для групи B), виходячи з генетичної мінливості у вірусному геномі кожної антигенної групи [Y. Murata (2009)]. Класифікація заснована на здатності вірусів реагувати з моноклональними антитілами, направленими проти глікопротеїну прикріплення (білка G), і на підставі різних генетичних аналізів. [M. Sato et al., *J. Clin. Microbiol.* 43(1):36-40 (2005)]. Серед вірусних ізолятів, деякі RSV-закодовані білки є високо консервативними на рівні амінокислотної

послідовності (наприклад, F), тоді як інші широко варіюють (наприклад, G) між і всередині двох основних антигенних груп [Y. Murata (2009)]. Білки F із груп A і B розділяють неабияку гомологію. На відміну від цього, білок G значно відрізняється між двома антигенними групами.

Білок G є найбільш варіабельним білком RSV з його гіперваріабельною С-кінцевою областю, що відповідає за більшість штамоспецифічних епітопів. Молекулярна епідеміологія і еволюційні закономірності G білка надали важливу інформацію про клінічні і епідеміологічні особливості RSV. Звичайні декілька різних генотипів циркулюють одразу, а той, що переважає в суспільстві, може змінюватись щороку. Проте, значення штамової різноманітності для клінічних і епідеміологічних особливостей RSV залишається погано вивченим. З цієї причини рекомбінантні білки RSV супроводжуються штамовим позначенням для вказування оригінального штаму RSV, з якого ген або білок були клоновані. Наприклад, клонований білок G зі штаму A_{Long} RSV позначається G(A_{Long}), RSV A_{Long} G або RSV A_{Long} G-білок.

RSV стимулює різні імунні відповіді у інфікованих господарів, у тому числі секрецію хемокинів і цитокінів, вироблення нейтралізуючих гуморальних і мукозальних антитіл, вироблення CD4+ (наприклад, T_H1 і T_H2) і CD8+ (наприклад, CTL) Т-клітин. Такі імунні реакції господарів у значній мірі відповідальні за клінічні прояви інфекції RSV, оскільки вірус викликає обмежену клітинну цитопатологію *in vivo* [Y. Murata (2009)]. Фенотипічні прояви і тягар RSV-індукованого захворювання, мабуть, опосередковуються балансом і взаємодією в діапазоні імунних реакцій, стимульованих інфекцією RSV [Y. Murata (2009)].

Багато попередніх досліджень показують, що клітинні і гуморальні імунні реакції відіграють різні ролі в індуванні імунітету до RSV і в дозволі інфекції RSV, а також у прогресуванні захворювання [Y. Murata (2009) і посилання у ньому]. Наприклад, дослідження з гуманізованим антитілом до F показало, що тоді як антитіла до RSV є достатніми для запобігання або обмеження важкості інфекції, вони не потрібні для усунення вірусної інфекції [Y. Murata (2009); A.F.G. Antonis et al. (2007), *Vaccine* 25:4818-4827]. На відміну від цього, Т-клітинні відповіді потрібні для усунення встановлених інфекцій RSV [Y. Murata (2009)]. Індукована RSV Т-клітинна відповідь також відіграє ключову роль у легеневій патології під час інфекції. Наприклад, інтерферон- γ (IFN γ)-секретуючі Т_H1 клітини з асоційованою CD8+ CTL-відповіддю або без неї усувають RSV з мінімальною легеневою патологією, тоді як інтерлейкін 4 (IL-4)-секретуючі Т_H2 клітини також усувають RSV, але часто супроводжуються значними легеневиими змінами, включаючи еозинофільну інфільтрацію, що є відмінною рисою посиленої хвороби, що спостерігається під час попередніх випробувань вакцини (дивись нижче).

Не дивлячись на велику кількість інформації відносно імунології, вірусології, фізіології інфекції RSV, проте, залишається неясним, якого роду імунна відповідь, ймовірно, буде найбільш ефективною для індування тривалого імунітету, а також не викликати посилену хворобу після вакцинації проти RSV, як описано детальніше у наступних розділах.

Попередні дослідження по розробці вакцин

Вакцини зазвичай використовують одну з декількох стратегій, щоб викликати захисний імунітет проти інфекційного агента-мішені або патогена (наприклад, вірусу, бактерії або паразита), у тому числі: (1) інактивовані патогенні препарати; (2) живі послаблені патогенні препарати, у тому числі генетично послаблені патогенні штами; (3) очищені білкові субодиничні вакцинні препарати; (4) вакцини на основі вірусних векторів, що кодують патогенні антигени та/або ад'юванти; і (5) вакцини на основі ДНК, що кодує патогенні антигени.

Первинні зусилля в області розробки вакцин RSV були орієнтовані на інактивованій препарат вірусу, поки у США протягом 1960-х років не були проведені клінічні випробування, що тестують ефективність інактивованої формаліном вакцини RSV (FI-RSV) з катастрофічними результатами [M.R. Olson & S.M. Varga (2007), *J. Immunol.* 179:5415-5424]. У значної кількості вакцинованих пацієнтів розвинулася посилена легенева хвороба, що характеризується еозинофільними і нейтрофільними інфільтраціями і істотними запальними реакціями після природної інфекції RSV [Olson & Varga (2007) [Blanco JC et al. (2010) *Hum Vaccin.* 6:482-92]. Багато хто з цих пацієнтів мав потребу в госпіталізації і декілька важкохворих пацієнтів померли. Тому дослідники почали шукати вірусні та/або господарські фактори, сприяючі розвитку посиленого захворювання після зараження, з метою розробки безпечнішої вакцини RSV. Цей пошук дав багато нової інформації про біологію RSV і широкий спектр імунних відповідей, які він може індукувати, але безпечна і ефективна вакцина RSV залишається невлучною.

Після FI-RSV зусилля по розробці вакцин у значній мірі були зосереджені на одноантигенних вакцинах, що використовують G, F і, у меншій мірі, N або M2, з вірусними антигенами, що доставляються вірусними або плазмідними ДНК-векторами, що експресують вірусні гени, або у вигляді очищених білків. [Див., наприклад, W. Olszewska et al. (2004), *Vaccine* 23:215-221; G.

Taylor et al. (1997), J. Gen. Virol. 78:3195-3206; i L.S. Wyatt et al. (2000), Vaccine 18:392-397]. Вакцинація комбінацією F+G також тестувалася на телятах, бавовняних хом'яках і мишах BALB/c із змінними результатами [Antonis et al. (2007) (телята); B. Moss, Патентна заявка США № 06/849,299 («the '299 application»), подана 8 квітня 1986 (бавовняні хом'яки); i L.S. Wyatt et al. (2000) (миші BALB/c)]. I F, i G були імуногенними у телят, мишей, бавовняних хом'яків, людей, i

принаймні у деякій мірі у новонароджених макак [A.F.G. Antonis et al. (2007) (телята); B. Moss, the '299 application (бавовняні хом'яки); L. de Waal et al. (2004), Vaccine 22:923-926 (новонароджені макаки); L.S. Wyatt et al. (2000) (миші BALB/c); Y. Murata (2009) (люди)].
 При цьому, проте, характер і тип імунної відповіді, що індукується кандидатами RSV-вакцин, варіює - часто вельми істотно - залежно від типу вакцини, що використовується, вибраних антигенів, шляху введення і навіть використаного модельного організму. Наприклад, імунізація живим RSV або реплікуючими векторами, що кодують білок F RSV, індукує домінуючу реакцію T_H1, що супроводжується продукуванням нейтралізуючих антитіл до F і CD8⁺ CTL, асоційованих з мінімальною легеневою патологією при поствакцинальному вірусному зараженні [Y. Murata (2009) і посилання в ній]. На відміну від цього, імунізація FI-інактивованим препаратом RSV викликає домінуючу реакцію T_H2, повністю позбавлену реакції CD8⁺ CTL, яка викликає збільшення патологічних змін у легенях [Y. Murata (2009) і посилання в ній]. Цікаво, що введення білка G RSV як очищеної субодиночної вакцини або у векторі, що реплікується, індукує домінуючу реакцію T_H2, що врешті-решт продукує еозинофільні легеневі інфільтрати і гіперреактивність дихальних шляхів після вірусного зараження після вакцинації, реакція дуже схожа на посилену хворобу, що спостерігається з FI-RSV [Y. Murata (2009) і посилання в ній]. Крім того, у той час як вакцинація модифікованим вірусом вісповакцини Анкара (MVA), що кодує білок F RSV, індукувала антитіла до F і F-специфічним CD8⁺ T-клітинам у телят, вакцинація MVA-F+MVA-G індукувала антитіла до F і G, але не F- або G-специфічним CD8⁺ T-клітинам [A.F.G. Antonis et al. (2007)].

Вакцинація мишей вірусом вісповакцини (VV), що експресує білок P (VV-F), індукувала сильну відповідь CD8⁺ T-клітин, який призводив до кліренсу реплікуючого RSV із легенів, і супроводжувався такою самою або більшою втратою маси, ніж у мишей, імунізованих FI-RSV [W. Olszewska et al. (2004)]. Проте, це не було пов'язано з посиленою хворобою, викликаною FI-RSV або VV, які експресують білок G (VV-G) (об'єднані T_H2 еозинофілія у відповідь легенів і втрата маси), у результаті підвищення секреції T_H2-цитокінів, таких як IL-4 і IL-5. Деякі спеціалісти у даній області передбачили, що у вакцини RSV, здатної індукувати відносно збалансовану імунну відповідь, у тому числі і клітинний, і гуморальний компонент, буде менше шансів проявити розширену імунопатологію у відповідь на поствакцинальне зараження [W. Olszewska et al. (2004)].

Проте, у той час як вакцинація мишей BALB/c модифікованим вірусом вісповакцини Анкара (MVA), що кодує F, G або F+G, індукувала саме таку збалансовану реакцію, у тому числі гуморальну реакцію (тобто, збалансовану відповідь IgG1 і IgG2a) і реакцію T_H1 (тобто, підвищені рівні IFN γ /інтерлейкіна-12 (IL-12) і знижені рівні інтерлейкіна-4 (IL-4) /інтерлейкіна-5 (IL-5)), вакциновані тварини, проте, продовжували демонструвати деяку втрату маси [W. Olszewska et al. (2004)].

Не дивлячись на розширення значних зусиль, направлених на характеристику природи і міри імунних реакцій, що індукуються різними вакцинними кандидатами в різних модельних системах, залишається неясним, якого роду імунна реакція потрібна для передачі міцного і повного імунітету до RSV без схильності реципієнтів вакцини до посиленої хвороби. Через явний дисбаланс між клінічною значущістю RSV і доступними терапевтичними і профілактичними засобами розробка вакцини проти RSV залишається незадоволеною медичною потребою.

ОПИС

У той час як попередні невдалі спроби розробити RSV-вакцини зосереджувались головним чином на вакцинації або RSV-F, або мембранним глікопротеїном G RSV, або обома, автори цього винаходу виявили, що вакцинація рекомбінантним вірусом вісповакцини Анкара (MVA), що експресує принаймні одну антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, індукує кращий захист. Крім того, такі конструкції індукують майже повний стерильний імунітет, коли застосовуються інтраназально в порівнянні з підшкірним введенням, або навіть у порівнянні з внутрішньом'язовим шляхом введення, використаним Wyatt і його колегами [L.S. Wyatt et al. (2000)]. Посилений захист може бути одержаний шляхом введення кандидатів RSV-вакцин інтраназально у порівнянні з внутрішньом'язовим введенням.

При вакцинації рекомбінантними MVA, що експресують мембранний глікопротеїн RSV F або RSV G (або обидва) (наприклад, MVA-mBN199B), рекомбінантними MVA, що експресують принаймні одну антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV (наприклад, MVA-mBN201B), автори цього винаходу не спостерігали RSV, що реплікується в легенях протягом 4 днів після зараження, хоча геноми RSV ще виявлялися за допомогою RT-qPCR. Рекомбінантні MVA, що експресують принаймні одну антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV (наприклад, MVA-mBN201B), індукували кращий захист і більше зниження вірусного навантаження RSV, що виявляється за допомогою RT-qPCR, оскільки вони викликали сильну реакцію CD8+ Т-клітин проти антигенної детермінанти нуклеокапсидного білка RSV. Введення таких рекомбінантних вірусів інтраназальним шляхом, крім того, індукувало майже повний стерильний імунітет (фактично було відсутнє RSV вірусне навантаження, що виявляється RT-qPCR), тому що вони індукують імунну відповідь слизової оболонки і секрецію антитіл IgA – реакції, які були відсутні, коли такі конструкції вводили підшкірно.

На відміну від FI-RSV, такі конструкції викликають збалансовану Th1-імунну відповідь, що генерує хорошу реакцію антитіл, а також сильні, специфічні клітинні імунні відповіді на антигени RSV. З інтраназальним введенням вакцини, що продукує рівні антитіл IgG навіть вище, ніж ті, що одержані в результаті звичайного підшкірного введення, на додаток до індукування хорошої відповіді антитіл IgA, захист покращується і зменшується втрата маси тіла. Проте величина клітинної імунної відповіді не залежить від шляху введення. Цікаво, що винахідники спостерігали картину Т-клітинної відповіді, індукованої за допомогою рекомбінантних MVA, що експресують принаймні одну гетерологічну послідовність нуклеотидів, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV (наприклад, MVA-mBN201B, що експресують білки F і G, H і M2 RSV), який був схожий на відповідь Т-клітин, що індукується введенням RSV, хоча і набагато вище.

Таким чином, у першому аспекті, цей винахід передбачає рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), що містить принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV.

Модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA)

MVA був одержаний за допомогою більше ніж 570 серійних пасажів на фібробластах курячих ембріонів шкірного штаму Анкара вірусу вісповакцини [хоріоаллантаїсний вакцинний вірус вірусу вісповакцини Анкара, CVA; для огляду див. Mayr et al. (1975), *Infection* 3, 6-14], який підтримувався протягом багатьох років у Vaccination Institute, Ankara, Turkey, і використовувався для вакцинації людей. Проте, через часто серйозні поствакцинальні ускладнення, пов'язані з коров'ячою віспою, було зроблено декілька спроб одержання більш послабленої, безпечної вакцини проти віспи.

У період з 1960 по 1974 рр., професорові Антону Майєру вдалося послабити CVA більш ніж 570 безперервними пасажами у клітинах CEF [Mayr et al. (1975)]. Як було показано в різних моделях на тваринах, одержаний MVA був авірулентним [Mayr, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-234]. Як частина раннього розвитку MVA як попередня противіспяна вакцина, були проведені клінічні випробування з застосуванням MVA-517 у комбінації з Lister Elstree [Stickl (1974), *Prev. Med.* 3: 97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munich Med. Wochenschr.* 113: 1149-1153] у суб'єктів із ризиком несприятливих реакцій від коров'ячої віспи. У 1976 р. MVA, одержаний з насінного матеріалу MVA-571 (що відповідає 571-у пасажу), був зареєстрований у Німеччині як праймер-вакцина в програмі двоступінчатої парентеральної вакцинації проти віспи. Згодом, MVA-572 був використаний у близько 120000 осіб кавказької національності, в основному у дітей у віці від 1 до 3 років, без повідомлення про важкі побічні ефекти, хоча багато хто з суб'єктів був із популяції з високим ризиком розвитку ускладнень, пов'язаних із коров'ячою віспою (Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390). MVA-572 був депонований у Європейській колекції культур клітин тварин як ECACC V94012707.

В результаті пасивування, що використовується для послаблення MVA, є цілий ряд різних штамів або ізолятів, залежно від числа пасажів у клітинах CEF. Наприклад, MVA-572 був використаний у Німеччині під час програми ліквідації віспи, а MVA-575 широко використовується як ветеринарна вакцина. MVA-575 був переданий на зберігання 7 грудня 2000 р. у Європейську колекцію культур клітин тварин (ECACC) під депозитним номером V00120707. Послаблений CVA-вірус MVA (модифікований вірус вісповакцини Анкара) був одержаний шляхом

послідовного культивування (більше 570 пасажів) CVA на первинних фібробластах курячих ембріонів.

Не дивлячись на те, що Mayr et al. продемонстрували у 1970-х, що MVA сильно послаблений і авірулентний для людини і ссавців, деякі дослідники повідомили, що MVA не повністю послаблений у клітинних лініях ссавців і людини, оскільки може статися залишкова реплікація у цих клітинах [Blanchard et al. (1998), J Gen Virol 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), Virology 238:198-211; патент США № 5185146; Ambrosini et al. (1999), J Neurosci Res 55: 569]. Передбачається, що результати, представлені в цих публікаціях, були одержані з різними відомими штамми MVA, оскільки віруси, що використовувались, істотно відрізняються за своїми властивостями, зокрема, за їх характером зростання у різних клітинних лініях. Така залишкова реплікація небажана з різних причин, у тому числі через проблеми безпеки у зв'язку із застосуванням у людей.

Штами MVA, що мають підвищені профілі безпеки для розробки безпечніших продуктів, таких як вакцини або лікарські препарати, були розроблені Bavarian Nordic: MVA додатково пасирувався Bavarian Nordic і названий MVA-BN. Вірусу MVA, так само як і MVA-BN, не вистачає близько 15 % (31 т.п.н. з шести областей) геному у порівнянні з предковим вірусом CVA. Делеції впливають на цілий ряд вірулентності і круг генів-господарів, а також на ген типа А тілець включення. Зразок MVA-BN, відповідний пасажу 583, був депонований 30 серпня 2000 р. в Європейській колекції клітинних культур (ECACC) під реєстраційним номером V00083008.

MVA-BN може прикріплюватися і входити у людські клітини, де вірусно-кодовані гени експресуються дуже ефективно. Проте, збірка і вивільнення потомства вірусу не відбувається. MVA-BN сильно адаптований до клітин первинних фібробластів курячого ембріона (CEF) і не реплікується у клітинах людини. У клітинах людини вірусні гени експресуються, а інфекційний вірус не продукується. MVA-BN класифікується як організм рівня 1 біологічної безпеки за даними Центрів із контролю і профілактики захворювань у США. Препарати MVA-BN та їх похідні були введені багатьом видам тварин, а також більше 2000 людських суб'єктів, у тому числі людям з дефективною імунною системою. Всі вакцинації виявилися безпечними і добре переносимими. Не дивлячись на високе виснаження і знижену вірулентність, у доклінічних дослідженнях MVA-BN, як було показано, викликав як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь на вірус вісповакцини і гетерологічні генні продукти, що кодуються генами, клонованими у геном MVA [E. Harrer et al. (2005), Antivir. Ther. 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), Vaccine 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), Hum. Gene Ther. 14(14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), Clin. Cancer Res., 10(16):5381-5390].

"Похідні" або "варіанти" MVA відносяться до вірусів, що мають по суті такі самі характеристики реплікацій, що і MVA, як описано у цьому документі, але таким, що проявляють відмінності в одній або більше частин своїх геномів. MVA-BN, так само як і похідні або варіанти MVA-BN, не в змозі репродуктивно реплікуватися *in vivo* у людей і мишей, навіть при сильній придушеній імунній системі мишей. Зокрема, MVA-BN або похідне або варіант MVA-BN, також мають переважну здатність репродуктивно реплікуватися у фібробластах курячих ембріонів (CEF), але не здатні до репродуктивної реплікації в людській лінії кератиноцитів HaCaT [Boukamp et al (1988), J Cell Biol 106: 761-771], клітинній лінії кісткової остеосаркоми людини 143B (ECACC No. 91112502), клітинній лінії нирки ембріона людини 293 (ECACC No. 85120602) і клітинній лінії HeLa цервікальної аденокарциноми людини (ATCC No. CCL-2). Крім того, похідні або варіанти MVA-BN мають міру ампліфікації вірусу принаймні у два рази менше, а, в основному, у три рази менше, ніж MVA-575 у клітинах HeLa і клітинних лініях HaCaT. Тести і аналіз цих властивостей варіантів MVA описані в WO 02/42480 (США 2003/0206926) і WO 03/048184 (US 2006/0159699), обидві включені у цей опис шляхом посилання.

Ампліфікацію і реплікацію вірусу зазвичай виражають у вигляді відношення вірусу, продукованого з інфікованої клітини (вихід), до кількості вірусу, спочатку використаного для інфікування клітини у першу чергу (витрати), що називається "мірою ампліфікації". Міра ампліфікації "1" визначає стан ампліфікації, коли кількість вірусу, одержаного з інфікованих клітин така сама, як кількість, що спочатку використана для інфікування клітин, це позначає, що інфіковані клітини є пермісивними для вірусної інфекції і відтворення. На відміну від цього, міра ампліфікації менша, ніж 1, тобто, зниження обсягів виробництва у порівнянні з рівнем витрат, указує на відсутність репродуктивної реплікації і, отже, послаблення вірусу.

Переваги вакцини на основі MVA охоплюють їх профіль безпеки, а також доступність для великомасштабного виробництва вакцини. Доклінічні дослідження показали, що MVA-BN демонструє чудову аттенуацію і ефективність у порівнянні з іншими штамми MVA (WO02/42480). Додатковою властивістю штамів MVA-BN є здатність індукувати по суті такий

самий рівень імунітету при прайм-режимі вірусу вісповакцини/буст-режимі вірусу вісповакцини у порівнянні з ДНК-прайм-режимом/буст-режимом вірусу вісповакцини.

5 Рекомбінантні віруси MVA-BN, найбільш переважний варіант реалізації у цьому описі, як вважають, є безпечними через характерний для них виразний дефіцит реплікації в клітинах ссавців і чітко визначену авірулентність. Крім того, на додаток до їх ефективності, здійсненість виробництва в промислових масштабах може бути корисною. Крім того, вакцини на основі MVA можуть доставляти декілька гетерологічних антигенів і дозволяють одночасно індукувати гуморальний і клітинний імунітет.

10 У іншому аспекті винаходу, вірусний штам MVA, придатний для одержання рекомбінантного вірусу, може бути штамом MVA-572, MVA-575 або будь-яким подібним чином послабленим штамом MVA. Також придатним може бути мутант MBA, такий як делетирований хоріоаллантоїсний вірус вісповакцини Анкара (dCVA). Вірус dCVA містить сайти делецій del I, del II, del III, del IV, del V і VI генома MVA. Сайти особливо корисні для вставки декількох гетерологічних послідовностей. Вірус може репродуктивно реплікуватися (з мірою посилення

15 більше, ніж 10) у лінії клітин людини (наприклад, у людських клітинних лініях 293, 143B і MRC-5), що потім дозволить оптимізувати шляхом подальшої мутації корисну для вакцинації на основі вірусу стратегію (див. WO 2011/092029).

Визначення

20 Термін "антигенна детермінанта" відноситься до будь-якої молекули, яка стимулює імунну систему господаря виробляти антиген-специфічну імунну відповідь або клітинну відповідь, та/або гуморальну відповідь антитіл. Антигенні детермінанти можуть охоплювати білки, поліпептиди, антигенні фрагменти білка, антигени і епітопи, які все ще викликають імунну відповідь у господаря і складають частину антигена, гомологи або варіанти білків, поліпептидів і антигенних фрагментів білка, антигенів і епітопів, у тому числі, наприклад, глікозилізовані білки,

25 поліпептиди, антигенні фрагменти білка, антигени і епітопи, а також нуклеотидні послідовності, що кодують такі молекули. Таким чином, білки, поліпептиди, антигенні фрагменти білка, антигени і епітопи не обмежуються конкретними нативними нуклеотидними або амінокислотними послідовностями, але охоплюють послідовності, ідентичні нативній послідовності, а також модифікації нативної послідовності, такі як делеції, добавки, вставки і заміни.

30

Бажано, щоб такі гомологи або варіанти мали принаймні близько 50 % принаймні близько 60 % або 65 %, принаймні близько 70 % або 75 %, принаймні близько 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % або 89 %, типовіше принаймні близько 90 %, 91 %, 92 %, 93 % або 94% і навіть бажаніше принаймні близько 95 %, 96 %, 97 %, 98% або 99 %, найтипівіше

35 принаймні близько 99 % ідентичність з референсним білком, поліпептидом, антигенним фрагментом білка, антигеном і епітопом на рівні нуклеотидної або амінокислотної послідовності. Термін гомолог або варіант також охоплює усічені, видалені або інакше модифіковані нуклеотидні або білкові послідовності, такі як, наприклад, (1) нуклеотидні послідовності RSV-F або RSV-G, що кодують розчинні форми відповідних білків RSV-F або RSV-G без сигнального

40 білка, а також трансмембранних та/або цитоплазматичних доменів непротесованих білків RSV-F або RSV-G, (2) нуклеотидні послідовності RSV-M2 або RSV-N, що кодують видалені, усічені або іншим чином мутовані версії непротесованих білків RSV-M2 або RSV-N, (3) розчинні форми білків RSV-F або RSV-G без сигнального білка, а також трансмембранних та/або цитоплазматичних доменів непротесованих білків RSV-F або RSV-G, або (4) видалені, усічені

45 або іншим чином мутовані версії непротесованих білків RSV-M2 або RSV-N.

Способи визначення ідентичності послідовностей між нуклеїновими кислотами і амінокислотами добре відомі в цій галузі техніки. Дві або більше послідовностей можна порівняти шляхом визначення їх «відсотка ідентичності». Відсоток ідентичності двох послідовностей, послідовностей нуклеїнових кислот або амінокислот – це кількість точних збігів

50 між двома вирівняними послідовностями, поділена на довжину коротшої послідовності і помножена на 100.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" по відношенню до білків, поліпептидів, антигенних фрагментів білка, антигенів і епітопів, описаних у цьому документі, визначається як відсоток амінокислотних залишків у послідовності кандидата, які ідентичні

55 амінокислотним залишкам в еталонній послідовності (тобто, білка, поліпептиду, фрагмента антигенного білка, антигена або епітопа, з якого вона одержана), після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, якщо це необхідно, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, і не розглядає будь-які консервативні заміни як частини ідентичності послідовності. Вирівнювання в цілях визначення відсотка ідентичності

60 амінокислотної послідовності можна досягти різними способами, які відомі фахівцям у цій галузі

техніки, наприклад, із застосуванням загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як BLAST, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці у цій галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для виміру вирівнювання, у тому числі будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей.

5 Те ж саме відноситься і до "відсотка (%) ідентичності нуклеотидної послідовності" з відповідними змінами.

Наприклад, прийнятне вирівнювання послідовностей нуклеїнових кислот забезпечується застосуванням алгоритму локальної гомології Сміта і Ватермана (Smith and Waterman, (1981), Advances in Applied Mathematics 2:482-489). Цей алгоритм може бути застосований до
10 амінокислотних послідовностей за допомогою матриці заміни, розробленої Dayhoff, Atlas of protein F Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, і нормалізованої Gribskov (1986), Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763. Приклад реалізації цього алгоритму для визначення відсотка ідентичності послідовності наданий Genetics Computer Group (Madison, Wis.) у службовій програмі "BestFit".
15 Параметри за умовчанням для цього способу описані в Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (доступні від Genetics Computer Group, Madison, Wis.). Переважний спосіб установлення відсотка ідентичності в контексті цього винаходу полягає у використанні пакету програм MPSRCH, захищених авторським правом в університеті Едінбургу, розробленого John F. Collins і Shane S. Sturrok, і IntelliGenetics, що поширюються, Inc. (Mountain View, Calif). З цього набору пакетів алгоритм Smith-Waterman може використовуватися там, де параметри за умовчанням використовуються для таблиці підрахунку очок (наприклад, штраф на
20 внесення делеції до вирівнювання 12, штраф на продовження делеції один і розриву шість). З отриманих даних, значення "Match" відображає "ідентичність послідовності". Інші прийнятні програми для розрахунку відсотка ідентичності або схожості між послідовностями, як правило, відомі у цій галузі, наприклад, іншою програмою вирівнювання є BLAST, що використовується з
25 параметрами за умовчанням. Наприклад, BLASTN і BLASTP можуть застосовуватися із застосуванням наступних параметрів за умовчанням: genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS
30 translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Детальну інформацію про ці програми можна знайти в Інтернеті за наступною адресою: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Під терміном "гетерологічний" ген, нуклеїнова кислота, антиген або білок у цьому описі розуміється нуклеїнова кислота або амінокислотна послідовність, яка не присутня у геномі поксвірусу дикого типу (наприклад, MVA). Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що "гетерологічний
35 ген", якщо присутній у поксвірусі, такому як MVA, має бути включений у геном поксвірусу таким чином, що після введення рекомбінантного поксвірусу у клітину-господар, він експресується у вигляді відповідного гетерологічного генного продукту, тобто, як "гетерологічний антиген" та/або "гетерологічний білок". Експресія зазвичай досягається шляхом функціонального зв'язування гетерологічного гена з регуляторними елементами, які роблять можливою експресію у
40 поксвірус-інфікованій клітині. Переважно, регуляторні елементи містять природний або синтетичний поксвірусний промотор.

"Стерильний імунітет" у цьому описі, позначає захисний імунітет у відсутність генома RSV, що детектується, коли застосовуються такі чутливі способи виявлення, як RT-qPCR.

Слід зазначити, що, у цьому описі, форми однини містять посилання на множину, якщо з контексту явно не виходить інше. Таким чином, наприклад, посилання на "епітоп" містить один
45 або більше епітопів, а посилання на "спосіб" містить посилання на еквівалентні етапи і способи, відомі фахівцям у цій галузі техніки, які можна модифікувати або замінити способами, описаними у цьому документі.

Якщо не вказане інше, то термін "принаймні", що передуює ряду елементів, слід розуміти як
50 такий, що відноситься до кожного елементу у серії. Фахівцям у цій галузі техніки будуть зрозумілі або вони зможуть встановити, використовуючи не більше ніж рутинні експерименти, багато еквівалентів конкретних варіантів реалізації винаходу, описаного в цьому документі. Такі еквіваленти охоплюються цим винаходом.

У цьому описі і в наступній формулі винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, слово
55 "містити" і його варіації, такі як "містить" і "що містить", слід розуміти як включення вказаного цілого або стадії, або групи цілих чисел або стадій, але не виключаючи будь-яке інше ціле або стадії, або групи цілого числа або стадій. При використанні у цьому описі термін "що містить" може замінюватися терміном "що вміщує" або "що включає", або інколи при використанні в цьому описі терміном "що має". Будь-який із вказаних вище термінів (що включає, що містить,
60 що вміщує, що має), хоча і менш бажані, коли використовується у цьому документі у зв'язку з

одним із аспектів або варіантів реалізації цього винаходу, може бути замінений терміном "що складається з".

При використанні у цьому документі "що складається з" виключає будь-який елемент, крок або інгредієнт, не вказаний у заявленому елементі. При використанні у цьому документі термін "складається в основному з" не виключає матеріали або дії, які істотно не впливають на основні і нові характеристики домагання.

При використанні у цьому документі, сполучний термін "та/або" між декількома перерахованими елементами слід розуміти як такий, що охоплює як індивідуальні, так і об'єднані варіанти. Наприклад, коли два елементи поєднуються шляхом "та/або", то перший варіант відноситься до застосовності першого елементу без другого. Другий варіант відноситься до застосовності другого елементу без першого. Третій варіант відноситься до застосовності першого і другого елементів один з одним. Слід розуміти, що будь-який із цих варіантів знаходиться у межах значення і, отже, задовольняє вимозі терміну "та/або", як використовується у цьому документі. Також зрозуміло, що одночасна застосовність більше ніж одного з варіантів підпадають під значення і, отже, задовольняє вимоги терміну "та/або".

Нуклеотидні послідовності і білки RSV

Гени RSV, як згадується у цьому описі, відносяться до генів або гомологів або варіантів генів, що кодують відповідний білок у будь-якому штамі RSV або ізоляті, навіть якщо точна послідовність та/або геномне розташування гена може відрізнятися від штамів або ізолятів.

Крім того, білки RSV, згадані у цьому описі, відносяться до білків або гомологів або варіантів білків, що кодуються і експресуються відповідним геном білка, як визначено вище.

Як приклад, в цьому описі наступні терміни використовуються взаємозамінно: терміни "ген білка F", "ген глікопротеїну F", "ген білка F RSV", "ген глікопротеїну F RSV" або "ген F" відносяться до гена або гомолога або варіанту гена, що кодує трансмембранний злитий глікопротеїн у будь-якому штамі RSV або ізоляті, хоча точна послідовність та/або розташування генома гена білка F можуть відрізнятися між штамми або ізолятами. Наприклад, у штамі A2 RSV, ген білка F(A2) містить нуклеотиди 5601-7499 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Ген білка F(A2) додатково містить кодуючу відкриту рамку зчитування (ORF), що охоплює нуклеотиди 5614-7338 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Нуклеотидна послідовність гена білка F із A2 RSV вказана у SEQ ID NO: 28.

Також взаємозамінно застосовані у цьому описі терміни "білок F", "глікопротеїн F", "білок F RSV", "глікопротеїн F RSV" або "F", які відносяться до важко глікозильованим трансмембранним глікопротеїнам злиття або гомологам або варіантам білка, що кодується і експресується геном білка F RSV, як визначено вище. Амінокислотна послідовність білка F із RSV A2 вказана в SEQ ID NO: 29. Білок F RSV(A2) містить сигнальний пептид, позаклітинний домен, трансмембранний домен і цитоплазматичний домен (див., наприклад, UniProtKB/Swiss-Prot, інвентарний номер P03420). Сигнальний пептид білка F RSV A2 складається з амінокислот 1-21 із SEQ ID NO: 29; позаклітинний домен білка F RSV A2 складається з амінокислот 1-529 із SEQ ID NO: 29 або амінокислот 22-529 із SEQ ID NO: 29; трансмембранний домен білка F RSV A2 складається з амінокислот 530-550 із SEQ ID NO: 29; і цитоплазматичний домен білка F RSV A2 складається з амінокислот 551-574 із SEQ ID NO: 29.

Також терміни "ген білка G", "ген глікопротеїну G", "ген білка G RSV", "ген глікопротеїну G RSV" або "ген G" використовуються у цьому описі взаємозамінно. Наприклад, у штамі A2 RSV ген білка G(A2) містить нуклеотиди 4626-5543 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Ген білка G(A2) додатково містить білок, що кодується відкритою рамкою зчитування (ORF), що охоплює нуклеотиди 4641-5537 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Нуклеотидна послідовність гена білка G з A2 RSV вказана у SEQ ID NO: 30.

Терміни "білок G", "глікопротеїн G", "білок G RSV", "глікопротеїн G RSV" або "G" відносяться до важко глікозильованому трансмембранному глікопротеїну приєднання, або до гомолога, або варіанту білка. Амінокислотна послідовність білка G із RSV A2 вказана у SEQ ID NO: 31. Білок G A2 RSV містить позаклітинний домен, трансмембранний домен і цитоплазматичний домен (див., наприклад, UniProtKB/Swiss-Prot, інвентарний номер P03423). Позаклітинний домен білка G A2 RSV складається з амінокислот 67-298 із SEQ ID NO: 31; трансмембранний домен білка G A2 RSV складається із амінокислот 38-66 із SEQ ID NO: 31; і цитоплазматичний домен білка G A2 RSV складається із амінокислот 1-37 із SEQ ID NO: 31.

Використовуються взаємозамінно у цьому документі також терміни "ген білка M2", "ген нуклеокапсидного білка M2", "ген білка M2 RSV", "ген матричного білка M2 RSV", "ген нуклеокапсидного білка M2 RSV" або "ген M2". Наприклад, у штамі A2 RSV, ген білка M2(A2)

містить нуклеотиди 7550-8506 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Ген білка M2(A2) додатково містить білок, що кодується відкритою рамкою зчитування (ORF), що охоплює нуклеотиди 7559-8143 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Нуклеотидна послідовність гена білка M2 з A2 RSV вказана у SEQ ID NO: 32.

Використовуються взаємозамінно у цьому документі терміни "білок M2", "нуклеокапсидний білок M2", "RSV M2 протеїн", "нуклеокапсидний білок M2 RSV", "матриксний білок M2 RSV" або "M2". Амінокислотна послідовність білка M2 з RSV A2 вказана у SEQ ID NO: 33 (див., наприклад, UniProtKB/Swiss-Prot, інвентарний номер P04545).

Також терміни "ген білка N", "ген нуклеокапсидного білка N", "ген білка N RSV", "ген нуклеокапсидного білка N RSV" або "ген N" у цьому документі можуть використовуватися взаємозамінно. Наприклад, у штамі A2 RSV, ген білка N(A2) містить нуклеотиди 1081-2277 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Ген білка N(A2) додатково містить білок, що кодується відкритою рамкою зчитування (ORF), що охоплює нуклеотиди 1096-2271 (кінцеві точки включені), як пронумеровано у GenBank під інвентарним номером M11486. Нуклеотидна послідовність гена білка N з A2 RSV вказана у SEQ ID NO: 34.

Амінокислотна послідовність "білка N", "нуклеокапсидного білка N", "білка N RSV", "нуклеокапсидного білка N RSV" або "N", терміни, які використовуються в цьому описі взаємозамінно, з A2 RSV вказана в SEQ ID NO: 35 (див., наприклад, UniProtKB/Swiss-Prot, інвентарний номер P03418).

Деякі варіанти реалізації винаходу

У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний MVA експресує принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту F RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту G RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу антигенну детермінанту F RSV одержують з штаму A2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу антигенну детермінанту G RSV одержують зі штаму A2 RSV.

У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний MVA містить дві гетерологічні нуклеотидні послідовності, кожна кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу першою антигенною детермінантою мембранного глікопротеїну RSV є антигенна детермінанта F RSV, а другою антигенною детермінантою мембранного глікопротеїну RSV є антигенна детермінанта G RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу антигенну детермінанту F RSV одержують зі штаму A2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу антигенну детермінанту G RSV одержують зі штаму A2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу обидві антигенні детермінанти F RSV і G RSV можуть бути одержані зі штаму A2 RSV.

У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний MVA експресує принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту F RSV і принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту M2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту F RSV і принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту N RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту G RSV і принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту M2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту G RSV і принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту N RSV.

антигенною детермінантою N RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу усічену або варіантну антигенну детермінанту N одержують зі штаму A2 RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу протеазний домен, що саморозщеплюється, одержують із вірусу ящура. У деяких варіантах реалізації винаходу протеазний домен, що саморозщеплюється, є фрагментом протеази 2A з вірусу ящура, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 11, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких варіантах реалізації винаходу принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту N RSV і антигенну детермінанту M2 RSV, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 17, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18.

Сайти інтеграції в MVA

У деяких варіантах реалізації винаходу гетерологічні нуклеотидні послідовності, що кодують одну або більше антигенних детермінант мембранних глікопротеїнів RSV і одну або більше антигенних детермінант нуклеокапсидних білків RSV, включені в різні сайти інтеграції в геномі MVA або в геномі MVA-BN. Гетерологічні нуклеотидні послідовності, що кодують одну або більше антигенних детермінант білків RSV, можуть бути включені в рекомбінантний MVA як окремі одиниці транскрипції або як гібридні гени, як показано на Фігурі 1.

У деяких варіантах реалізації винаходу гетерологічні нуклеотидні послідовності RSV включені в одну або більше міжгенних ділянок (IGR) MVA. IGR може бути вибраною з IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, і IGR 148/149, переважно з IGR64/65, IGR88/89 і IGR 148/149. Гетерологічні нуклеотидні послідовності RSV можуть бути, додатково або альтернативно, включені в один або більше делеційних сайтів природнього походження I, II, II, IV, V або VI MVA. У деяких варіантах реалізації винаходу менше ніж 5, 4, 3 або 2 сайти інтеграції містять гетерологічні нуклеотидні послідовності RSV.

Кількість сайтів інтеграції MVA, що містять гетерологічні нуклеотидні послідовності RSV, може складати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше. Рекомбінантний MVA може містити гетерологічні нуклеотидні послідовності RSV, включені в 4, 3, 2 або менше сайтів інтеграції, але переважно використовують два сайти інтеграції. У деяких варіантах реалізації винаходу використовують три сайти інтеграції. Переважно, рекомбінантний MVA містить принаймні 4, 5, 6 або 7 нуклеотидних послідовностей, включених у 2 або 3 сайти інтеграції.

Рекомбінантні віруси MVA, передбачені у цьому документі, можуть бути одержані за допомогою загальновідомих рутинних способів. Способи одержання рекомбінантних поксвірусів або включення гетерологічних нуклеотидних послідовностей у поксвірусний геном добре відомі фахівцям у цій галузі техніки. Наприклад, способи стандартних технологій молекулярної біології, такі як технології клонування ДНК, виділення ДНК і РНК, вестерн-блоттинга, RT-PCR і PCR-ампліфікації описані в *Molecular Cloning, A laboratory Manual* (2nd Ed.) [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], а технології обробки і маніпуляції вірусів описані в *Virology Methods Manual* [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. Крім того, способи і ноу-хау для обробки, маніпулювання і генної інженерії MVA описані в *Molecular Virology: A Practical Approach* [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (див., наприклад, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)] і *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Son, Inc. (1998) (див., наприклад, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)].

Для одержання різних рекомбінантних MVA, описаних у цьому документі, можуть бути застосовані різні способи. Нуклеотидні послідовності, які потрібно вставити у вірус, можуть бути поміщені в плазмідний конструкт *E. coli*, в який включені ДНК, гомологічні ділянки ДНК MVA. Окремо, послідовність ДНК для вставки може бути лігваною з промотором. Місток промотор-ген може розміщуватися в плазмідному конструкті таким чином, щоб місток промотор-ген з обох кінців примикав до ДНК, гомологічній послідовності ДНК, що фланкує область ДНК MVA, що містить неістотний локус. Одержаний плазмідний конструкт може бути ампліфікований шляхом розмноження в бактерії *E. coli* і виділений. Виділена плазміда, що містить послідовність ДНК гена для вставки, може бути трансфікована у клітинну культуру, наприклад, у фібробласти курячих ембріонів (CEF), у цей же час культуру інфікують MVA. Рекомбінація між гомологічною ДНК MVA у плазміді і вірусним геномом, відповідно, може генерувати MVA, модифікований присутністю чужорідних послідовностей ДНК.

Згідно переважному варіанту реалізації, клітина відповідної культури клітин, як, наприклад, клітини CEF, може бути інфікована поксвірусом. Інфікована клітина може бути, потім, трансфікована першим плазмідним вектором, що містить чужорідний ген або гени, переважно під контролем транскрипції елементу, контролюючого експресію поксвірусу. Як описано вище, плазмідний вектор також містить послідовності, здатні направляти вставку екзогенної

послідовності у вибрану частину поксвірусного генома. Необов'язково, плазмідний вектор також містить касету, що містить маркер та/або селекційний ген, функціонально пов'язаний з поксвірусним промотором. Прийнятними маркерами або селекційними генами є, наприклад, гени, що кодуєть зелений флуоресцентний білок β -галактозидазу, неоміцин-фосфорибозилтрансферазу або інші маркери. Застосування селекційних або маркерних касет спрощує ідентифікацію і виділення створеного рекомбінантного поксвірусу. Проте, рекомбінантний поксвірус також можна ідентифікувати за допомогою технології PCR. Згодом, додаткові клітини можуть бути інфіковані рекомбінантним поксвірусом, одержаним, як описано вище, і трансфіковані другим вектором, що містить другий чужорідний ген або гени. На той випадок, якщо цей ген може бути введений в інший сайт інтеграції у поксвірусном геномі, другий вектор також відрізняється по поксвірусним гомологічним послідовностям, що направляють інтеграцію другого чужорідного гена або генів у геном поксвірусу. Після того, як відбудеться гомологічна рекомбінація, може бути виділений рекомбінантний вірус, що містить два або більше чужорідних генів. Для введення додаткових чужорідних генів у рекомбінантний вірус, етапи інфекції і трансфекції можна повторити із застосуванням рекомбінантного вірусу, виділеного на попередніх етапах для інфекції, і з застосуванням додаткового вектора, що містить додатковий чужорідний ген або гени для трансфекції.

Альтернативно, етапи інфекції і трансфекції, як описано вище, є взаємозамінними, тобто, відповідна клітина може спочатку бути трансфікована за допомогою плазмідного вектора, що містить чужорідний ген, а потім інфікована поксвірусом. Як додаткова альтернатива, також можна вводити кожен чужорідний ген у різні віруси, коінфікувати клітину всіма одержаними рекомбінантними вірусами і відібрати для рекомбінації, включаючи всі чужорідні гени. Третім варіантом є лігування генома ДНК і чужорідних послідовностей *in vitro* і відновлення рекомбінованого генома ДНК вірусу вісповакцини із застосуванням вірусу-помічника. Четвертою альтернативою є гомологічна рекомбінація в *E. coli* або інші види бактерій між геномом вірусу вісповакцини, клонуваним у вигляді бактерійної штучної хромосоми (BAC), і лінійною чужорідною послідовністю, що примикає до послідовностей ДНК, гомологічних послідовностей, що фланкують бажаний сайт інтеграції в геномі вірусу вісповакцини.

Експресія генів RSV

В одному варіанті реалізації винаходу експресія однієї, більше або всіх гетерологічних нуклеотидних послідовностей RSV відбувається під контролем одного або більше поксвірусних промоторів. У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусним промотором є промотор Pr7.5 – гібридний ранній/пізній промотор, промотор PRS – синтетичний або природний ранній або пізній промотор, або промотор ATI вірусу вакцини. У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусний промотор вибирають з групи, що складається з промотора PRS (SEQ ID NO: 39), промотора Pr7.5 (SEQ ID NO: 40), промотора PrSynIIIm (SEQ ID NO: 41), промотора PrLE1 (SEQ ID NO: 42) і промотора PrH5m (SEQ ID NO: 43) [L.S. Wyatt et al. (1996), Vaccine 14(15):1451-1458]. У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусним промотором є промотор PRS (SEQ ID NO: 39). У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусним промотором є промотор Pr7.5 (SEQ ID NO: 40). У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусним промотором є промотор PrSynIIIm (SEQ ID NO: 41). У деяких варіантах реалізації винаходу поксвірусним промотором є промотор PrLE1 (SEQ ID NO: 42). У деяких варіантах реалізації винаходу , поксвірусним промотором є промотор PrH5m (SEQ ID NO: 43).

Гетерологічна нуклеотидна послідовність RSV або послідовності можуть експресуватись у вигляді єдиної транскрипційної одиниці. Наприклад, гетерологічна нуклеотидна послідовність RSV може функціонально зв'язуватися з промотором вірусу вісповакцини та/або приєднуватися до термінатору транскрипції вірусу коров'ячої віспи. У деяких варіантах реалізації винаходу одна або більше гетерологічних нуклеотидних послідовностей RSV експресуються у вигляді злитого білка. Злитий білок може додатково містити сайт розпізнавання для пептидази або гетерологічної пептидної послідовності, що саморозщеплюється. Гетерологічна пептидна послідовність, що саморозщеплюється, може бути 2A пептидазою від вірусу ящура.

У деяких варіантах реалізації винаходу "одиниця транскрипції" вставляється сама по собі в сайт інтеграції генома MVA, але може також вставлятися з іншою одиницею (одиницями) транскрипції в сайт інтеграції генома MVA. "Одиниця транскрипції" не має природного походження (тобто, вона є гетерологічною, екзогенною або чужорідною) в сенсі генома MVA і здатна до транскрипції в інфікованих клітинах.

Переважно, рекомбінантний MVA містить 1, 2, 3, 4, 5 або більше одиниць транскрипцій, уведених у геном MVA. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний MVA стабільно експресує білки RSV, кодовані 1, 2, 3, 4, 5 або більше одиницями транскрипцій. У деяких

варіантах реалізації винаходу рекомбінантний MVA містить 2, 3, 4, 5 або більше одиниць транскрипцій, введених у геном MVA в 1, 2, 3 або більше сайтів інтеграції в геномі MVA.

Вакцини RSV і фармацевтичні композиції

Оскільки рекомбінантні віруси MVA, у тому числі MVA-BN, описаний у цьому документі, є вельми обмеженими відносно реплікації і, таким чином, сильно послабленими, то вони є ідеальними кандидатами для лікування широкого кола ссавців, у тому числі людини і навіть людей з послабленим імунітетом. Отже, у цьому документі передбачені рекомбінантні MVA згідно цього винаходу для застосування як активні фармацевтичні речовини, а також фармацевтичні композиції і вакцини, призначені для індукування імунної реакції у живому організмі тварини, включаючи людину.

Для цього рекомбінантний MVA, вакцина або фармацевтична композиція можуть бути одержана у розчині у діапазоні концентрацій, що становить 10^4 - 10^9 TCID₅₀/мл, 10^5 - 5×10^8 TCID₅₀/мл, 10^6 - 10^8 TCID₅₀/мл або 10^7 - 10^8 TCID₅₀/мл. Переважна доза для людини містить від 10^6 до 10^9 TCID₅₀, у тому числі дозу 10^6 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀, 10^8 TCID₅₀ або 5×10^8 TCID₅₀.

Фармацевтичні композиції, передбачені у цьому документі, можуть, як правило, містити один або більше фармацевтично прийнятних та/або придатних носіїв, добавок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розчинників та/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути вода, фізіологічний розчин, гліцерин, етанол, зволожуючі або емульгуючі агенти, рН-буферні речовини і тому подібне. Прийнятні носії зазвичай є великими молекулами, що повільно метаболізуються, такі як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот, ліпідні агрегати або тому подібне.

Для одержання вакцин рекомбінантні віруси MVA, передбачені у цьому документі, можуть бути перетворені на фізіологічно прийнятну форму. Це може бути зроблено, виходячи з досвіду приготування поксвірусних вакцин, що використовуються для вакцинації проти натуральної віспи, як описано в H. Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99:2386-2392 (1974).

Наприклад, очищені віруси можуть зберігатися при -80°C з титром 5×10^8 TCID₅₀/мл із близько 10 mM Tris, 140 mM NaCl pH 7,7. Для одержання вакцинних ін'єкцій, наприклад, 10^2 - 10^8 або 10^2 - 10^9 часток вірусу можна ліофілізувати в 100 мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS) у присутності 2 % пептону і 1 % людського альбуміну в ампулі, переважно скляній ампулі. Крім того, вакцинні ін'єкції можуть бути одержані шляхом ступінчастої ліофілізації вірусу в композиції. Така композиція може містити добавки, такі як маніт, декстран, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон або інші добавки, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні білки (наприклад, людський сироватковий альбумін), що є прийнятними для in vivo введення. Скляну ампулу потім герметизують і вона може зберігатися при температурі від 4°C до кімнатної температури протягом декількох місяців. Проте, до того часу, поки немає необхідності, ампулу бажано зберігати при температурі нижче -20°C .

Для вакцинації або терапії, ліофілізат можна розчинити у водному розчині, переважно фізіологічному розчині, або трис-буфері, і вводити або системно, або місцево, тобто, парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтраназально або будь-яким іншим шляхом введення, відомим фахівцеві у цій галузі. Шлях введення, доза і кількість введення може бути оптимізована фахівцями у цій галузі. Проте, частіше за все, пацієнта вакцинують другою ін'єкцією від близько одного місяця до шести тижнів після першої вакцинної ін'єкції.

Набори, що містять рекомбінантні віруси MVA

Також у цьому документі передбачені набори, що містять один або більше рекомбінантних MVA, описаних у цьому документі. Набор може містити один або декілька контейнерів або флаконів рекомбінантного MVA разом з інструкціями для введення рекомбінантного MVA суб'єктові із ризиком інфекції RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єктом є людина. Інструкції можуть вказувати, що рекомбінантний MVA вводять суб'єктові у вигляді однієї дози або в декількох (тобто, 2, 3, 4 і так далі) дозах. У деяких варіантах реалізації винаходу інструкції вказують, що рекомбінантний вірус MVA вводять у першому (примірування) і другому (бустинг) введенні суб'єктам, які раніше не піддавалися імунізації, або раніше імунізованим суб'єктам.

Додатково передбаченим є набір, що містить рекомбінантний вірус MVA в першому флаконі або контейнері для першого введення (примірування) і другому флаконі або контейнері для другого введення (бустинга). Набор також може містити рекомбінантний MVA у третьому, четвертому або т.д. флаконі або контейнері для третього, четвертого і так далі введення (бустинга).

Способи і застосування рекомбінантних вірусів MVA

Також у цьому документі передбачені способи імунізації суб'єктів-тварин, а також рекомбінантні MVA для застосування у способах імунізації суб'єктів-тварин і застосування

рекомбінантних MVA, передбачених у цьому документі, для одержання медикаменту або вакцини для імунізації суб'єкта-тварини. У деяких варіантах реалізації винаходу твариною є ссавець. У деяких варіантах реалізації винаходу ссавцем є щур, кролик, свині, миші або людина, а також способи включають введення дози будь-якого одного або декількох

рекомбінантних MVA, передбачених у цьому документі, суб'єктові.

Суб'єктом переважно є людина, і вона може бути дорослим, причому дорослим з послабленим імунітетом. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єктом є дорослий старше 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 або 85 років. У інших варіантах реалізації винаходу вік суб'єкта складає менше 5 років, менше 3 років, менше 2 років, менше ніж 15 місяців, менше ніж 12 місяців, менше ніж 9 місяців, менше ніж 6 або менше 3 місяців. Вік суб'єкта може також варіювати від 0-3 місяців, 3-6 місяців, 6-9 місяців, 9-12 місяців, 1-2 роки, або 2-5 років.

У деяких варіантах реалізації винаходу будь-який рекомбінантний MVA, передбачений у цьому документі, вводять суб'єктові у дозі від 10^6 до 10^9 TCID₅₀, у дозі від 10^6 до 5×10^8 TCID₅₀ або від 10^7 до 10^8 TCID₅₀. Рекомбінантні MVA, передбачені у цьому документі, можуть також вводитися суб'єктові у дозі 10^6 , 10^7 TCID₅₀, 10^8 або 5×10^8 TCID₅₀. У деяких варіантах реалізації винаходу будь-який рекомбінантний MVA, передбачений у цьому документі, вводять людині у дозі 10^7 TCID₅₀, 10^8 або 5×10^8 TCID₅₀.

Рекомбінантні MVA, передбачені у цьому документі, вводять суб'єктові в одиничній дозі або в багатократних (тобто, 2, 3, 4 і так далі) дозах. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантні MVA вводять в першому (примірування) і другому (бустинг) введенні. У деяких варіантах реалізації винаходу перша доза містить від 10^7 до 10^8 TCID₅₀ рекомбінантного вірусу MVA, а друга доза містить від 10^7 до 10^8 TCID₅₀ рекомбінантного вірусу MVA.

Рекомбінантні MVA можна вводити системно або місцево, парентерально, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтраназально або, переважно, підшкірно або інтраназально. Рекомбінантні MVA можна також вводити будь-яким іншим шляхом введення, відомим фахівцеві у цій галузі.

В іншому аспекті винаходу, у цьому документі передбачені способи діагностування інфекції RSV і способи визначення, чи є ризик рецидиву інфекції RSV у суб'єкта, який може бути серйозною загрозою, особливо для новонароджених, дітей у віці від 1 до 6 років та/або літніх людей.

Автори цього винаходу виявили, що сучасні способи діагностики інфекції RSV можуть забезпечувати неправильні результати. Наприклад, імуноферментний аналіз, що використовується для визначення антитіл проти RSV, або визначення вірусу методом бляшок, не обов'язково точно визначають осіб, схильних до ризику рецидиву інфекції. Так, автори цього винаходу відмітили, що навіть при тому, що зразок узятий у пацієнта, може повернутися негативний результат у методі вірусних бляшок [див., наприклад, W. Olszewska et al., 2004], такі результати можуть бути інколи помилково негативними, оскільки чутливіші методи інколи демонструють, що все ще присутні інфекційні частки RSV. Насправді такі методи, як кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу (qRT-PCR), обов'язкові для підтвердження того, що суб'єкт насправді може бути інфікований RSV і піддається ризику рецидиву інфекції, або ж вакцинований суб'єкт набув стерильний імунітет до RSV. Це визначення може мати вирішальне значення, тому що повторне зараження після вакцинації інколи викликає посилену хворобу, інколи призводить до смерті.

Відповідно, у деяких варіантах реалізації винаходу у цьому документі передбачені способи визначення того, чи є для суб'єкта ризик рецидиву інфекції RSV, що включають кількісне визначення того, чи містить зразок, одержаний від суб'єкта, геноми RSV, причому присутність геномів RSV вказує на вірогідність рецидиву інфекції RSV. У деяких варіантах реалізації винаходу кількісне визначення того, чи містить зразок, одержаний від суб'єкта, геноми RSV, проводять за допомогою qRT-PCR.

Як використано у цьому документі, термін "зразок" відноситься до будь-якого біологічного зразка, одержаного від людини, клітинної лінії, культури тканини або іншого джерела, що містить полінуклеотиди і поліпептиди або їх частини. Біологічні зразки охоплюють рідини організму (такі як, наприклад, кров, сироватка, плазма, сеча, синовіальна рідина, спинномозкова рідина, бронхоальвеолярний лаваж (BAL)) і тканини організму, в яких виявлені та/або імовірно містяться RSV, у тому числі клінічні зразки, одержані, наприклад, від суб'єктів, що беруть участь у клінічному випробуванні або іншому експериментальному дослідженні. Способи одержання тканин біопсії і рідин організму від ссавців добре відомі у цій галузі техніки. У деяких варіантах реалізації винаходу біологічний зразок містить нуклеїнові кислоти RSV.

Як використовується в цьому описі взаємозамінно, терміни "RT-qPCR" або "qRT-PCR" відносяться до способу, відомого як "кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі

реального часу" В деяких випадках цей метод може також згадуватися як кінетична полімеразна ланцюгова реакція (KPCR).

У деяких варіантах реалізації винаходу в цьому описі передбачені способи визначення наявності у суб'єкта набутого стерильного імунітету до RSV, що включають кількісне визначення того, чи містить зразок, одержаний від суб'єкта, геноми RSV, причому присутність геномів RSV вказує, що у суб'єкта немає набутого стерильного імунітету до RSV. Також, у цьому описі передбачені способи імунізації суб'єкта, в якого немає набутого стерильного імунітету до RSV, що включають інтраназальне введення будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі, суб'єктові. Додатково або альтернативно, будь-який рекомбінантний MVA, описаний у цьому документі, передбачений для застосування у способах імунізації суб'єкта, в якого немає набутого стерильного імунітету до RSV, де спосіб включає інтраназальне введення будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі, суб'єктові. Також, у цьому описі передбачене застосування будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі, для одержання медикаменту та/або вакцини для імунізації суб'єкта, в якого немає набутого стерильного імунітету до RSV, причому медикамент або вакцину вводять інтраназально.

У деяких варіантах реалізації винаходу в цьому описі передбачені способи індукування стерильного імунітету до RSV у суб'єкта, який не має набутого стерильного імунітету до RSV, що включає інтраназальне введення будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі, суб'єктові. Також, у цьому описі передбачений один будь-який рекомбінантний MVA, описаний у цьому документі, для застосування у способі індукування стерильного імунітету до RSV у суб'єкта, який не має набутого стерильного імунітету до RSV, де способи включають інтраназальне введення одного будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі. Додатково або альтернативно, у цьому описі передбачене застосування будь-якого рекомбінантного MVA, описаного у цьому документі, для одержання медикаменту та/або вакцини для індукування стерильного імунітету до RSV у суб'єкта, який не має набутого стерильного імунітету до RSV, причому медикамент або вакцину вводять інтраназально.

Деякі варіанти реалізації цього винаходу також включають наступні пункти:

1. Рекомбінантний MVA, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, для лікування або попередження інфекції RSV шляхом інтраназального введення, причому внутрішньом'язове введення виключається.

2. Застосування рекомбінантного MVA, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, для одержання фармацевтичної композиції та/або вакцини, де фармацевтичну композицію і вакцину вводять інтраназально, причому внутрішньом'язове введення виключається.

3. Спосіб імунізації суб'єкта, включаючи людину, проти інфекції RSV, що включає інтраназальне введення рекомбінантного MVA, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує принаймні одну антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, суб'єктові, включаючи людину, причому внутрішньом'язове введення виключається.

4. Рекомбінантний MVA за п. 1, застосування за п. 2 та/або спосіб за п. 3, що включає виключно інтраназальне введення.

5. Рекомбінантний MVA за п. 1, застосування за п. 2 та/або спосіб за п. 3, що включає підшкірне введення.

6. Рекомбінантний MVA за будь-яким із пп. 1 або 4 і 5, застосування за будь-яким із пп. 2, 4 або 5 та/або спосіб за будь-яким із пп. 3-5, де рекомбінантний MVA додатково містить нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV.

7. Рекомбінантний MVA, що містить принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і принаймні одну нуклеотидну послідовність, кодує нуклеокапсидну антигенну детермінанту RSV.

8. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-7, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту F RSV.

9. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-8, що додатково містить принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV.

10. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-9, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує непроцесований мембранний глікопротеїн F RSV.

11. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 8-10, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV, одержана зі штаму A RSV, переважно з A2 та/або A_{long}.

12. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 8-11, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV, містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4.

5 13. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 8-12, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:3.

14. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-13, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує усічений мембранний глікопротеїн F RSV.

10 15. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 14, де нуклеотидна послідовність, що кодує усічений мембранний глікопротеїн F MVA, одержана зі штаму A RSV, переважно з A_{long}.

16. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 14 або 15, де усічений мембранний глікопротеїн F MVA не має трансмембранного домена.

15 17. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 14-16, де усічений мембранний глікопротеїн F MVA не має цитоплазматичного домена.

18. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 8-17, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV, містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

20 19. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 8-18, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну F RSV, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:5.

20. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV.

25 21. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-20, що додатково містить принаймні одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV.

22. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-21, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує непроцесований мембранний глікопротеїн G RSV.

23. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 20-22, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV, одержана зі штаму A RSV, переважно зі штаму A2 та/або B.

35 24. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 20-23, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV, містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2.

25. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 20-24, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1.

40 26. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-25 де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, кодує усічений мембранний глікопротеїн G RSV.

27. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 26, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту усіченого мембранного глікопротеїну G RSV, одержана зі штаму B RSV.

28. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 26 або 27, де усічений мембранний глікопротеїн G RSV не має трансмембранного домена.

29. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 26-28, де усічений мембранний глікопротеїн G RSV не має цитоплазматичного домена.

30. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 20-29, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV, містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.

31. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 20-30, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну G RSV, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7.

32. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 6-31, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка N RSV.

33. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 6-32, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенну детермінанту матричного білка M2 RSV.

5 34. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким з пп. 6-33, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує непроцесований білок.

35. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 32-34, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка N RSV, одержана зі штаму A RSV, переважно штаму A2.

10 36. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 32-35, де нуклеотидна послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV, кодує антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка N RSV і матричного білка M2 RSV.

37. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 36, де обидві антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка N RSV і матричного білка M2 RSV кодуються єдиною відкритою рамкою зчитування.

15 38. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 36 або 37, де антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка N RSV і матричного білка M2 RSV розділені протеазним доменом, що саморозщеплюється.

39. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 38, де послідовність протеазного домена, що саморозщеплюється, одержана з вірусу ящура.

40. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 38 або 39, де послідовність протеазного домена, що саморозщеплюється, є фрагментом послідовності протеази 2A.

41. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 38-40, де послідовність протеазного домена, що саморозщеплюється, містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

42. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 38-41, де послідовність протеазного домена, що саморозщеплюється, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 11.

43. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 37-42, де єдина відкрита рамка зчитування містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18.

44. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 37-43, де єдина відкрита рамка зчитування містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 17.

45. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV, і одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV.

46. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 45, що містить антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну F RSV і нуклеокапсидного білка N RSV.

40 47. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 45, що містить антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну F RSV і матричного білка M2 RSV.

48. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 45, що містить антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну G RSV і нуклеокапсидного білка N RSV.

45 49. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 45, що містить антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну G RSV і матричного білка M2 RSV.

50. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-44, що містить дві нуклеотидні послідовності, що кодують антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV і одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV.

50 51. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 50, що містить антигенні детермінанти мембранних глікопротеїнів F та/або G RSV і нуклеокапсидного білка N RSV.

52. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 50, що містить антигенні детермінанти мембранних глікопротеїнів F та/або G RSV і матричного білка M2 RSV.

53. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-44, що містить дві нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну RSV, і дві нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка RSV.

54. Рекомбінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 53, що містить нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну F та/або G RSV, і антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка N та/або матричного білка M2 RSV.

55. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-44, що містить три нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти мембранного глікопротеїну RSV, і дві нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка RSV.

5 56. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 55, що містить антигенні детермінанти двох мембранних глікопротеїнів F RSV та/або одного мембранного глікопротеїну G RSV і антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка N RSV та/або матриксного білка M2 RSV.

10 57. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 55, що містить антигенні детермінанти двох мембранних глікопротеїнів G RSV та/або одного мембранного глікопротеїну RSV F і антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка N RSV та/або матриксного білка M2 RSV.

15 58. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким з пп. 1-44, що містить чотири нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти мембранні глікопротеїни RSV і одну нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV.

59. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 58, що містить антигенні детермінанти двох мембранних глікопротеїнів F RSV та/або двох мембранних глікопротеїнів G RSV і антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка N RSV або матриксного білка M2 RSV.

20 60. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-44, що містить чотири нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти мембранних глікопротеїнів RSV і дві нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні детермінанти нуклеокапсидних білків RSV.

25 61. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за п. 60, що містить антигенні детермінанти двох мембранних глікопротеїнів F RSV та/або двох мембранних глікопротеїнів G RSV і антигенні детермінанти нуклеокапсидного білка N RSV та/або матриксних білків M2 RSV.

62. Рекombінантний MVA, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-61, де MVA, використаний для одержання рекombінантного MVA, є MVA-BN або його похідним.

30 63. Рекombінантний MVA за будь-яким із пп. 1 або 4-62 для застосування як активної фармацевтичної речовини.

64. Фармацевтична композиція та/або вакцина, що містить рекombінантний MVA за будь-яким із пп. 1 або 4-63 і, необов'язково фармацевтично прийнятний носій або розчинник.

65. Застосування рекombінантного MVA за будь-яким із пп. 1 або 4-63 для одержання фармацевтичної композиції та/або вакцини.

35 66. Рекombінантний MVA за будь-яким із пп. 6-63, фармацевтична композиція та/або вакцина за п. 64 та/або застосування за будь-яким із пп. 2, 4-6, 8-62 або 65 для лікування або попередження інфекції RSV.

40 67. Спосіб імунізації суб'єкта, включаючи людину, проти інфекції RSV, що включає введення рекombінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63 або 66 та/або фармацевтичної композиції та/або вакцини за п. 64 або 66 суб'єктові, включаючи людину.

68. Рекombінантний MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63 або 66, фармацевтична композиція та/або вакцина за п. 64 або 66, застосування за будь-яким із пп. 2, 4-6, 8-62, 65 або 66 та/або спосіб за будь-яким з пп. 3-6, 8-62 або 67, де рекombінантний MVA знаходиться або вводиться у дозі 10^7 – 10^9 TCID₅₀.

45 69. Рекombінантний MVA, фармацевтична композиція та/або вакцина, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 5-68, де рекombінантний MVA знаходиться або вводиться інтраназально або підшкірно.

50 70. Рекombінантний MVA, фармацевтична композиція та/або вакцина, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-69, де рекombінантний MVA знаходиться або вводиться в одиничній або багаторазовій дозах імунологічно незараженому або імунологічно дослідному суб'єктові, включаючи людину.

71. Рекombінантний MVA, фармацевтична композиція та/або вакцина, застосування та/або спосіб за будь-яким із пп. 1-70 для введення суб'єктові, включаючи людину, у віці більше 2 років.

55 72. Рекombінантний MVA, фармацевтична композиція та/або вакцина, застосування і спосіб за будь-яким із пп. 1-70 для введення суб'єктові, включаючи людину, у віці менше 2 років.

73. Набор, що містить один або декілька флаконів рекombінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66 або 68-72 і інструкції по введенню вірусу суб'єктові з ризиком інфекції RSV.

60 74. Набор, що містить рекombінантний MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66 або 68-72 та/або набір за п. 73, що містить рекombінантний MVA у першому флаконі або контейнері для першого введення (примірування) і в другому флаконі або контейнері для другого введення (бустинг).

75. Набор за п. 73 або 74, що містить рекомбінантний MVA у третьому, четвертому і так далі флакони або контейнери для третього, четвертого або подальшого введення (бустинг).

76. Клітина, що містить рекомбінантний MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63 або 66.

77. Спосіб одержання рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66 або 68-72, що включає етапи:

(a) інфікування клітини-господаря вірусом MVA

(b) трансфектування інфікованої клітини рекомбінантним вектором, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує антигенну детермінанту RSV, причому вказана нуклеотидна послідовність додатково містить послідовність геному вірусу MVA, здатну направляти інтеграцію нуклеотидної послідовності у вірусний геном MVA,

(c) ідентифікації, виділення і, необов'язково, очищення одержаного рекомбінантного вірусу MVA.

78. Рекомбінантний MVA, одержаний способом за п. 77.

79. Спосіб одержання рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66 або 68-72 та/або одержання антигенної детермінанти, експресованої з генома вказаного рекомбінантного MVA, що включає етапи:

(a) інфікування клітини-господаря рекомбінантним MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66 або за пп. 68-72, або трансфектування клітини рекомбінантної ДНК рекомбінантного MVA,

(b) культивування інфікованої або трансфектованої клітини,

(c) виділення MVA та/або антигенної детермінанти із вказаної клітини.

80. Рекомбінантний MVA та/або антигенна детермінанта, одержані способом за п. 79.

81. Спосіб визначення ризику рецидиву інфекції RSV у суб'єкта, що включає визначення за допомогою RT-qPCR присутності RSV у зразку, одержаному від суб'єкта, при цьому присутність RSV вказує на наявність рецидивної інфекції RSV.

82. Спосіб визначення наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, що включає визначення за допомогою RT-qPCR присутності RSV у зразку, одержаному від суб'єкта, при цьому присутність RSV вказує на те, що суб'єкт не набув стерильний імунітет проти RSV.

83. Спосіб імунізації суб'єкта, діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, що включає інтраназальне введення рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 та/або фармацевтичної композиції та/або вакцини за будь-яким із пп. 64, 66 або 68-72 суб'єктові.

84. Рекомбінантний MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 та/або фармацевтична композиція та/або вакцина за будь-яким із пп. 64, 66 або 68-72 для застосування у способі імунізації суб'єкта, діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, де вказаний спосіб включає інтраназальне введення вказаного рекомбінантного MVA суб'єктові.

85. Застосування рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 для одержання фармацевтичної композиції та/або вакцини для імунізації суб'єкта діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, де фармацевтичну композицію та/або вакцину вводять інтраназально.

86. Спосіб індукування стерильного імунітету у суб'єкта, діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, що включає інтраназальне введення рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 та/або фармацевтичної композиції та/або вакцини за будь-яким із пп. 64, 66 або 68-72 суб'єктові.

87. Рекомбінантний MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 та/або фармацевтична композиція та/або вакцина за будь-яким із пп. 64, 66 або 68-72 для застосування у способі індукування стерильного імунітету у суб'єкта, діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, де вказаний спосіб включає інтраназальне введення вказаного рекомбінантного MVA суб'єктові.

88. Застосування рекомбінантного MVA за будь-яким із пп. 1, 4-63, 66, 68-72, 78 або 80 для одержання фармацевтичної композиції та/або вакцини для індукування стерильного імунітету у суб'єкта, діагностованого за допомогою способу за п. 82 з приводу наявності набутого стерильного імунітету проти RSV, де фармацевтичну композицію або вакцину вводять інтраназально.

Слід розуміти, що, як і попередній загальний, так і детальний опис є лише ілюстративними і пояснювальними і не звужують або обмежують винахід. Креслення, що додаються, які включені і складають частину даного опису, ілюструють різні варіанти реалізації винаходу і разом із описом слугують для пояснення принципів винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1 ілюструє гетерологічні гени RSV, використані в тестованих рекомбінантних MVA-конструктах, MVA-mBN199B, MVA-mBN201B, MVA-mBN201BΔM2, MVA-mBN294B, MVA-mBN295B і MVA-mBN330B.

5 Фігура 2 ілюструє специфічні реакції на сироватковий RSV IGG, виміряні за допомогою ELISA на основі IBL Hamburg. Мишей імунізували (підшкірно або інтраназально) двічі або тричі TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку розводили 1/100 і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IGG ELISA на основі набору IBL Hamburg, використовуючи планшети, вкриті білками F і G RSV.

10 Фігура 3 ілюструє специфічні IgG реакції на сироватковий RSV, виміряні за допомогою ELISA на основі IBL Hamburg, після серійного розведення. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку розводили (1/100, 1/200 і 1/400) і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IgG ELISA на основі набору IBL Hamburg, використовуючи планшети, вкриті білками F і G RSV.

15 Фігура 4 ілюструє специфічні IgG реакції на сироватковий RSV, виміряні за допомогою ELISA на основі IBL Hamburg, із застосуванням планшет, вкритих лише білком F. Мишей імунізували підшкірно двічі або тричі TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку розводили 1/100 і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IgG ELISA на основі набору IBL Hamburg, використовуючи планшети, вкриті лише білком F RSV.

20 Фігура 5 ілюструє специфічні IgG реакції на сироватковий RSV, виміряні за допомогою ELISA на основі Serion. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку розводили (1/100) і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IgG ELISA на основі набору Serion, використовуючи планшети, вкриті лізатом RSV.

25 Фігура 6 ілюструє специфічні IgA реакції на сироватковий RSV у порівнянні із специфічними IgG реакціями на сироватковий RSV, виміряні за допомогою ELISA на основі IBL Hamburg у рідині BAL і сироватки. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку і рідину BAL розводили (1/100) і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IgG або IgA ELISA на основі набору IBL Hamburg, використовуючи планшети, вкриті білками F і G RSV.

30 Фігура 7 ілюструє RSV F-, RSV G- і RSV M2-специфічні Т-клітинні реакції, виміряні за допомогою ELISPOT. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Селезінки ізолювали на 48 день, а спленцити повторно стимулювали трьома різними RSV F-специфічними білками (RSV-1 (SEQ ID NO: 19), RSV-2 (SEQ ID NO: 20) і RSV-3 (SEQ ID NO: 21), одним RSV G-специфічним білком (RSV-4 (SEQ ID NO: 22)), одним RSV M2-специфічним білком (RSV-9 (SEQ ID NO: 27)) або MVA-BN. IFNγ-секретуючі клітини виявляли за допомогою ELISPOT. Індекс стимуляції розраховували, як описано в Прикладах.

35 Фігура 8 ілюструє відносне зниження маси тіла після зараження RSV (A2). Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV(A2) на 49-й день. Масу вимірювали щодня з дня зараження. Вагу на день зараження використовували як первинний рівень для розрахунку відсотка відносної зміни маси тіла.

40 На Фігурі 9 проілюстровані навантаження RSV у легенях, виміряна методом бляшок. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV(A2) у день 49. Легені ізолювали через 4 дні, а навантаження RSV (БУО на легеню) визначали за методом бляшок.

55 Фігура 10 ілюструє навантаження RSV у легенях, виміряна за допомогою RT-qPCR. Мишей імунізували двічі або тричі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV A2 на 49-й день. Легені

ізолювали через 4 дні, а навантаження RSV (оцінюється, виходячи із спостережуваної кількості копій гена L) визначали за допомогою RT-qPCR.

Фігура 11 ілюструє рівень IL4 у BAL через 4 дні після зараження RSV(A2), виміряний за допомогою ELISA. Мишей імунізували двічі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B або MVA-mBN201B. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV A2. Легені промивали 1 мл PBS через 4 дні, а рівень IL4 у BAL визначали за допомогою ELISA. (n.d.=не виявляється).

Фігура 12 ілюструє рівень IL5 у BAL через 4 дні після зараження RSV(A2), виміряний за допомогою ELISA. Мишей імунізували двічі (підшкірно або інтраназально) TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B або MVA-mBN201B. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV A2. Легені промивали 1 мл PBS через 4 дні, а рівень IL5 у BAL визначали за допомогою ELISA. (n.d.=не виявляється).

Фігура 13 ілюструє специфічні IgG реакції на сироватковий RSV, виміряні за допомогою ELISA на основі Serion. Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку від 5 мишей у кожній групі, одержану через 2 тижні після останньої імунізації, розбавляли і аналізували із застосуванням RSV-специфічного IgG ELISA на основі набору Serion, використовуючи планшети, вкриті лізатом RSV.

Фігура 14 ілюструє реакції нейтралізуючих антитіл, специфічних до сироваткового RSV, виміряні за допомогою PRNT. Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Сироватку від 5 мишей у кожній групі, одержану через 2 тижні після останньої імунізації, аналізували із застосуванням PRNT.

Фігура 15 ілюструє RSV F- і RSV M2-специфічні Т-клітинні реакції, виміряні за допомогою ELISPOT. Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV. Селезінки ізолювали на 34й день, а спленоцити рестимулювали одним RSV F-специфічним білком (RSV-2 (SEQ ID NO:20), одним RSV M2-специфічним білком (RSV-9 (SEQ ID NO:27)) або MVA-BN. IFN γ -секретуючі клітини виявляли за допомогою ELISPOT. Індекс стимуляції розраховували, як описано у Прикладах.

Фігура 16 ілюструє навантаження RSV у легенях, виміряна методом бляшок. Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-х тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV або внутрішньом'язово 50 мкл FI-RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV(A2) на 49-й день. Легені ізолювали через 4 дні, а навантаження RSV (БУО на легеню) визначали за методом бляшок.

Фігура 17 ілюструє навантаження RSV у легенях, виміряне за допомогою RT-qPCR. Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV або внутрішньом'язово 50 мкл FI-RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV A2 на 49-й день. Легені ізолювали через 4 дні, а навантаження RSV (оцінюється, виходячи із спостережуваної кількості копій гена L) визначали за допомогою RT-qPCR.

Фігура 18 ілюструє еозинофільну і нейтрофільну інфільтрації у рідинах BAL через 4 дні після зараження RSV(A2). Мишей імунізували підшкірно двічі з 3-тижневим інтервалом TBS або 1×10^8 TCID₅₀ будь-якого з MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Контрольних мишей імунізували двічі інтраназально 10^6 БУО RSV або внутрішньом'язово 50 мкл FI-RSV. Мишей потім заражали 10^6 БУО RSV A2. Легені промивали 1 мл PBS через 4 дні і визначали відсоток еозинофілів і нейтрофілів у рідині BAL.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок G зі штаму людського RSV (hRSV) A2 (GenBank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 2 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка G зі штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 3 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок F (варіант BN) зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 4 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка F (варіант BN) з штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 5 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок F (варіант BN) зі штаму ALong hRSV.

SEQ ID NO: 6 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка F (Варіант BN) зі штаму ALong hRSV.

5 SEQ ID NO: 7 є послідовністю ДНК, що кодує усічений білок G, позбавленою трансмембранного і цитоплазматичного доменів зі штаму B hRSV (GenBank Accession No. P20896).

SEQ ID NO: 8 є амінокислотною послідовністю усіченого білка G, позбавленою трансмембранного і цитоплазматичного доменів із штаму B hRSV (GenBank Accession No. P20896).

10 SEQ ID NO: 9 є послідовністю ДНК, що кодує білок N, позбавленою термінуючого кодону зі штаму A2 hRSV (Genbank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 10 є амінокислотною послідовністю білка N, позбавленою термінуючого кодону зі штаму A2 hRSV (Genbank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 11 є послідовністю ДНК, що кодує фрагмент протеази 2A із вірусу ящура, позбавленої як стартового, так і термінуючого кодонів.

15 SEQ ID NO: 12 є амінокислотною послідовністю фрагмента протеази 2A з вірусу ящура, позбавленою як стартового, так і термінуючого кодонів.

SEQ ID NO: 13 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок M2, позбавленою стартового кодону з штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

20 SEQ ID NO: 14 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка M2, позбавленою стартового кодону з штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 15 є послідовністю ДНК, що кодує усічений білок F, позбавленою трансмембранного і цитоплазматичного доменів (варіант BN) зі штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

25 SEQ ID NO: 16 є амінокислотною послідовністю усіченого білка F, позбавленою трансмембранного і цитоплазматичного доменів (варіант BN), зі штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

30 SEQ ID NO: 17 є послідовністю ДНК, що кодує білок N, позбавленою термінуючого кодону штаму A2 hRSV (Genbank Accession No. M11486)+послідовність ДНК, що кодує фрагмент протеази 2A з вірусу ящура, позбавлена як стартового так і термінуючого кодонів, +послідовність ДНК, що кодує непроцесований білок M2, позбавлений стартового кодону зі штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

35 SEQ ID NO: 18 є амінокислотною послідовністю білка N зі штаму A2 hRSV (Genbank Accession No. M11486) + амінокислотна послідовність фрагмента протеази 2A з вірусу ящура, позбавлена стартового кодону+амінокислотна послідовність непроцесованого білка M2, позбавлена стартового кодону зі штаму A2 hRSV (GenBank Accession No. M11486).

SEQ ID NO: 19 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-1, одержаного з білка F RSV.

SEQ ID NO: 20 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-2, одержаного з білка F RSV.

SEQ ID NO: 21 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-3, одержаного з білка F RSV.

40 SEQ ID NO: 22 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-4, одержаного з білка G RSV.

SEQ ID NO: 23 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-5, одержаного з білка G RSV.

SEQ ID NO: 24 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-6, одержаного з білка G RSV.

SEQ ID NO: 25 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-7, одержаного з білка G RSV.

SEQ ID NO: 26 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-8, одержаного з білка G RSV.

45 SEQ ID NO: 27 є амінокислотною послідовністю пептиду RSV-9, одержаного з білка M2 RSV.

SEQ ID NO: 28 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок F зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 29 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка F зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 30 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок G зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 31 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка G зі штаму A2 hRSV.

50 SEQ ID NO: 32 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок M2 зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 33 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка M2 зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 34 є послідовністю ДНК, що кодує непроцесований білок N зі штаму A2 hRSV.

SEQ ID NO: 35 є амінокислотною послідовністю непроцесованого білка N зі штаму A2 hRSV.

55 SEQ ID NO: 36 є праймером 1, використаним у RT-qPCR.

SEQ ID NO: 37 є праймером 2, використаним у RT-qPCR.

SEQ ID NO: 38 є зондом 6, використаним у RT-qPCR.

SEQ ID NO: 39 є нуклеотидною послідовністю промотора PrS.

SEQ ID NO: 40 є нуклеотидною послідовністю промотора Pr7,5.

SEQ ID NO: 41 є нуклеотидною послідовністю промотора PrSynIIm.

60 SEQ ID NO: 42 є нуклеотидною послідовністю промотора PrLE1.

SEQ ID NO: 43 є нуклеотидною послідовністю промотора PrH5m.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Конструювання рекомбінантних MVA.

Одержання рекомбінантного MVA було виконане шляхом вставки RSV-кодуючих послідовностей разом з індикаторними промоторами (Фігура 1) у геном MVA за допомогою гомологічної рекомбінації в клітині CEF із застосуванням селекційного маркера для відбору рекомбінантного MVA. Застосування міжгенних ділянок (IGR) як сайтів вставки описане в WO 03/097845. Для видалення селекційного маркера був застосований другий етап гомологічної рекомбінації.

Вірус MVA-BN® використовували як первинний матеріал для одержання рекомбінантного MVA-mBN199B, що містить гени для RSV-A2-G і RSV-F-A2_BN в IGR88/89. Оригінальний матеріал MVA-mBN199 був використаний як первинний матеріал для одержання MVA-mBN201B, описаного нижче.

Вставки в IGR88/89 (MVA-mBN199B):

Кодуюча послідовність для RSV-A2-G базується на природній послідовності глікопротеїну G штаму RSV-A2. Кодуюча послідовність білка злиття BN RSV-F-A2 також базується на штамі RSV-A2, але була модифікована Bavarian Nordic. Обидва вставлені гени були синтезовані Geneart із застосуванням людського адаптованого кодону і застосовані для клонування рекомбінаційної плазмиди. Білкова послідовність RSV-A2-G демонструє 100 % ідентичність із послідовністю P03423.1 GenBank. Білкова послідовність BN RSV-F-A2 демонструє лише 99 % ідентичність з послідовністю P03420.1 GenBank через одну одиничну амінокислотну заміну (P на A) у положенні 103.

Вставки в IGR148/149 (MVA-mBN201B):

Кодуючі послідовності для RSV-N-A2 і RSV-M2-A2 базуються на природних послідовностях відповідних глікопротеїнів штаму RSV-A2. Обидва гени сполучені пептидною послідовністю 2A [M.D. Ryan et al. (1991), J. Gen. Virol. 72(Pt 11):2727-2732], що саморозщеплюється, що дозволяє експресувати два окремих нативних білка під контролем єдиного промотора. Кодуючі послідовності для RSV-G(B) і RSV-F Along BN були усічені для видалення трансмембранних доменів із тим, щоб можна було секретувати експресовані білки. Всі вставлені гени були синтезовані Geneart із застосуванням оптимізованого кодону і застосовані для клонування рекомбінаційної плазмиди. Білкові послідовності RSV-N-A2 і RSV-M2-A2 демонструють 100 % ідентичність із послідовністю P03418.1 і P04545.1 GenBank, відповідно. Білкова послідовність усіченого RSV-G(B) демонструє 100 % ідентичність із послідовністю P20896.1 GenBank. Кодуюча послідовність усіченого RSV-F Along BN була розроблена для того, щоб містити перші 526 амінокислот білка RSV-F, як описано R.P. Du et al. (1994) Biotechnology (N Y) 12(8):813-818.

Мутант із делецією в M2(A2) з MVA-mBN210BΔM2:

MVA-mBN210BΔM2 містить делеційну мутацію у 12-тому кодоні гена M2(A2), що не дозволяє експресуватись функціональному M2. Ця делеція викликає додавання двох амінокислот треоніна і аланіна до перших 11 амінокислот із M2 (A2), за якими йде транскрипційний термінатор (термінуючий кодон UGA).

Приклад 2: Імуногенність і ефективність вакцин рекомбінантних MVA, що експресують білок F RSV, білок G RSV, білок N RSV і білок M2 RSV.

Вакцинний кандидат MVA-mBN199B кодує глікопротеїн (G) і білок злиття (F) із RSV, тоді як MVA-mBN210BΔM2 і MVA-mBN201B експресують усічені версії F і G на додаток до непроцесованих білків F і G, нуклеокапсидний білок (N) і в разі MVA-mBN201B також матриксний білок (M2) із RSV (дивись Фігуру 1). Метою цих експериментів був аналіз імуногенності і захисної ефективності MVA-mBN210BΔM2 і MVA-mBN201B у порівнянні з MVA-mBN199B після двох або трьох імунізацій шляхом підшкірних (s.c.) або інтраназальних (i.n.) уведень.

Ефективність цих конструктів тестували, використовуючи модель зараження RSV(A2) на мишах BALB/c. Дві імунізації MVA-mBN199B або MVA-mBN201B надавали частковий захист, як було оцінено за допомогою RT-qPCR, при підшкірному застосуванні і майже повний захист при інтраназальному застосуванні. Захист, наданий MVA-mBN201B, був кращим, ніж захист, наданий MVA-mBN199B. Не спостерігалось відмінностей у гуморальних імунних відповідях, викликаних двома конструктами, хоча значні відмінності спостерігалися в Т-клітинних відповідях. MVA-mBN199B викликав добру RSV F-специфічну клітинну відповідь, тоді як з MVA-mBN201B спостерігалася сильна M2-специфічна Т-клітинна відповідь, а також більш яскраво виражена G-специфічна відповідь у порівнянні з MVA-mBN199B. Оскільки IgG і Т-клітинні відповіді, що індукуються після підшкірної і інтраназальної імунізації, були схожими, то майже повний стерильний імунітет, одержаний за допомогою інтраназальних імунізацій, ймовірно

корелює з індукцією і секрецією RSV-специфічного IgA в сайті мукозальної інфекції. Для MVA-mBN201BΔM2 відсутність M2-специфічних Т-клітинних відповідей корелює зі зниженим захистом у порівнянні з MVA-mBN201B і призводить до подібного захисту, ніж MVA-mBN199B.

План дослідження

- 5 Мишам вводили підшкірно (s.c.) або інтраназально (i.n.) 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN199B (групи 3, 4 і 5), 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN201B (групи 6, 7 і 8) або 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN201BΔM2 (група 9). Мишей заражали двічі (Групи 3, 4, 6, 7 і 9) або тричі (групи 5 і 8) згідно Таблиці 1. Двом контрольним групам вводили (s.c.) двічі TBS (група 1) або інтраназально RSV (група 2) згідно Таблиці 7. Кров брали за день до імунізації або зараження, а також у день убивання. Титри RSV-специфічного IgG визначали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). На 48-й день половину мишей вбивали. Видаляли їх селезінки і готували для аналізу RSV-специфічних Т-клітинних відповідей за допомогою методу імуоферментних плям (ELISPOT). На 49-й день мишей, що залишилися, заражали (i.n.) 10^6 БУО RSV A2. Зовнішній вигляд і масу тіла контролювали щодня, починаючи з дня зараження. Через чотири дні після зараження мишей убивали шляхом ін'єкції підвищеної дози кетаміна-ксилазіна і знекровлювали. Після легеневого лаважа легені видаляли, а навантаження RSV аналізували за допомогою методу бляшок і RT-qPCR.

Таблиця 1

План дослідження

Група	Чисельність групи	Клітин а	Введення досліджуваних і контрольних зразків				Кровопускання і ELISPOT (день)%	Зараження (день)%, #
			Ін'єкції	Схема (день) %	Шлях	Доза на ін'єкцію		
1	5	A	TBS	14 і 35	s.c.	n.a.	13, 34, 48 і 53	49
	5	B					13, 34 і 48&	-
2	5	C	RSV	14 і 35	i.n.	10^6 БУО	13, 34, 48 і 53	49
	5	D					13, 34 і 48&	-
3	5	E	MVA-mBN199B	14 і 35	s.c.	1×10^8 TCID ₅₀	13, 34, 48 і 53	49
	5	F					13, 34 і 48&	-
4	5	G	MVA-mBN199B	14 і 35	i.n.	1×10^8 TCID ₅₀	13, 34, 48 і 53	49
	5	H					13, 34 і 48&	-
5	5	J	MVA-mBN199B	0, 21 і 35	s.c.	1×10^8 TCID ₅₀	-1, 20 34, 48 і 53	49
	5	K					-1, 20 34 і 48&	-
6	5	L	MVA-mBN201B	14 і 35	s.c.	1×10^8 TCID ₅₀	13, 34, 48 і 53	49
	5	M					13, 34 і 48&	-
7	5	N	MVA-mBN201B	14 і 35	i.n.	1×10^8 TCID ₅₀	13, 34, 48 і 53	49
	5	P					13, 34 і 48&	-
8	5	Q	MVA-mBN201B	0, 21 і 35	s.c.	1×10^8 TCID ₅₀	-1, 20 34, 48 і 53	49
	5	R					-1, 20 34 і 48&	-
9	5	W	MVA-mBN201BΔM2	14 і 35	s.c.	1×10^8 TCID ₅₀	13, 34, 48 і 53	49

% відносно першої імунізації.

миші були заражені інтраназальним шляхом 10^6 БУО RSV A2. Через чотири дні після зараження мишам робили кровопускання і вбивали під наркозом. Відбирали зразки рідини BAL і легенів.

& в день 48, цих мишей вбивали, а селезінки аналізували за допомогою ELISPOT.

Таблиця 2

Схема дослідження прижиттєвої фази

День**	Процедури
-16	Прибуття і поміщення 85 мишей BALB/c у віварій, розподіл клітинних карток і виділення по 5 мишей на клітину
-1	Кліпування вух, включення/виключення обстеження всіх мишей
-1	Попереднє кровопускання у мишей із клітин J, K, Q і R (пункція лицьової вени справа)
0	1-е введення мишам із клітин J, K, Q і R
13	Попереднє кровопускання у всіх мишей за винятком мишей з клітин J, K, Q і R (пункція лицьової вени справа)
14	1-е введення всім мишам за винятком мишей з клітин J, K, Q і R
20	Кровопускання у мишей з клітин J, K, Q і R (пункція лицьової вени зліва)
21	2-е введення мишам з клітин J, K, Q і R
34	Кровопускання у всіх мишей (ретро-бульбарна пункція вени лівого ока)
35	2-е введення всім мишам за винятком мишей з клітин J, K, Q і R 3-е введення мишам з клітин J, K, Q і R
48	Кровопускання у всіх мишей (ретро-бульбарна пункція вени правого ока) остаточне кровопускання для клітин B, D, F, H, K, M, P і R
48	Селезінки мишей із клітин B, D, F, H, K, M, P і R будуть видалені для аналізу ELISPOT
49	Зараження всіх мишей, що залишилися
з 49 по 53	Щоденна оцінка зовнішнього вигляду і маси тіла
53	Остаточне кровопускання, убивання та взяття зразків BAL & легенів у мишей, що залишилися

** Відносно дня першої імунізації.

Матеріали і методи

Експериментальні тварини. Вісімдесят п'ять самок мишей BALB/cJ Rj (H-2d) у віці семи тижнів були отримані від Janvier (Route des Chenes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, France). У всіх мишей не було специфічних патогенів.

Утримання тварин. Дослідження проводили у кімнаті 117 віварію у баварському Nordic-Martinsreid. Цей блок забезпечувався фільтрованим повітрям при температурі 20-24 °C і відносній вологості від 40 % до 70 %. Кімнату штучно освітлювали, чергуючи 14 годин світла і 10 годин темряви. Дослідження періоду акліматизації склало 15 днів. Тварин утримували в прозорих клітках SealSafe™ (H Temp [polysulfon] cage Type II L – Euro standard) площею 530 см². Клітки закривали кришкою H-Temp SealSafe™. Клітки поміщали у систему TECNIPLAST-IVC SealSafe™ із циркуляційним блоком SLIMLine™, забезпечуючи кожну клітку окремо HEPA-фільтром для повітря. Підстилку для тварин міняли раз на тиждень.

Дієта і випоювання. Миші були забезпечені вільним доступом до опроміненої підтримуючої дієти (SSNIFF R/M-H, опромінені, V1534-727) і води (автоклавованої при 121 °C протягом 20 хвилин).

Процедури попередньої обробки: Ідентифікація тварин. Для того, щоб індивідуально помітити тварин у кожній клітці, проставляння клейма на вуха проводили згідно стандартних процедур.

Дослідження за методом включення/виключення. Дослідження по методу включення/виключення проводили згідно стандартних процедур.

Узяття проб крові для попереднього кровопускання. Зразки крові близько по 150 мкл були одержані пункцією лицьової вени відповідно до стандартних процедур. Зразки крові переносили в лабораторію для подальшої обробки відповідно до стандартних процедур.

Процедури обробки: Одержання і введення досліджуваних препаратів 1-3 і препарату порівняння. Одержання і введення досліджуваних препаратів і препарату порівняння проводили в кабінеті класу II мікробіологічної безпеки (HERAsafe®/class II type H, Kendro) згідно стандартних процедур. Коротко, для підшкірного введення рекомбінантні MVA розбавляли у TBS для одержання робочого розчину з концентрацією 2×10^8 TCID₅₀/мл. 1×10^8 TCID₅₀ у 500 мкл ін'єктували підшкірно згідно стандартних процедур. Для інтраназального введення рекомбінантні MVA розбавляли у TBS для одержання робочого розчину з концентрацією 2×10^9 TCID₅₀/мл. По 50 мкл розбавлених вірусів вводили в одну ніздрю анестезованих (ксилазином/кетаміном) тварин згідно стандартних процедур. По 500 мкл TBS вводили підшкірно згідно стандартних процедур.

Одержання і введення досліджуваного препарату 4/вірус зараження. Флакон із RSV відтавали і використовували настільки швидко, наскільки це можливо через вірусну нестабільність (максимально 15 хвилин на льоду). Вірус тримали на льоду весь час і використовували одразу для зараження анестезованих (ксилазином/кетаміном) тварин 100 мкл розчину нерозведеного вірусу інтраназальним шляхом згідно стандартних процедур.

Пост-процедурні обробки:

Маса тіла. Масу тіла контролювали щодня, починаючи з дня зараження і до вбивання згідно стандартних процедур.

Забір крові. Зразки крові (близько по 150 мкл) одержували шляхом ретро-бульбарної пункції або пункції лицьової вени (Для одержання додаткової інформації див. Таблицю 1 і Таблицю 2) згідно стандартних процедур. Зразки крові переносили в лабораторію для подальшої обробки відповідно до стандартних процедур.

Евтаназія. Евтаназію половини мишей проводили у день 48 шляхом зсуву шийних хребців. У день 53, миші, що залишилися, одержували подвійну дозу кетаміна-ксилазіна шляхом внутрішньочеревної ін'єкції, а евтаназію здійснювали шляхом перерізання аорти в черевній порожнині.

Видалення селезінок. Селезінки видаляли асептично. Їх поміщали у пробірки, наповнені середовищем згідно стандартних процедур. Ці пробірки вносили до віварію, а потім виносили згідно стандартних процедур.

Промивання легенів і видалення легенів. Рідину BAL збирали шляхом промивання легенів 4 рази 1 мл PBS. Потім легені видаляли і миттєво заморожували у вигляді двох половинок у рідкому азоті для подальшого аналізу бляшок і екстракції РНК.

Аналіз: Обробка зразків крові і зберігання сироваток. Після доставки у лабораторію зразки крові були оброблені у сироватку згідно стандартних процедур. Після одержання сироватку зберігали при -20°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), доки не знадобиться для аналізу.

Аналіз титрів RSV-специфічних антитіл із сироваткових зразків. Загальні титри ELISA RSV-специфічного IgG визначали у всіх сироваткових зразках, використовуючи модифікований набір ELISA (Serion ELISA classic, Каталог № ESR113G): Замість кон'югованого лужною фосфатазою антитіла до людського IgG, яке входить у набір, кон'юговане лужною фосфатазою козине антитіло до мишачого IgG (Serotec cat: 103004) використовували як вторинне антитіло.

Титри ELISA RSV-F/G-специфічного IgG визначали у всіх сироваткових зразках і рідині BAL, використовуючи модифікований набір ELISA (IBL-Hamburg Ref. RE56881). Замість POD-кон'югованого антитіла до людського IgG, яке входить у набір, HRP-кон'юговане овече антитіло до мишачого IgG (ref. BN-687-95/96, Serotec cat: AAC10P) використовували як вторинне антитіло.

За винятком груп 4 і 7, титри ELISA RSV-F-специфічного IgG визначали у сироваткових зразках на 48-й день, використовуючи модифікований набір ELISA (IBL-Hamburg Ref. Реагенти RE56881 і микротитраційні смужки RSV (F-білок) IgG Ref. RE56692). Замість POD-кон'югованого антитіла до людського IgG, що входить у набір, HRP-кон'юговане овече антитіло до мишачого IgG (ref. BN-687-95/96 Serotec cat: AAC10P) використовували як вторинне антитіло.

Титри ELISA RSV-специфічного IgA у сироватці і рідині BAL визначали у зразках з 48го дня по 53й день, відповідно, використовуючи модифікований набір ELISA (IBL-Hamburg Ref. RE56881): Замість POD-кон'югованого антитіла до людського IgG, що входить в набір, HRP-кон'юговане овече антитіло до мишачого IGA (ref. BN-687-95/96 Serotec cat: STAR137P) використовували як вторинне антитіло.

Аналіз RSV-специфічних клітинних імунних реакцій спленоцитів. RSV F-, RSV G- and RSV M2-специфічні клітинні реакції визначали через два тижні після останньої імунізації шляхом

повторного стимулювання спленоцитів специфічними пептидами, як описано в іншому документі (див., наприклад, S.M. Varga et al. (2000); S. Johnstone et al. (2004); S. Jiang et al., (2002); і A.B. Kulkarni et al., J. Virol. 67(7):4086-4092 (1993)) і виявляли вивільнення IFN γ із спленоцитів за допомогою аналізу ELISPOT.

Метод аналізу ELISPOT. Для аналізу ELISPOT використовували набір мишачого IFN-гамма (BD Biosciences, Catalog № 551083). Цей аналіз проводили згідно інструкціям виробника. Коротко, планшети покривали іммобілізованим антитілом за день до ізолювання спленоцитів. Після ізолювання клітини переносили у планшети ELISPOT і стимулювали різними пептидами (див. Таблицю 3) протягом 20 годин при 37 °C. Продукування IFN γ виявляли, використовуючи детекторне антитіло. Планшети проявляли, використовуючи BD™ ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences, Catalog № 551951) згідно інструкціям виробника.

ELISPOT план стимулювання. Всі умови були випробувані в двох повтореннях. Пептиди RSV-1, RSV-2, RSV-3, RSV-4 і RSV-5 (див. Таблицю 3) використовували у кінцевій концентрації 5 мкг/мл (1 мкг/лунку) для стимулювання 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ спленоцитів на лунку. MVA (контроль імунізації) використовували при множинному зараженні (MOI) з 10 для стимуляції 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ спленоцитів на лунку і конкавалін А (ConA [позитивний контроль]) використовували у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл для стимуляції $2,5 \times 10^5$ спленоцитів. Як негативний контроль, 5×10^5 спленоцитів культивували лише в середовищі (RPMI-1640, збагаченим Glutamax, пеніциліном, стрептоміцином, 10 % фетальної телячої сироватки і 10^5 M β -меркаптоетанола).

Таблиця 3

RSV-специфічна стимуляція

Назва пептиду	Специфічність	Пептидна послідовність
RSV-1	F	TYMLTNSELL (SEQ ID NO:19)
RSV-2	F	KYKNAVTEL (SEQ ID NO:20)
RSV-3	F	ELQLLMQSTPAANNR (SEQ ID NO:21)
RSV-4	G	WAICKRIPNKKPG (SEQ ID NO:22)
RSV-5	M2	SYIGSINNI (SEQ ID NO:27)

Аналіз рідини BAL із легенів. Клітинну характеристику BAL не вдалося здійснити через проблеми фарбування. Навантаження RSV у зразках легенів визначали за допомогою методу бляшок RSV і RT-qPCR.

Метод бляшок RSV. Одну половину кожної з миттєво заморожених легенів гомогенізували в 1 мл холодного середовища із застосуванням французького преса (Середовище Голка, модифікована за способом Дульбекко, збагачена 7 % фетальної телячої сироватки). Після короткого центрифугування по дві пробірки кожного супернатанту титрували в двократних серійних розведеннях для вирощування моношарів клітин Веро в 48-лункових плоскодонних планшетах. Через шість днів моношари промивали і фіксували 1 % формальдегідом. Через 24 години моношари забарвлювали 0,04 % нейтральним червоним і підраховували бляшки.

RSV RT-qPCR. Негайно видаляли по 100 мкл гомогенізованої тканини легенів і виділяли РНК, використовуючи мінінабір RNeasy® від Qiagen (Каталог № 74104). Реакцію зворотної транскрипції проводили, використовуючи великоємносний набір РНК-к-кДНК від Applied Biosystems (Catalog № 4387406). PCR, специфічну до гена L RSV, проводили в термоциклері з наступними параметрами: (1) 50 °C протягом 2 хвилин; (2) 95 °C протягом 10 хвилин; (3) 45 циклів (15 секунд при 95 °C, 1 хвилина при 60 °C), використовуючи універсальний Master Mix для PCR від Applied Biosystems (Catalog № 4352042) і суміші трьох праймерів: (1) праймер 1 (5'-GAA CTC AGT GTA GGT AGA ATG TTT GCA-3'; SEQ ID NO: 36); (2) праймер 2 (5'-TTC AGC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T-3'; SEQ ID NO: 37); і (3) зонд 6 (5'-TTT GAA CCT GTC TGA ACA TTC CCG GTT-3'; (SEQ ID NO: 38). Число копій визначали за калібрувальною кривою плазмідного вектора pMISC202, що містить фрагмент гена L RSV. Подібні реакції для мишачого бета-актина використовували як внутрішні контролю для введення кДНК, використовуючи VIC/MGB-мічений зонд від Applied Biosystems (Catalog № 4351315).

Документування дослідження. Блок-схему прижиттєвої фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів прижиттєвої фази. Крім того, інформацію, специфічну відносно мишей або клітки, записували на клітковій картці. Кліткові картки не розглядаються як вихідні дані дослідження, але є вимогою уряду Верхньої Баварії.

Блок-схему аналітичної фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів аналітичної фази. Аналізи документували в спеціальних тестових записах або лабораторних

журналах; перехресні посилання документували в блок-схемі аналітичної фази. Всю аналітичну документацію, включаючи вихідні дані, передивлялися згідно стандартних процедур. Крім того, технічні паспорти для зразків сироватки готували згідно стандартних процедур.

Обробка даних. Необроблені дані переносили у відповідні Excel-файли для подальшого аналізу згідно стандартних процедур.

ELISA. Середні значення OD і стандартні помилки середнього розраховували за допомогою Excel.

ELISPOT. Планшети ELISPOT зчитували CTL-рідером згідно інструкцій виробника. Кількість прямоутворюючих клітин (SFC) визначали у кожній лунці і заносили в Excel-файл для подальшої оцінки. З інкубації з 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ клітин на лунку, кількість плям на 1×10^6 спленоцитів підраховували в кожній лунці. Розраховували середнє для негативного контролю і віднімали з кожного значення до обчислення середнього значення на мишу для одержання значення індексу стимуляції (SI) (частота пептид-специфічних спленоцитів миші, виділяючих IFN- γ) із розрахунку на мишу.

Для пептидної стимуляції, SI одержували з лунок з 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ клітин, крім випадків, коли плям було надто багато, щоб підрахувати, або для RSV-імунізованих тварин. У цих випадках використовували лише концентрацію $2,5 \times 10^5$. Для MVA-BN стимуляції, SI одержували з лунок з 5×10^5 клітинами, крім випадків, коли плям було надто багато, щоб підрахувати. У такому разі використовували концентрацію $2,5 \times 10^5$. Після визначення SI для окремих тварин, середнє SI (SFC на 1×10^6 спленоцитів) і стандартну помилку середнього (SEM) розраховували для кожної групи.

Зміни маси тіла. Індивідуальні значення маси тіла (у грамах) перед зараженням RSV були прийняті як базові значення. З цими базовими значеннями зміни ваги тіла окремих тварин (у %), а також зміни середньої маси тіла в групах розраховували для кожної контрольованої часової точки після зараження із застосуванням Microsoft Excel.

Метод бляшок RSV. Кількість бляшок підраховували в лунці з трьома найвищими обчислюваними розведеннями вірусу. Середню кількість бляшок, регульована фактором розведення, потім множили на 10, щоб одержати титр розчину в БУО/мл і, нарешті, множили на 2, щоб одержати титр на кожну легеню.

RSV RT-qPCR. PCR-ампліфікації вимірювали в режимі реального часу, використовуючи ABI 7500 від Applied Biosystems (Catalog № 4351107) і аналізували, використовуючи системне програмне забезпечення, що поставляється Applied Biosystems. Усі значення порівнювали з L-генним стандартом і нормували до визначення мишачого бета-актина для кожного зразка.

Результати

Аналіз гуморальної імунної відповіді: Аналіз відповіді RSV-специфічного антитіла IgG із сироваткових зразків. Сироватку спочатку аналізували за допомогою ELISA, виходячи з набору IBL-Hamburg, використовуючи планшети, вкриті лише білками F і G рекомбінантного RSV (Фігура 2 та Фігура 3). Як показано на Фігурі 2, подібні RSV-специфічні IgG відповіді (OD у діапазоні від 0,870 до 1,347) спостерігалися зі всіма трьома конструктами (MVA-mBN199B, MVA-mBN201B Δ M2 та MVA-mBN201B) після одиначної імунізації і не залежали від шляху введення, використаного для імунізації (підшкірно або інтраназально). Тоді як друга імунізація призвела до майже 2,0-3,5-кратного підвищення реакції антитіл (OD у діапазоні від 2,627 до 3,407), третя підшкірна ін'єкція мала лише незначний вплив на реакцію В-клітин, викликаючи збільшення близько 0,500 одиниць OD у порівнянні з OD після другої імунізації. Подібні результати були одержані за допомогою ELISA, виходячи з набору IBL Hamburg із застосуванням планшетів, вкритих лише білком F рекомбінантного RSV (Фігура 4).

Після серійного розведення сироватки (1/100, 1/200 і 1/400) RSV F- і RSV G-специфічні результати ELISA показали, що MVA-mBN199B, MVA-mBN201B Δ M2 і MVA-mBN201B викликали подібні RSV F- і RSV G-специфічні IgG відповіді, не дивлячись на додаткову експресію усиченого білка F RSV і усиченого білка G RSV конструктами MVA-mBN201B Δ M2 і MVA-mBN201B (Фігура 3). Після двох підшкірних імунізацій конструктами відповідь В-клітин усе ще була нижча у порівнянні з імунізацією лише RSV (позитивний контроль). Для досягнення рівня імунної відповіді, викликаній двома інтраназальними введеннями RSV, була потрібна третя підшкірна імунізація конструктами MVA-mBN. На відміну від цього, 2 інтраназальні імунізації MVA-mBN199B і MVA-mBN201B викликали подібні В-клітинні реакції, як і дві імунізації лише RSV або 3 підшкірні імунізації MVA-mBN199B, MVA-mBN201B Δ M2 і MVA-mBN201B, коли аналізували ELISA, виходячи з набору IBL Hamburg (Фігура 3).

Коли сироватку знову аналізували за допомогою ELISA на основі набору Serion, використовуючи планшети, вкриті лізатом RSV, не було виявлено відмінностей між MVA-mBN199B, MVA-mBN201B Δ M2 і MVA-mBN201B. Не спостерігалось відмінностей між 2 і 3

імунізаціями або між підшкірним і інтраназальним шляхами введення. Крім того, відповіді були нижчі, ніж реакції на антитіла, що індукуються 2 інтраназальними введеннями RSV (Фігура 5).

Аналіз відповідей RSV-специфічних антитіл IgA. RSV F- і RSV G-специфічний IgA (виходячи з набору IBL Hamburg) вимірювали в рідині BAL через 4 дні після зараження (на 53-й день). Крім того, також за допомогою ELISA аналізували BAL і сироватку RSV F- і RSV G-специфічного IgG. Результати порівняли з результатами, одержаними в сироватці прямо перед зараженням (на 48-й день), і показали на Фігурі 6.

Як і очікувалося, реакції IgA були виявлені лише після інтраназального введення RSV, MVA-mBN199B і MVA-mBN201B. Хоча IgG також може бути виявлений у BAL, IgA був виявлений при вищому рівні після інтраназального введення. Рівні IgA в сироватці були значно нижчі, ніж рівні IgG незалежно від шляху введення.

Аналіз RSV-специфічних клітинних імунних відповідей. Т-клітинні відповіді аналізували в селезінці за допомогою ELISPOT за два тижні після останньої імунізації (Фігура 7). MVA-mBN199B, введений інтраназальним або підшкірним шляхом, викликав сильну RSV-F специфічну Т-клітинну відповідь. Імунна реакція, головним чином, була направлена проти RSV-F-специфічного пептиду RSV-2, який є імунодомінантним за відсутності RSV-M2. Відповідь складала близько 2000 плям на 10^6 спленоцитів після 2-ої підшкірної імунізації і близько 4000 після 3-ї підшкірної ін'єкції або 2-го інтраназального застосування. Подібно до відповіді на інтраназальні введення RSV була виявлена низька G-специфічна відповідь на пептид RSV-4 після імунізації MVA-mBN199B (близько 500 плям на 10^6 спленоцитів) і, як і очікувалося, MVA-mBN199B не індукував M2-специфічні Т-клітини. Пептид M2 є імунодомінантним пептидом RSV у мишей. Отже, інтраназальні імунізації RSV індукували хорошу M2-специфічну Т-клітинну відповідь більше 1000 плям на 10^6 спленоцитів, і майже не було F-специфічної Т-клітинної відповіді.

Як і MVA-mBN199B, MVA-mBN201B викликав сильну Т-клітинну відповідь, але у ньому домінував M2 (більше 4000 плям на 10^6 спленоцитів незалежно від кількості введених доз і шляху введення). Навіть G-специфічна відповідь, викликана MVA-mBN201B, була принаймні в 3 рази вища, ніж G-специфічна відповідь, викликана MVA-mBN199B або RSV. На відміну від MVA-mBN199B, F-специфічна відповідь, викликана MVA-mBN201B, була дуже низькою, менше ніж 600 плям на 10^6 спленоцитів для пептиду RSV-2.

RSV-зараження штамом A2 RSV. Мишей заражали інтраназально 10^6 БУО RSV(A2) після двох тижнів після останньої імунізації. Масу тіла перевіряли щодня. Через чотири дні після імунізації мишей убивали. Після промивання легенів 1 мл PBS легені видаляли, а навантаження RSV у легенях визначали методом бляшок і RT-qPCR, проведеним як описано вище.

Зміни маси тіла. Усі миші втрачали масу через день після імунізації, найімовірніше через анестезію або саме інтраназальне зараження (Фігура 8). TBS-оброблені миші починали істотно втрачати масу через 4 дні після зараження RSV. На відміну від цього, миші, які одержали RSV інтраназально протягом трьох імунізацій, не демонстрували втрату маси. Всі миші, підшкірно імунізовані MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2, втратили близько 20 % маси через 4 дні після імунізації. Така втрата маси була описана раніше Olszewska et al. (Vaccine 23:215 (2004)). Проте наші RT-qPCR результати (Фігура 10) показують, що вона корелює з кращим захистом і ранішим виведенням RSV із легенів через викликану вакциною відповіді CTL у порівнянні з нормальним кліренсом первинної інфекції RSV. При інтраназальному застосуванні імунізовані MVA-mBN201B миші мали схожу втрату маси, що і підшкірно імунізовані миші через 2 дні після зараження, але відновлювалися на 4-й день після зараження через низьке навантаження RSV у легенях у порівнянні із підшкірним шляхом (Фігура 10). Подібно до RSV-імунізованої групи, миші, імунізовані інтраназально MVA-mBN199B, не втрачали масу.

Навантаження RSV, виміряне за допомогою методу бляшок. Через чотири дні після імунізації було визначено в середньому 57671 БУО на легеню для неімунізованих мишей (Фігура 9). Як і в RSV-імунізованої контрольній групі, у легенях тварин, імунізованих MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN201BΔM2, не виявили бляшки A2 RSV після 2 підшкірних або інтраназальних введень.

Навантаження RSV, виміряне за допомогою RT-qPCR. Навантаження RSV у легенях також аналізували за допомогою RT-qPCR (Фігура 10). Не дивлячись на те, що у однієї вакцинованої миші за допомогою методу бляшок не був виявлений RSV, геноми RSV усе ще виявлялися у мишей, тричі імунізованих MVA-mBN199B. Після трьох імунізацій MVA-mBN199B, навантаження RSV було у 38 разів нижче у порівнянні з контрольною групою TBS. Геноми RSV також виявлялися після трьох імунізацій MVA-mBN201B, але навантаження було у 158 разів нижче у порівнянні з контрольною групою TBS. Не було істотних відмінностей між мишами,

імунізованими двічі або тричі. Примітно, що зниження навантаження RSV, що спостерігається з MVA-mBN201B, не спостерігалася після вакцинації MVA-mBN201BΔM2, яка була у відсутність M2, еквівалентного MVA-mBN199B.

Майже повний захист, порівнянний із тим, що одержаний у групі, обробленою RSV, спостерігався після інтраназальної імунізації MVA-mBN201B, хоча п'ять копій гена L усе ще виявлялися у одній миші з п'яти. Інтраназальна імунізація MVA-mBN199B також викликала сильне зниження навантаження RSV, але ген L усе ще виявлявся при низьких рівнях у трьох мишей з п'яти.

Обговорення і висновки

Хоча MVA-mBN201B експресує усічені версії білків F і G RSV на додаток до непроцесованих білкам F і G RSV, також включеним у конструкт MVA-mBN199B, MVA-mBN201B індукував гуморальну імунну відповідь із подібною амплітудою. Обидва конструкта викликали відповідь антитіл, направлену, головним чином, проти білка F RSV, якщо судити за аналогічними хорошими відповідями, вимірними лише в F RSV ELISA у порівнянні з F і G RSV ELISA Рівень антитіл після двох інтраназальних застосувань був вищим, ніж після двох підшкірних введень. Третє підшкірне введення було потрібне для досягнення рівня відповідей антитіл, викликаних двома інтраназальними застосуваннями. На відміну від цього, жодних серйозних відмінностей не спостерігалися в Т-клітинних відповідях, що індукуються за допомогою підшкірного введення у порівнянні з інтраназальними дорогами введення або при використанні двох у порівнянні з трьома підшкірними застосуваннями. Проте, MVA-mBN199B індукував хорошу RSV F-специфічну клітинну відповідь, тоді як на MVA-mBN201B спостерігалася сильна M2-специфічна Т-клітинна відповідь RSV G-специфічна відповідь, викликана MVA-mBN201B, була також явнішою у порівнянні з MVA-mBN199B. Характер реакції Т-клітин, індукованої MVA-mBN201B, був схожий на Т-клітинну відповідь, викликану імунізацією RSV, хоча і набагато вище.

Незалежно від шляхів і кількості введень обидва конструкта захищали мишей від зараження RSV(A2), і жоден вірус, що реплікується, не міг бути культивованим із легенів. Проте, як спостерігалось раніше, підшкірні імунізації MVA-mBN199B або MVA-mBN201B не призводили до стерильного імунітету (тобто, імунітету, який зберігається навіть після виведення цільового інфекційного агента з організму). Навантаження генома RSV (вимірюють рівні вірусної РНК-полімерази гена L) у легенях мишей, імунізованих підшкірним введенням будь-якого з MVA-mBN199B або MVA-mBN201B, було значно знижене, але все ще виявлялося за допомогою кількісної RT-PCR, а третя підшкірна імунізація не мала благотворного впливу на вірусне навантаження, не дивлячись на її збільшення при рівнях RSV-специфічного IgG. Зниження експресії білка L RSV було трохи більше вираженням після вакцинації MVA-mBN201B у порівнянні з MVA-mBN199B, що може бути пов'язане із підвищенням M2-специфічного CD8+ Т-клітинної відповіді, як і геномне навантаження RSV було вище у тварин, вакцинованих MVA-mBN201BΔM2, ніж у тварин, вакцинованих MVA-mBN201B, подібно MVA-mBN199B.

Стерильний імунітет майже був одержаний після двох інтраназальних введень будь-якого з MVA-mBN199B або MVA-mBN201B. Це спостереження корелює з індукцією і секрецією RSV-специфічних IgA у ділянках слизової інфекції.

Приклад 3: Безпека вакцин рекомбінантних MVA, що експресують білок F RSV, білок G RSV, білок N RSV і білок M2 RSV, у порівнянні з FI-RSV.

Вакцинний кандидат MVA-mBN199B кодує глікопротеїн (G) і білок злиття (F) RSV, тоді як MVA-mBN201B експресує усічені версії F і G на додаток до непроцесованих білкам, нуклеокапсидний білок (N) і матриксний білок (M2) RSV (дивись Фігуру 1). Мета цих експериментів полягала в аналізі безпеки будь-якого з MVA-mBN199B і MVA-mBN201B у порівнянні з FI-RSV після двох імунізацій за допомогою підшкірних (s.c.) або інтраназальних (i.n.) шляхів введення.

Безпека цих конструктів була перевірена за допомогою моделі зараження RSV (A2) у лінії мишей BALB/c. дві імунізації MVA-mBN199B або MVA-mBN201B не індукували підвищеної секреції IL-4 і IL5 у BAL після зараження RSV (A2) у порівнянні з FI-RSV.

План дослідження

Мишей заражали двічі на три тижні підшкірно (s.c.) або інтраназально (i.n.) 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN199B (групи 3 і 4), 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN201B (групи 5 і 6) згідно Таблиці х. Три контрольні групи заражали (s.c.) двічі TBS (група 1) або інтраназально RSV (група 2), або внутрішньом'язово 30 мкг FI-RSV (група 7), згідно Таблиці х. На 35-й день мишей заражали (i.n.) 10^6 БУО RSV A2. Через чотири дні після імунізації, мишей убивали ін'єкцією підвищеної дози кетаміна-ксилазіна і знекровлювали. Після промивання легенів аналізували рівні IL4 і IL5 у BAL за допомогою ELISA.

Таблиця 4

План дослідження

Група	Чисельність у групи	Введення досліджуваних і контрольних зразків				Зараження (день)%, #
		Ін'єкції	Схема (день)%	Шлях	Доза на ін'єкцію	
1	5	TBS	0 і 21	s.c.	n.a.	35
2	5	RSV		i.n.	10 ⁶ БУО	
3	5	MVA- mBN199B		s.c.	1×10 ⁸ TCID ₅₀	
4	5			i.n.	1×10 ⁸ TCID ₅₀	
5	5	MVA- mBN201B		s.c.	1×10 ⁸ TCID ₅₀	
6	5			i.n.	1×10 ⁸ TCID ₅₀	
7	5	FI-RSV		i.m.	30 мкг	

% відносно першої імунізації.

мишей заразили інтраназальним шляхом 10⁶ БУО RSV A2. Через чотири дні після зараження мишей знекровлювали і вбивали під анестезією. Рідину BAL збирали для зразків.

Схема дослідження. Схема прижиттєвої фази наведена в Таблиці.

Таблиця 5

Схема дослідження прижиттєвої фази

День**	Процедури
-9	Прибуття і розміщення мишей BALB/c у віварій, розподіл клітинних карток і виділення по 5 мишей на клітину
-1	кліпування вух, дослідження за методом включення/виключення всіх мишей
0	1-е введення мишам
21	2-е введення мишам
35	зараження RSV(A2)
39	остаточне кровопускання, вбивання і взяття зразків BAL

** Відносно дня першої імунізації.

5 Матеріали і методи

Експериментальні тварини. Самки мишей BALB/cJ Rj (H-2d) у віці семи тижнів були одержані від Janvier (Route des Chenes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, France). У всіх мишей не було специфічних патогенів.

- Вміст тварин. Дослідження проводили в кімнаті 117 віварію у баварському Nordic-Martinsreid. Цей блок забезпечувався фільтрованим повітрям при температурі 20-24 °C і відносній вологості від 40 % до 70 %. Кімнату штучно освітлювали, чергуючи 14 годин світла і 10 годин темряви. Дослідження періоду акліматизації склало 15 днів. Тварин містили в прозорих клітинах SealSafe™ (H Temp [polysulfon] cage Type II L – Euro standard), площею 530 см². Клітки закривали кришкою H-Temp SealSafe™. Клітки поміщали в систему TECNIPLAST-IVC SealSafe™ із циркуляційним блоком SLIMLine™, забезпечуючи кожну клітину окремо HEPA-фільтром для повітря. Підстилку для тварин міняли раз на тиждень.

Дієта і випаювання. Миші були забезпечені вільним доступом до опроміненої підтримуючої дієти (SSNIFF R/M-H, опромінені, V1534-727), і води (автоклавованої при 121 °C протягом 20 хвилин).

Процедури попередньої обробки: Ідентифікація тварин. Для того, щоб індивідуально помітити тварин у кожній клітині, проставляння клейма на вуха проводили згідно стандартних процедур.

Дослідження за методом включення/виключення. Дослідження за методом включення/виключення проводили згідно стандартних процедур.

Узяття проб крові для попереднього кровопускання. Зразки крові близько по 150 мкл були одержані пункцією лицьової вени відповідно до стандартних процедур. Зразки крові переносили в лабораторію для подальшої обробки відповідно до стандартних процедур.

Процедури обробки: Одержання і введення досліджуваних препаратів і препарату порівняння. Одержання і введення досліджуваних препаратів і препарату порівняння проводили у кабінеті класу II мікробіологічної безпеки (HERAsafe®/class II type H, Kendro) згідно стандартних процедур. Коротко, для підшкірного введення рекомбінантні MVA розбавляли у TBS для одержання робочого розчину з концентрацією 2×10^8 TCID₅₀/мл. 1×10^8 TCID₅₀ у 500 мкл ін'єктували підшкірно згідно стандартних процедур. Для інтраназального введення, рекомбінантні MVA розбавляли у TBS для одержання робочого розчину з концентрацією 2×10^9 TCID₅₀/мл. По 50 мкл розбавлених вірусів вводили в одну ніздрю анестезованих (ксилазином/кетаміном) тварин згідно стандартних процедур. По 500 мкл TBS вводили підшкірно згідно стандартних процедур.

Одержання і введення вірусу RSV(A2). Флакон із RSV відтавали і використовували настільки швидко, наскільки це можливо, через вірусної нестабільності (максимально 15 хвилин на льоду). Вірус тримали на льоду весь час і використовували одразу для зараження анестезованих (ксилазином/кетаміном) тварин 100 мкл розчину нерозведеного вірусу інтраназальним шляхом згідно стандартних процедур.

Одержання і введення FI-RSV. 30 мкг FI-RSV у 40 мкл ін'єктували внутрішньом'язово.

Евтаназія. На 35-й день миші, що залишилися, одержували подвійну дозу кетаміна-ксилазина шляхом внутрішньочеревної ін'єкції, а евтаназію здійснювали шляхом перерізання аорти у черевній порожнині.

Легеневий лаваж. Рідину BAL збирали шляхом промивання легенів 4 рази 1 мл PBS.

Аналіз

Рівні IL-4 і IL-5 вимірювали у супернатанті BAL, використовуючи комерційно доступні набори ELISA (mIL4 PLATINUM ELISA від eBioscience Cat N° BMS613 і READY-SET-GO MIL-5 ELISA від eBioscience Cat N° 88-7054-22).

Документування дослідження. Блок-схему прижиттєвої фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів прижиттєвої фази. Крім того, інформацію, специфічну відносно мишей або клітки, записували на клітковій картці. Клітинні картки не розглядаються як первинні дані дослідження, але є вимогою уряду Верхньої Баварії.

Блок-схему аналітичної фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів аналітичної фази. Аналізи документували у спеціальних тестових записах або лабораторних журналах; перехресні посилання документували у блок-схемі аналітичної фази. Всю аналітичну документацію, у тому числі вихідні дані, переглядали згідно стандартних процедур. Крім того, технічні паспорти для зразків сироватки готували згідно стандартних процедур.

Обробка даних. Необроблені дані переносили у відповідні Excel-файли для подальшого аналізу згідно стандартних процедур.

ELISA. Концентрації цитокінів визначали по калібрувальній кривій відповідного набору ELISA.

Результати

Збільшення вироблення IL-4 (Фігура 11) і IL-5 (Фігура 12), подібне тому, що спостерігається з FI-RSV, не спостерігалось для MVA-mBN199B або MVA-mBN201B. Обидва цитокіни були нижчими за рівень виявлення, коли мишей імунізували інтраназально MVA-mBN199B або MVA-mBN201B.

Обговорення і висновки

І MVA-mBN199B, і MVA-mBN201B не індукують посилене захворювання у порівнянні з FI-RSV за оцінкою відповіді TH2.

Приклад 4: Порівняння ефективності імуногенності і безпеки різних вакцин рекомбінантних MVA, що експресують білок F RSV, білок G RSV, білок N RSV і білок M2 RSV.

Вакцинний кандидат MVA-mBN199B кодує глікопротеїн (G) і білок злиття (F) RSV, тоді як MVA-mBN201B експресує усічені версії F і G на додаток до непроцесованим білкам,

нуклеокапсидний білок (N) і матриксний білок (M2) RSV, а MVA-mBN294B експресує один F і 2 G непроцесованих білка, нуклеокапсидний білок (N) і матриксний білок (M2) RSV (див. Фігуру 1). MVA-mBN294A є проміжним продуктом при клонуванні MVA-mBN294B, який усе ще має одну касету клонування. Ця касета клонування не впливає на експресію трансгена або імуногенні властивості трансгенних білків. Мета даного експерименту полягала в аналізі імуногенності, ефективності і безпеці MVA-mBN294A у порівнянні з MVA-mBN199B і MVA-mBN201B після двох імунізацій підшкірним (s.c.) шляхом введення.

Ефективність імуногенності і безпеки цих конструктів перевіряли, використовуючи модель зараження RSV(A2) у мишей BALB/c. Ми підтвердили, що, не дивлячись на зміни в MVA-mBN294A (еквівалентний MVA-mBN294B) у порівнянні з MVA-mBN201B, він індукує подібні B- і T-клітинні відповіді і надає аналогічний захист. Цей експеримент показав, що конструкти (MVA-mBN201B або MVA-mBN294A), що експресують принаймні одну антигенну детермінанту мембранного глікопротеїну RSV (F і G) і принаймні одну антигенну детермінанту нуклеокапсидного білка RSV (N або M2), індукують кращий захист, ніж конструкт, що експресує лише антигенні детермінанти мембранних глікопротеїнів RSV (MVA-mBN199B).

План дослідження

Мишей вакцинували (s.c.) 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN294A, MVA-mBN199B або MVA-mBN201B за схемою «прайм-буст» (день 0 і 21) згідно Таблиці 6. Контрольні групи обробляли двічі підшкірно TBS або RSV-A2 згідно Таблиці 6. Інактивований формаліном (FI) -RSV ін'єктували внутрішньом'язово (i.m.) один або двічі згідно Таблиці 6.

Кров збирали за добу до кожної імунізації і до зараження, а також у день убивання. Для 5 тварин з груп 1-5 на 34-й день визначали титри RSV-специфічних IgG і титри RSV-специфічних нейтралізуючих антитіл за допомогою ELISA і PRNT, відповідно.

На 34-й день, деяких мишей (Таблиця 6) убивали шляхом ін'єкції летальної дози кетаміна-ксилазіна і остаточно знекровлювали. Селезінки видаляли і готували для аналізу RSV-специфічних відповідей Т-клітин за допомогою ELISPOT.

На 35-й день мишей, що залишилися (Таблиця 6), заражали 10^6 БУО RSV-A2 Через чотири дні після зараження мишей убивали летальною дозою кетаміна-ксилазіна і остаточно знекровлювали. Після легеневого лаважа легені видаляли, а навантаження RSV аналізували методом бляшок і RT-qPCR Аналізували клітинну інфільтрацію і рівні цитокінів у рідині BAL.

Таблиця 6

План дослідження

Група	Чисельність групи	Введення досліджуваних і контрольних зразків				Кровопускання (день) ¹	Зараження (День) ^{1, 2}
		Ін'єкції	Схема ін'єкції (день) 1	Шлях	Доза на ін'єкцію		
1	10	TBS	0 і 21	s.c.	-	-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
2	10	RSV		i.n.	10 ⁶ БУО	-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
3	10	MVA-mBN199B		s.c.	1×10 ⁸ TCID ₅₀	-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
4	10	MVA-mBN201B				-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
5	10	MVA-mBN294A				-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
6	10	FI-RSV		i.m.	50мкл	-1, 20, 34 і 39	35
	5					-1, 20 і 34&	-
7	5	FI-RSV	0	i.m.	50мкл	-1, 20, 34 і 39	35

¹: відносно першої імунізації

²: мишей заражали інтраназальним шляхом 10^6 БУО RSV-A2. Через чотири дні після зараження мишей знекровили і вбили під анестезією, а рідину BAL і легені зібрали для зразків.

&: у день 34, цих мишей убили, а селезінки аналізували за допомогою ELISPOT.

Схема дослідження. Схема прижиттєвої фази наведена у Таблиці 7.

Таблиця 7

Схема дослідження частини I прижиттєвої фази

День ¹	Процедури
-9	Прибуття і розміщення мишей BALB/c у віварій, розподіл клітинних карток і виділення по 5 мишей на клітку
-1	кліпування вух, дослідження за методом включення/виключення всіх мишей
-1	попереднє кровопускання у всіх мишей (пункція лицьової вени справа)
0	1-е введення
20	кровопускання у всіх мишей (пункція лицьової вени зліва)
21	2-е введення
34	остаточне кровопускання, вбивання і взяття зразків селезінки для клітин B, D, F, H, K і M
34	кровопускання у мишей, що залишилися (ретро-бульбарна пункція вени правого ока)
35	зараження всіх мишей, що залишилися
35 до 39	щоденна оцінка зовнішнього вигляду і маси тіла
39	остаточне кровопускання, вбивання і взяття зразків BAL і легенів у мишей, що залишилися

¹: відносно дня 1-ої імунізації

Матеріали і методи

5 Експериментальні тварини. Самки мишей BALB/cJ Rj (H-2d) у віці семи тижнів були одержані від Janvier (Route des Chenes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, France). У всіх мишей не було специфічних патогенів.

10 Утримання тварин. Дослідження проводили в кімнаті 117 віварію у баварському Nordic-Martinsreid. Цей блок забезпечувався фільтрованим повітрям при температурі 20-24 °C і відносній вологості від 40 % до 70 %. Кімнату штучно освітлювали, чергуючи 14 годин світла і 10 годин темряви. Дослідження періоду акліматизації склало 15 днів. Тварин утримували у прозорих клітинах SealSafe™ (H Temp [polysulfon] cage Type II L – Euro standard), площею 530 см². Клітки закривали кришкою H-Temp SealSafe™. Клітки поміщали к систему TECNIPLAST-IVC SealSafe™ із циркуляційним блоком SLIMLine™, забезпечуючи кожну клітку окремо HEPA-фільтром для повітря. Підстилку для тварин міняли раз на тиждень.

15 Дієта і випоювання. Миші були забезпечені вільним доступом до опроміненої підтримуючої дієти (SSNIFF R/M-H, опромінені, V1534-727) і води (автоклашованої при 121 °C протягом 20 хвилин).

Процедури попередньої обробки:

20 Ідентифікація тварин. Для того, щоб індивідуально помітити тварин у кожній клітці, проставлення клейма на вуха проводили згідно стандартних процедур.

Дослідження за методом включення/виключення. Дослідження за методом включення/виключення проводили згідно стандартних процедур.

25 Узяття проб крові для попереднього кровопускання. Зразки крові близько по 150 мкл були одержані пункцією лицьової вени відповідно до стандартних процедур. Зразки крові переносили в лабораторію для подальшої обробки відповідно до стандартних процедур.

30 Процедури обробки: Одержання і введення досліджуваних препаратів і препарату порівняння. Одержання і введення досліджуваних препаратів і препарату порівняння проводили у кабінеті класу II мікробіологічної безпеки (HERAsafe®/class II type H, Kendro) згідно стандартних процедур. Коротко, для підшкірного введення рекомбінантні MVA розбавляли у TBS для одержання робочого розчину з концентрацією 2×10^8 TCID₅₀/мл. 1×10^8 TCID₅₀ у 500 мкл

ін'єктували підшкірно згідно стандартних процедур. По 500 мкл TBS вводили підшкірно згідно стандартних процедур.

Одержання і введення вірусу RSV(A2). Флакон із RSV відтавали і використовували настільки швидко, наскільки це можливо через вірусну нестабільність (максимально 15 хвилин на льоду). Вірус тримали на льоду весь час і використовували одразу для зараження анестезованих (ксилазином/кетаміном) тварин 100 мкл розчину нерозведеного вірусу інтраназальним шляхом згідно стандартних процедур.

Одержання і введення FI-RSV: По 50 мкл FI-RSV вводили внутрішньом'язово.

Пост-процедурні обробки:

Забір крові. Зразки крові (близько по 150 мкл) одержували шляхом ретро-бульбарної пункції або пункції лицьової вени (для подробиць див. Таблицю 7) згідно стандартних процедур. Зразки крові переносили у лабораторію для подальшої обробки відповідно до стандартних процедур.

Евтаназія. Миші одержали подвійну дозу кетаміна-ксилазина шляхом внутрішньочеревної ін'єкції, а евтаназію здійснювали шляхом перерізання аорти в черевній порожнині.

Видалення селезінки. Селезінки видаляли асептично. Їх поміщали в пробірки, наповнені середовищем згідно стандартних процедур. Ці пробірки вносили до віварію, а потім виносили згідно стандартних процедур.

Промивання легенів і видалення легенів. Рідину BAL збирали шляхом промивання легенів 4 рази 1 мл PBS. Потім легені видаляли і миттєво заморожували у вигляді двох половинок у рідкому азоті для подальшого аналізу бляшок і екстракції РНК.

Аналіз:

Обробка зразків крові і зберігання сироваток. Після доставки в лабораторію зразки крові були оброблені у сироватку згідно стандартних процедур. Після одержання сироватку зберігали при -20°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), доки не знадобиться для аналізу.

Аналіз титрів RSV-специфічних антитіл з сироваткових зразків. Загальні титри RSV-специфічного IgG ELISA визначали у всіх сироваткових зразках, використовуючи модифікований набір ELISA (Serion ELISA classic, Catalog № ESR113G). Замість кон'югованого лужною фосфатазою антитіла до людського IgG, яке входить у набір, кон'юговане лужною фосфатазою козине антитіло до мишачого IgG (Serotec cat: 103004) використовували як вторинне антитіло.

Аналіз титрів RSV-специфічних нейтралізуючих антитіл із сироваткових зразків. Коротко, готували 2-кратні серійні розведення тестованої сироватки і визначену кількість БЮ RSV додавали до сироваткового розведення. Після 185 хвилин інкубації при 36°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) і 5 % CO_2 ($\pm 1\%$) його додавали у заздалегідь засіяні чашки, що містять клітини Веро. Через два дні чашки фіксували, імунозабарвлювали сумішшю RSV-специфічних антитіл і підраховували бляшки.

Аналіз RSV-специфічних клітинних імунних реакцій спленоцитів. RSV F- і RSV M2-специфічні клітинні реакції визначали через два тижні після останньої імунізації шляхом повторного стимулювання спленоцитів специфічними пептидами, згідно стандартній методиці, і виявляли вивільнення IFN γ із спленоцитів за допомогою аналізу ELISPOT.

Метод аналізу ELISPOT. Для аналізу ELISPOT використовували Mouse IFN-Gamma-Kit (BD Biosciences, Каталог № 551083). Цей аналіз проводили згідно інструкціям виробника. Коротко, планшети вкривали антитілом імунодефіциту за день до ізолювання спленоцитів. Після ізолювання клітини переносили у планшети ELISPOT і стимулювали різними пептидами (див. Таблицю 3) протягом 20 годин при 37°C . Вироблення IFN γ виявляли, використовуючи детекторне антитіло. Планшети проявляли, використовуючи BD™ ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences, Каталог № 551951) згідно інструкціям виробника.

План стимулювання ELISPOT. Всі умови були випробувані у двох повтореннях. Пептиди RSV-2 і RSV-5 (див. Таблицю 8) використовували у кінцевій концентрації 5 мкг/мл (1 мкг/лунку) для стимулювання 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ спленоцитів на лунку. MVA (контроль імунізації) використовували при множинному зараженні (MOI) 10 для стимуляції 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ спленоцитів на лунку, а конковалін А (ConA [позитивний контроль]) використовували у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл для стимуляції $2,5 \times 10^5$ спленоцитів. Як негативний контроль 5×10^5 спленоцитів культивували лише у середовищі (RPMI-1640, збагачена Glutamax, пеніциліном, стрептоміцином, 10 % фетальною телячою сироваткою і 10^5 М β -меркаптоетанола).

RSV-специфічна стимуляція

Назва пептиду	Специфічність	Пептидна послідовність
RSV-2	F	KYKNAVTEL (SEQ ID NO: 20)
RSV-5	M2	SYIGSINNI (SEQ ID NO: 27)

Аналіз рідини BAL:

- 5 Два зразки були одержані цитоспіновим центрифугуванням (800 обертів на хвилину, 5 хвилин) 100 мкл рідини BAL. Зразки сушили протягом ночі, а потім забарвлювали. Зразки аналізували методом мікроскопії, щоб визначити відсоток еозинофілів і нейтрофілів. Потім центрифугували частину BAL, що залишилася (12000 обертів на хвилину 5 хвилин). Після підготовки, супернатанти BAL зберігали при -20°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) до аналізу. Рівні IL-4 і IL-5 вимірювали у супернатанті BAL, використовуючи комерційно доступні набори ELISA (mIL4 PLATINUM ELISA від eBioscience Cat N° BMS613 і READY-SET-GO MIL-5 ELISA від eBioscience Cat N° 88-7054-22).

Аналіз навантаження RSV у легенях

Навантаження RSV у зразках легенів визначали за допомогою методу бляшок RSV і RT-qPCR.

- 15 Метод бляшок RSV. Одну половину кожної з миттєво заморожених легенів гомогенізували у 1 мл холодного середовища із застосуванням французького преса (Середовище Голка, модифікована за способом Дульбекко, збагачена 7 % фетальної телячою сироваткою). Після короткого центрифугування по дві пробірки кожного супернатанту титрували у двократних серійних розведеннях для вирощування моношарів клітин Веро у 48-лункових плоскодонних планшетах. Через шість днів моношари промивали і фіксували 1 % формальдегідом. Через 24 години моношари забарвлювали 0,04 % нейтральним червоним і підраховували бляшки.

- 20 RSV RT-qPCR. По 100 мкл гомогенізованої тканини легенів тут же видаляли і виділяли РНК, використовуючи мінінабір RNeasy® від Qiagen (Catalog № 74104). Реакцію зворотної транскрипції проводили, використовуючи великоємносний набір РНК-к-кДНК від Applied Biosystems (Catalog № 4387406). PCR, специфічну до гена L RSV, проводили у термоциклері з наступними параметрами: (1) 50°C протягом 2 хвилин; (2) 95°C протягом 10 хвилин; (3) 45 циклів (15 секунд при 95°C , 1 хвилина при 60°C), використовуючи універсальний Master Mix для PCR від Applied Biosystems (Catalog № 4352042) і суміші трьох праймерів: (1) праймер 1 (5'-GAA CTC AGT GTA GGT AGA ATG TTT GCA-3'; SEQ ID NO: 36); (2) праймер 2 (5'-TTC AGC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T-3'; SEQ ID NO: 37); і (3) зонд 6 (5'-TTT GAA CCT GTC TGA ACA TTC CCG GTT-3'; (SEQ ID NO: 38). Число копій визначали за калібрувальною кривою плазмідного вектора pMISC202, що містить фрагмент гена L RSV. Подібні реакції для мишачого бета-актина використовували як внутрішні контролю для введення кДНК, використовуючи VIC/MGB-мічений зонд від Applied Biosystems (Catalog № 4351315).

- 35 Документування дослідження

Блок-схему прижиттєвої фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів прижиттєвої фази. Крім того, інформацію, специфічну відносно мишей або клітки, записували на клітковій картці. Кліткові картки не розглядаються як вихідні дані дослідження, але є вимогою уряду Верхньої Баварії.

- 40 Блок-схему аналітичної фази готували для збору всієї інформації протягом окремих етапів аналітичної фази. Аналізи документували у спеціальних тестових записах або лабораторних журналах; перехресні посилання документували у блок-схемі аналітичної фази. Всю аналітичну документацію, у тому числі вихідні дані, передивлялися згідно стандартних процедур. Крім того, технічні паспорти для зразків сироватки готували згідно стандартних процедур.

- 45 Обробка даних. Необроблені дані переносили у відповідні Excel-файли для подальшого аналізу згідно стандартних процедур.

ELISA. Середні значення OD і стандартні помилки середнього розраховували за допомогою Excel.

- 50 PRNT. Бляшки перенесли у макро для підрахунку титру PRNT згідно стандартних процедур.

ELISPOT. Планшети ELISPOT зчитували CTL-рідером згідно інструкціям виробника. Кількість плямоутворюючих клітин (SFC) визначали у кожній лунці і заносили в Excel-файл для подальшої оцінки. З інкубації з 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ клітин на лунку, кількість плям на 1×10^6 спленоцитів підраховували у кожній лунці. Розраховували середнє для негативного контролю і

віднімали з кожного окремого значення перед обчисленням середнього значення на мишу для одержання значення індексу стимуляції (SI) (пептид-специфічна частота IFN-вивільняючих спленоцитів) із розрахунку на мишу.

Для пептидної стимуляції, SI одержували з лунок з 5×10^5 і $2,5 \times 10^5$ клітин, окрім випадків, коли плям було надто багато, щоб підрахувати, або RSV-імунізованих тварин. У цих випадках використовували лише концентрацію $2,5 \times 10^5$. Для стимуляції MVA-BN SI одержували з лунок з 5×10^5 , окрім випадків, коли плям було надто багато, щоб підрахувати. У такому разі використовували концентрацію $2,5 \times 10^5$. Після визначення SI для окремих тварин, середнє SI (SFC на 1×10^6 спленоцитів) і стандартну помилку середнього (SEM) розраховували для кожної групи.

Метод бляшок RSV. Кількість бляшок підраховували у лунці з трьома найвищими обчислюваними розведеннями вірусу. Середню кількість бляшок, регульовану фактором розведення, потім множили на 10, щоб одержати титр розчину у БУО/мл, і, нарешті, множили на 2, щоб одержати титр на кожну легеню.

RSV RT-qPCR. PCR-ампліфікації вимірювали у режимі реального часу, використовуючи ABI 7500 від Applied Biosystems (Catalog № 4351107) і аналізували, використовуючи системне програмне забезпечення, що поставляється Applied Biosystems. Усі значення порівнювали з L-генним стандартом і нормували до визначення мишачого бета-актина для кожного зразка.

Цитокіни ELISA. Концентрації цитокінів визначали за калібрувальною кривою відповідного набору ELISA.

Результати

Аналіз гуморальної імунної відповіді:

Для обох відповідей – RSV-специфічного IGG (ELISA, Фігура 13) і RSV-специфічного нейтралізуючого антитіла (PRNT, Фігура 14) – ми не спостерігали яких-небудь відмінностей між трьома конструктами (MVA-mBN199B, MVA-mBN201B і MVA-mBN294A)

Аналіз клітинної імунної відповіді:

Як і очікувалося, MVA-mBN294A мав подібний характер Т-клітинної відповіді, що і MVA-mBN201B (Фігура 15), викликаючи як F, так і M2 специфічні відповіді, домінувала M2 Т-клітинна відповідь. На протилежність цьому, лише MVA-mBN199B викликав F-специфічну відповідь, але на більш високому рівні, ніж MVA-mBN201B і MVA-mBN294A.

Аналіз навантаження RSV у легенях:

RSV-зараження штамом A2 RSV. Мишей заражали інтраназально 10^6 БУО RSV(A2) через два тижні після останньої імунізації. Через чотири дні після зараження мишей убивали. Після промивання легенів 1 мл PBS легені видаляли, а навантаження RSV у легенях визначали методом бляшок і RT-qPCR, проведеними як описано вище.

Навантаження RSV, виміряне методом бляшок. Через чотири дні після імунізації у середньому було визначено 29842 БУО на легеню не імунованих мишей (Фігура 16). Як і в RSV-імунованій контрольній групі, не були виявлені бляшки A2 RSV у легенях тварин, імунованих MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A після 2 підшкірних введень.

Навантаження RSV, виміряна RT-qPCR в режимі реального часу. Навантаження RSV у легенях також аналізували за допомогою RT-qPCR (Фігура 17). Тоді як RSV не був виявлений методом бляшок в будь-якої з вакцинованих мишей, геноми RSV ще виявлялися у мишей, імунованих підшкірно двічі MVA-mBN199B, MVA-mBN201B або MVA-mBN294A. Для MVA-mBN199B, навантаження RSV було у 45 разів нижче у порівнянні з контрольною групою TBS. Геноми RSV також виявлялися для MVA-mBN201B і MVA-mBN294A, але навантаження було сильно знижене у порівнянні з MVA-mBN199B, у 416 разів і у 281 раз нижче у порівнянні з контрольною групою TBS, відповідно.

Аналіз ознак підвищеного захворювання

На відміну від партії FI-RSV, що використовувалась в експериментах, описаних у Прикладі 3, нова партія, що використовувалась у цьому дослідженні, не показала якого-небудь підвищення продукування IL-4 або IL-5. Проте, ми змогли з цією партією виявити інфільтрації еозинофілів і нейтрофілів у рідині BAL, що є основною ознакою підвищеного захворювання для FI-RSV. Жодних ознак підвищених захворювань не було виявлено для MVA-mBN199B, MVA-mBN201B і MVA-mBN294A.

Обговорення і висновки

Не дивлячись на відмінності між MVA-mBN294A (еквівалент MVA-mBN294B) і MVA-mBN201B, обидва індукували аналогічні В- і Т-клітинні реакції і надавали аналогічний захист, не викликаючи підвищеного захворювання. Обидва конструкти викликали кращий захист, ніж MVA-mBN199B, який експресує лише антигенні детермінанти мембранних глікопротеїнів (F і G).

Інші варіанти реалізації винаходу будуть очевидні для фахівців у цій галузі з розгляду опису і практичного застосування винаходу, розкритого у цьому документі. Передбачається, що опис і приклади слід розглядати лише як ілюстративні, а дійсний обсяг і суть винаходу вказані у наступній формулі винаходу.

5

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> ВАКЦИНА РЕКОМБІНАНТНОГО МОДИФІКОВАНОГО ВІРУСУ ВІСПОВАКЦИНИ АНКАРА (MVA) РЕСПІРАТОРНО-СИНЦИТІАЛЬНОГО ВІРУСУ (RSV)

<130> BNI14747PCT

<140> Не призначено

<141> 2013-03-15

<150> US 61/678,367

<151> 2012-08-01

<150> EP 12005594.2

<151> 2012-08-01

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 897

<212> ДНК

<213> Людський респіраторно-синцитіальний вірус (hRSV), штам A2

<400> 1

atgagcaaga acaaggacca gcggaccgcc aagaccctgg aacggacctg ggacaccctg
60

aaccatctgc tgttcacag tagctgcctg tacaagctga acctgaagtc cgtggccag
120

atcaccctga gcatcctggc catgatcatc agcaccagcc tgatcattgc cgccatcatc
180

tttatcgcca gcgccaacca caaagtgacc cccaccacag ccatcatcca ggacgccacc
240

tccagatca agaacaccac cccacctac ctgaccacaga accctcagct gggcatcagc
300

cccagcaacc ccagcgagat caccagccag atcacaacca tcctggcctc caccaccct
360

ggcgtgaagt ccaccctgca gagcaccacc gtgaaaacca agaataccac caccacacag
420

accagccca gcaagccac caccagcag agacagaaca agccccctc caagcccaac
480

aacgacttc acttcgaggt gttcaacttc gtgccctgca gcatctgcag caacaacccc
540

acctgttggg ccatctgcaa gcggatcccc aacaagaagc ccggcaagaa aaccacaacc
600

aagcctacca agaagcctac cctgaaaacc accaagaagg accccaagcc ccagaccacc
660

aagagcaaag aggtgccaac caccaagccc accgaggaac ccaccatcaa caccaccaag
720

accaacatca tcaccaccct gctgacctcc aacaccaccg gcaaccccga gctgacaagc
780

cagatggaaa ccttcacacg caccagcagc gagggcaacc ctagccctag ccagggtgtcc
840

accacctccg agtaccaccg ccagcctagc agccccccca acaccccag acagtga
897

<210> 2
<211> 298
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 2

Met	Ser	Lys	Asn	Lys	Asp	Gln	Arg	Thr	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	Arg	Thr
1				5					10					15	

Trp	Asp	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Ser	Cys	Leu	Tyr	Lys
			20					25					30		

Leu	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Gln	Ile	Thr	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Met
		35					40					45			

Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Ile	Ala	Ser
	50					55					60				

Ala	Asn	His	Lys	Val	Thr	Pro	Thr	Thr	Ala	Ile	Ile	Gln	Asp	Ala	Thr
65					70					75					80

Ser	Gln	Ile	Lys	Asn	Thr	Thr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Thr	Gln	Asn	Pro	Gln
				85					90					95	

Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Ser	Asn	Pro	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr
			100					105					110		

Thr	Ile	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser
		115					120					125			

Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Lys	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Gln	Pro	Ser
	130					135					140				

Lys	Pro	Thr	Thr	Lys	Gln	Arg	Gln	Asn	Lys	Pro	Pro	Ser	Lys	Pro	Asn
145					150					155					160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
290 295

<210> 3
<211> 1725
<212> ДНК
<213> hRSV штам A2

<400> 3
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacaa tcctgaccgc cgtgaccttc
60

tgcttcgcca gcgccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg tagcgccgtg
120

agcaagggt acctgagcgc cctgagaacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag
180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaagtga gctgatcaag
240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgaactcc agctcctcat gcagtccacc
300

cctgccacca acaaccgggc cagaagagaa ctgccccggt ttatgaacta cacactgaac
360

aacgccaaaa agaccaatgt cactctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttt
 420
 ctgctgggcg tgggcagcgc cattgccagc ggcgtggccg tgtccaaggt gctgcacctg
 480
 gaaggcgaag tgaacaagat caagagtgcc ctgctctcca caaacaaggc cgtggtgtcc
 540
 ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggctctgg atctgaagaa ctacatcgac
 600
 aagcagctcc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagactgtc
 660
 atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac
 720
 gcagggcgtga ccacccccgt gtccacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg
 780
 atcaatgaca tgcccatcac caacgatcag aagaaactca tgagcaacaa cgtgcagatc
 840
 gtgcggcagc agagttacag tatcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg
 900
 gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc
 960
 ctgtgcacca ccaacacaaa agagggcagt aacatctgcc tgacccggac cgacagaggc
 1020
 tgggtactgcg acaacgccgg cagcgtgtca ttctttccac aggccgagac atgcaagggtg
 1080
 cagagcaacc ggggtgtctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaagtcaac
 1140
 ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ttccaagacc
 1200
 gacgtgtcca gcagcgtgat tacctccctg ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc
 1260
 aagtgcaccg ccagcaacaa gaatagagga atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac
 1320
 tacgtgtcca ataagggcat ggacaccgtg tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat
 1380
 aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagcca tcatcaactt ctacgacccc
 1440
 ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agtatcagcc aggtcaacga gaagatcaac
 1500
 cagagcctgg ccttcatcag aaagagcgac gaactgctgc acaatgtgaa cgctggcaag
 1560

agtaccacaa acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgagt
1620

ctgatcgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc
1680

aaggatcagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca actga
1725

<210> 4
<211> 574
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 4

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	180	185	190	
Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn	195	200	205	
Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln	210	215	220	
Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn	225	230	235	240
Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	245	250	255	
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	260	265	270	
Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	275	280	285	
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro	290	295	300	
Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro	305	310	315	320
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg	325	330	335	
Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	340	345	350	
Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp	355	360	365	
Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val	370	375	380	
Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	Ser	Lys	Thr	385	390	395	400
Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Cys	405	410	415	

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 5

<211> 1725

<212> ДНК

<213> hRSV штам A-Long

<400> 5

atggaactgc ccacccctgaa ggccaacgcc atcaccacaa tcctggccgc cgtgaccttc
60

tgcttcgcca gcagccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg tagcgccgtg
120

agcaagggtt acctgagcgc cctgagaacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag
180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaagtga gctgatcaag
240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgaactcc agtcctcat gcagtccacc
300

cctgccgcca acaaccgggc cagaagagaa ctgccccggt ttatgaacta cacactgaac
360

aacaccaaaa agaccaatgt gaccctgagc aagaagcggg agcggcggtt cctgggcttt
420

ctgctgggcg tgggcagcgc cattgccagc ggcattgccg tgtccaaggt gctgcacctg
480

gaaggcgaag tgaacaagat caagagcgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc
540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac
600

aagcagctcc tgcccatcgt gaacaagcag agctgccgga tcagcaacat cgagacagtg
660

atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac
720

gtgggcgtga ccacccccgt gtccacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg
780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aagaaactga tgagcaacaa cgtgcagatc
840

gtgcggcagc agagctacag catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg
900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc
960

ctgtgcacca ccaacacaaa agagggcagt aacatctgcc tgacccggac cgacagaggc
1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgtca ttctttccac aggccgagac atgcaagggt
1080

cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaagtcaac
1140

ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ttccaagacc
1200

gacgtgtcca gcagcgtgat tacctccctg ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc
1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaatagagga atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac
1320

tacgtgtcca ataaggcgt ggacaccgtg tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat
1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc
1440

ctgggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac
1500

cagagcctgg ccttcacag aaagagcgac gaactgctgc acaatgtgaa cgctggcaag
1560

agtaccacaa acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgagt
1620

ctgatcgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc
1680

aaggatcagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca actga
1725

<210> 6
<211> 574
<212> Білок
<213> hRSV штам A-Long

<400> 6

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu

145		150		155		160
Glu Gly Glu Val	Asn Lys Ile Lys Ser	Ala Leu Leu Ser Thr	Asn Lys			
	165	170	175			
Ala Val Val Ser	Leu Ser Asn Gly Val	Ser Val Leu Thr	Ser Lys Val			
	180	185	190			
Leu Asp Leu Lys	Asn Tyr Ile Asp Lys	Gln Leu Leu Pro	Ile Val Asn			
	195	200	205			
Lys Gln Ser Cys	Arg Ile Ser Asn Ile	Glu Thr Val Ile	Glu Phe Gln			
	210	215	220			
Gln Lys Asn Asn	Arg Leu Leu Glu Ile	Thr Arg Glu Phe	Ser Val Asn			
	225	230	235	240		
Val Gly Val Thr	Thr Pro Val Ser Thr	Tyr Met Leu Thr	Asn Ser Glu			
	245	250	255			
Leu Leu Ser Leu	Ile Asn Asp Met Pro	Ile Thr Asn Asp	Gln Lys Lys			
	260	265	270			
Leu Met Ser Asn	Asn Val Gln Ile Val	Arg Gln Gln Ser	Tyr Ser Ile			
	275	280	285			
Met Ser Ile Ile	Lys Glu Glu Val Leu	Ala Tyr Val Val	Gln Leu Pro			
	290	295	300			
Leu Tyr Gly Val	Ile Asp Thr Pro Cys	Trp Lys Leu His	Thr Ser Pro			
	305	310	315	320		
Leu Cys Thr Thr	Asn Thr Lys Glu Gly	Ser Asn Ile Cys	Leu Thr Arg			
	325	330	335			
Thr Asp Arg Gly	Trp Tyr Cys Asp Asn	Ala Gly Ser Val	Ser Phe Phe			
	340	345	350			
Pro Gln Ala Glu	Thr Cys Lys Val Gln	Ser Asn Arg Val	Phe Cys Asp			
	355	360	365			
Thr Met Asn Ser	Leu Thr Leu Pro Ser	Glu Val Asn Leu	Cys Asn Val			
	370	375	380			
Asp Ile Phe Asn	Pro Lys Tyr Asp Cys	Lys Ile Met Thr	Ser Lys Thr			

```

385                      390                      395                      400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
      405                      410                      415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
      420                      425                      430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
      435                      440                      445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
      450                      455                      460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                      470                      475                      480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
      485                      490                      495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
      500                      505                      510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
      515                      520                      525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
      530                      535                      540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545                      550                      555                      560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
      565                      570

<210> 7
<211> 738
<212> ДНК
<213> hRSV штам B

<400> 7
atgattattt ccactagtct cattatcgct gctattatct tcatcattag tgccaatcat
60

aaagtcaccc tcacaaccgt caccgtgcag accattaaaa accataccga gaagaatattc
120

```

tcaacatattc tgacacaggt cccccccgaa agagtgaact cttccaaaca gcccaaac
180

acctccccca ttcataccaa tagtgccaca atttctccca acacaaagtc tgaaacacac
240

cacactactg ctcagacaaa gggccgaatc accacctcta ctcagaccaa taagccatca
300

acaaaatccc gctccaaaaa cccacctaaa aaacctaaag atgactatca tttcgaagtc
360

tttaatttcg tcccatgttc catttgcgga aacaaccagc tctgtaaatc tatctgtaaa
420

accatcccct ctaacaagcc aaaaaagaaa cctactatta aaccaactaa taagcccacc
480

actaagacta ctaacaaacg cgatccaaaa acaccgcga aaatgcctaa aaaagagatc
540

attacaaacc cagccaagaa accaactctc aaaactaccg aacgggacac ctccatttct
600

cagtctaccg tgctcgatac catcactccc aaatacacta tccagcagca gtcactccac
660

tcaacaacct ccgagaacac cccctcctca acccagattc ctactgcttc cgaaccatcc
720

accctcaacc ccaattga
738

<210> 8
<211> 245
<212> Білок
<213> hRSV штам B

<400> 8

Met	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Ile	Ile
1				5					10					15	

Ser	Ala	Asn	His	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Gln	Thr	Ile
			20					25					30		

Lys	Asn	His	Thr	Glu	Lys	Asn	Ile	Ser	Thr	Tyr	Leu	Thr	Gln	Val	Pro
		35					40					45			

Pro	Glu	Arg	Val	Asn	Ser	Ser	Lys	Gln	Pro	Thr	Thr	Thr	Ser	Pro	Ile
	50						55					60			

His	Thr	Asn	Ser	Ala	Thr	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Lys	Ser	Glu	Thr	His
65						70				75					80

His Thr Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr
85 90 95

Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
100 105 110

Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
115 120 125

Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser
130 135 140

Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr
145 150 155 160

Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro
165 170 175

Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn Pro Ala Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr
180 185 190

Thr Glu Arg Asp Thr Ser Ile Ser Gln Ser Thr Val Leu Asp Thr Ile
195 200 205

Thr Pro Lys Tyr Thr Ile Gln Gln Gln Ser Leu His Ser Thr Thr Ser
210 215 220

Glu Asn Thr Pro Ser Ser Thr Gln Ile Pro Thr Ala Ser Glu Pro Ser
225 230 235 240

Thr Leu Asn Pro Asn
245

<210> 9
<211> 1176
<212> ДНК
<213> hRSV штам A2

<400> 9
atggccctga gcaaagtga gctgaacgac accctgaaca aggaccagct gctgtccagc
60

tcctaagtaca ccatccagag aagcaccggc gacagcatcg acacccccaa ctacgacgtg
120

cagaagcaca tcaataagct gtgcggcatg ctgctgatca ccgaggacgc caaccacaag
180

ttcaccggcc tgatcgggat gctgtacgcc atgagccggc tgggccggga ggacaccatc
240

aagatcctgc gggacgccgg ctaccacgtg aaggccaacg gcgtggacgt gaccacccac
300

cggcaggaca tcaacggcaa agaaatgaag ttcgaggtgc tgaccctggc cagcctgacc
360

accgagatcc agatcaacat cgagatcgag agccggaagt cctacaagaa aatgctgaaa
420

gaaatgggcg aggtggcccc cgagtacaga cagcacagcc ccgactgcgg catgatcatc
480

ctgtgtatcg ccgccctggt catcacaag ctggccgctg gcgacagatc tggcctgacc
540

gccgtgatca gacgggcca caacgtgctg aagaacgaga tgaagcggta caagggcctg
600

ctgcccaagg atatcgccaa cagcttctac gaggtgttcg aaaagcacc ccacttcac
660

gacgtgttcg tgcacttcgg cattgccag agcagcacca gaggcggcag cagagtggag
720

ggcatcttcg ccggcctggt catgaacgcc tacggcgctg gccaggatcat gctgagatgg
780

ggcgtgctgg ccaagagcgt gaagaacatc atgctgggccc acgccagcgt gcaggccgag
840

atggaacagg tgggtggagg gtacgagtac gcccagaagc tgggcggcga ggccggcttc
900

taccacatcc tgaacaaccc caaggcctcc ctgctgtccc tgaccagtt cccccacttt
960

agcagcgtgg tgctcgaaa tgcagccgga ctgggcatca tgggcgagta ccgcggcacc
1020

cccagaaacc aggacctgta cgacgccgcc aaggcctacg ccgagcagct gaaagaaaac
1080

ggcgtgatca actacagcgt gctggacctg acagccgagg aactggaagc cattaagcac
1140

cagctgaacc ctaaggacaa cgacgtggag ctgtga
1176

<210> 10
<211> 391
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 10

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln

1	5				10				15						
Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser
			20					25					30		
Ile	Asp	Thr	Pro	Asn	Tyr	Asp	Val	Gln	Lys	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Cys
		35					40					45			
Gly	Met	Leu	Leu	Ile	Thr	Glu	Asp	Ala	Asn	His	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu
	50					55					60				
Ile	Gly	Met	Leu	Tyr	Ala	Met	Ser	Arg	Leu	Gly	Arg	Glu	Asp	Thr	Ile
65					70					75					80
Lys	Ile	Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Tyr	His	Val	Lys	Ala	Asn	Gly	Val	Asp
				85					90					95	
Val	Thr	Thr	His	Arg	Gln	Asp	Ile	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Lys	Phe	Glu
			100					105					110		
Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Gln	Ile	Asn	Ile	Glu
		115					120					125			
Ile	Glu	Ser	Arg	Lys	Ser	Tyr	Lys	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Met	Gly	Glu
	130					135					140				
Val	Ala	Pro	Glu	Tyr	Arg	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Gly	Met	Ile	Ile
145					150					155					160
Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Arg
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Arg	Ala	Asn	Asn	Val	Leu	Lys	Asn
			180					185					190		
Glu	Met	Lys	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Ser
		195					200					205			
Phe	Tyr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	His	Pro	His	Phe	Ile	Asp	Val	Phe	Val
	210					215					220				
His	Phe	Gly	Ile	Ala	Gln	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Leu	Phe	Met	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gln	Val

```

                245                250                255
Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
                260                265                270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
                275                280                285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
                290                295                300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
                305                310                315                320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
                325                330                335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
                340                345                350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
                355                360                365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
                370                375                380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
                385                390

<210> 11
<211> 54
<212> ДНК
<213> вірус ящуру (FMDV)

<400> 11
ctgaacttcg atctgctgaa actggccggc gacgtggaaa gcaaccctgg cccc
54

<210> 12
<211> 18
<212> Білок
<213> FMDV

<400> 12

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
1 5 10 15

```


Gly Pro

<210> 13
 <211> 585
 <212> ДНК
 <213> hRSV штам A2

<400> 13
 atgagcagac ggaacccctg caagttcgag atccggggcc actgcctgaa cggcaagcgg
 60
 tgccacttca gccacaacta cttcgagtgg cccctcatg ctctgctggt ccggcagAAC
 120
 tttatgctga accggatcct gaagtccatg gacaagagca tcgataccct gagcgagatc
 180
 agcggagccg ccgaactgga tagaaccgag gaatacgccc tgggcgtggt cggagtgtctg
 240
 gaaagctaca tcggcagcat caacaacatc accaagcaga gcgcctgcgt ggccatgagc
 300
 aagctgctga ccgagctgaa cagcgacgat atcaagaagc tgcgcgacaa cgaagaactg
 360
 aactccccca agatccgggt gtacaacaca gtgatcagct acattgagag caaccggaag
 420
 aacaacaagc agaccatcca tctgctgaag cggctgcccg ccgacgtgct gaaaaagacc
 480
 atcaagaaca ccttgacat ccacaagtcc atcaccatca ataaccccaa agaaagcacc
 540
 gtgtccgaca ccaacgacca cgccaagaac aacgacacca cctga
 585

<210> 14
 <211> 194
 <212> Білок
 <213> hRSV штам A2

<400> 14
 Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu
 1 5 10 15
 Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro
 20 25 30
 His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys
 35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys
85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys
100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr
115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln
130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro
165 170 175

Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp
180 185 190

Thr Thr

<210> 15

<211> 1575

<212> ДНК

<213> hRSV штам A2

<400> 15

atggaactcc ctattctcaa agccaatgct attactacca ttctcgccgc tgtcaccttt
60

tgtttcgct cttcccagaa tattaccgaa gagttttacc agtctacctg ttccgccgtc
120

agtaaaggat acctgtccgc cctccgcact ggttggtata ctagtgtcat tacaatcgaa
180

ctctcaaata taaaagaaaa taagtgtaat gggaccgatg ctaaagtcaa actcattaaa
240

caagaactcg ataagtataa gaatgctgtc actgagctgc aactgctgat gcagtctaca
300

cccgcagcca ataatcgagc cagacgcgag ctgcctcgct ttatgaatta tactctcaat
 360
 aatactaaaa agacaaacgt caccctcagt aaaaagcgaa aaagacgggt tctcggattc
 420
 ctctcggcgc tgggctctgc tatecgtagc ggaattgctg tctccaaagt cctccatctg
 480
 gaaggggagg tcaacaaaat taagtctgct ctctctcta caaacaaagc cgtcgtgtct
 540
 ctctccaatg gcgtgtctgt gctcacctct aaagtgtctg acctcaaaaa ttacattgat
 600
 aaacagctgc tccctattgt gaacaaacag tcttgccgca ttagcaatat cgaaaccgtc
 660
 attgaatttc aacaaaagaa taataggctc ctcgaaatta cccgcgaatt ctccgtgaat
 720
 gtgggagtc caacacctgt ctctacctat atgtcacta actccgaact cctctccctc
 780
 attaacgata tgcccattac aaatgatcag aaaaaactca tgtctaataa cgtccagatt
 840
 gtccgccagc agtcttatag cattatgtcc attatcaaag aggaagtcct cgcttacgtc
 900
 gtccagctcc ctctgtatgg ggtcatcgat acaccttgtt ggaaactcca tacctcccca
 960
 ctgtgtacaa ccaataccaa agaagggctc aatatttgcc tgacaagaac cgaccgcggg
 1020
 tggtaactgtg ataatgccgg ctctgtctcc tttttccccc aggccgaaac ctgtaaagtc
 1080
 cagtctaate gagtcttttg cgatactatg aattccctca cctcccttc agaagtgaat
 1140
 ctctgtaacg tcgatatttt caaccctaaa tatgattgca aaattatgac cagtaaaact
 1200
 gacgtgtcct ctcccgctat caccctcctc ggtgctattg tgtcttgta cggaaaaact
 1260
 aaatgcacgg ctagtaataa gaaccgaggc attattaaga ctttttccaa cggctgtgat
 1320
 tatgtgtcta acaaaggcgt ggatactgtc agtgteggaa atacacteta ctatgtcaac
 1380
 aaacaggaag ggaaaagtct ctacgtcaaa ggggagccga taatcaattt ttacgatccc
 1440
 ctctcttttc cctccgatga atttgatgcc agtatttccc aggtgaacga aaaaatcaat
 1500

cagtctctcg cttttattag aaaatctgat gaactcctgc ataacgtcaa tgcaggcaaa
1560

agcactacta attga
1575

<210> 16
<211> 524
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 16

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val

	180		185		190	
Leu Asp	Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn					
	195		200		205	
Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln						
	210		215		220	
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn						
	225		230		235	240
Val Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu						
		245		250		255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys						
	260		265		270	
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile						
	275		280		285	
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro						
	290		295		300	
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro						
	305		310		315	320
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg						
		325		330		335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe						
	340		345		350	
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp						
	355		360		365	
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val						
	370		375		380	
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr						
	385		390		395	400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys						
		405		410		415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile						

420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
 515 520

<210> 17
 <211> 1809
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> cDNA, що кодує злитий білок, який містить непроцесований Т-білок з hRSV штаму A2, злитий з фрагментом протеази 2A з вірусу ящуру, злиту з непроцесованим білком M2 з вірусу hRSV штам A2.

<400> 17
 atggccctga gcaaagtga gctgaacgac accctgaaca aggaccagct gctgtccagc
 60
 tccaagtaca ccatccagag aagcaccggc gacagcatcg acacccccaa ctacgacgtg
 120
 cagaagcaca tcaataagct gtgcggcatg ctgctgatca ccgaggacgc caaccacaag
 180
 ttcaccggcc tgatcgggat gctgtacgcc atgagccggc tgggccggga ggacaccatc
 240
 aagatcctgc gggacgccgg ctaccacgtg aaggccaacg gcgtggacgt gaccacccac
 300
 cggcaggaca tcaacggcaa agaaatgaag ttcgaggtgc tgaccctggc cagcctgacc
 360
 accgagatcc agatcaacat cgagatcgag agccggaagt cctacaagaa aatgctgaaa
 420

gaaatgggcg aggtggcccc cgagtacaga cacgacagcc cggactgcgg catgatcatc
 480
 ctgtgtatcg ccgccctggt catcaciaaag ctggccgctg gcgacagatc tggcctgacc
 540
 gccgtgatca gacgggccaa caacgtgctg aagaacgaga tgaagcggta caagggcctg
 600
 ctgcccaagg atatcgccaa cagcttctac gaggtgttcg aaaagcacc ccacttcac
 660
 gacgtgttcg tgcacttcgg cattgcccag agcagcacca gaggcggcag cagagtggag
 720
 ggcattcttc ccggcctggt catgaacgcc tacggcgctg gccaggtcat gctgagatgg
 780
 ggcgtgctgg ccaagagcgt gaagaacatc atgctgggcc acgccagcgt gcaggccgag
 840
 atggaacagg tgggtggagg gtacgagtac gcccagaagc tgggcggcga ggccggcttc
 900
 taccacatcc tgaacaaccc caaggcctcc ctgctgtccc tgaccagtt cccccacttt
 960
 agcagcgtgg tgctcggaaa tgcagccgga ctgggcatca tgggcgagta ccgcggcacc
 1020
 cccagaaacc aggacctgta cgacgccgcc aaggcctacg ccgagcagct gaaagaaaac
 1080
 ggcgtgatca actacagcgt gctggacctg acagccgagg aactggaagc cattaagcac
 1140
 cagctgaacc ctaaggacaa cgacgtggag ctgctgaact tcgatctgct gaaactggcc
 1200
 ggcgacgtgg aaagcaaccc tggccccagc agacggaacc cctgcaagtt cgagatccgg
 1260
 ggccactgcc tgaacggcaa gcggtgccac ttcagccaca actacttcga gtggccccct
 1320
 catgctctgc tggtcgggca gaactttatg ctgaaccgga tcctgaagtc catggacaag
 1380
 agcatcgata ccctgagcga gatcagcgga gccgccgaac tggatagaac cgaggaatac
 1440
 gccctgggcg tggtcggagt gctggaaagc tacatcggca gcatcaaaa catcaccaag
 1500
 cagagcgctt gcgtggccat gagcaagctg ctgaccgagc tgaacagcga cgatatcaag
 1560
 aagctgcgcg acaacgaaga actgaactcc cccaagatcc ggggtgtaaa cacagtgatc
 1620

agctacattg agagcaaccg gaagaacaac aagcagacca tccatctgct gaagcggctg
1680

cccgccgacg tgctgaaaaa gaccatcaag aacaccctgg acatccacaa gtccatcacc
1740

atcaataacc ccaaagaaaag caccgtgtcc gacaccaacg accacgcca aagaacacgac
1800

accacctga
1809

<210> 18
<211> 602
<212> Білок
<213> Штучна

<220>
<223> Злитий білок, що містить непроцесований N-білок з вірусу hRSV штам A2, злитий з фрагментом протеази 2A з вірусу ящуру, злику з непроцесованим білком M2 з вірусу hRSV штам A2.

<400> 18

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
20 25 30

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
35 40 45

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
50 55 60

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
65 70 75 80

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
85 90 95

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
100 105 110

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
115 120 125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
130 135 140

Val	Ala	Pro	Glu	Tyr	Arg	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Gly	Met	Ile	Ile	145	150	155	160
Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Arg	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Arg	Ala	Asn	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	180	185	190	
Glu	Met	Lys	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Ser	195	200	205	
Phe	Tyr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	His	Pro	His	Phe	Ile	Asp	Val	Phe	Val	210	215	220	
His	Phe	Gly	Ile	Ala	Gln	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Val	Glu	225	230	235	240
Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Leu	Phe	Met	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gln	Val	245	250	255	
Met	Leu	Arg	Trp	Gly	Val	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Asn	Ile	Met	Leu	260	265	270	
Gly	His	Ala	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Met	Glu	Gln	Val	Val	Glu	Val	Tyr	275	280	285	
Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Gly	Phe	Tyr	His	Ile	Leu	290	295	300	
Asn	Asn	Pro	Lys	Ala	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Pro	His	Phe	305	310	315	320
Ser	Ser	Val	Val	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Met	Gly	Glu	325	330	335	
Tyr	Arg	Gly	Thr	Pro	Arg	Asn	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	340	345	350	
Tyr	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Val	Ile	Asn	Tyr	Ser	Val	Leu	355	360	365	
Asp	Leu	Thr	Ala	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	His	Gln	Leu	Asn	Pro	370	375	380	

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
385 390 395 400

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys
405 410 415

Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser
420 425 430

His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn
435 440 445

Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr
450 455 460

Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr
465 470 475 480

Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn
485 490 495

Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr
500 505 510

Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu
515 520 525

Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu
530 535 540

Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu
545 550 555 560

Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His
565 570 575

Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr
580 585 590

Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr
595 600

<210> 19
<211> 10
<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 19

Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Leu
1				5					10

<210> 20

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 20

Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu
1			5					

<210> 21

<211> 15

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 21

Glu	Leu	Gln	Leu	Leu	Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Asn	Arg
1				5					10					15

<210> 22

<211> 13

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 22

Trp	Ala	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly
1				5					10			

<210> 23

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 23

Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 24

Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro Asn Phe
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 25

Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 26

Ile Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser Phe
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний пептид.

<400> 27

Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile

1

5

```

<210> 28
<211> 1725
<212> ДНК
<213> hRSV штам A2

<400> 28
atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt
60

tgttttgctt ctggtcaaaa catcactgaa gaattttatc aatcaacatg cagtgcagtt
120

agcaaagget atcttagtgc tctgagaact ggttggtata ccagtgttat aactatagaa
180

ttaagtaata tcaaggaaaa taagtgtaat ggaacagatg ctaaggtaaa attgataaaa
240

caagaattag ataaatataa aaatgctgta acagaattgc agttgctcat gcaaagcaca
300

ccaccaacaa acaatcgagc cagaagagaa ctaccaaggt ttatgaatta tacactcaac
360

aatgccaaaa aaaccaatgt aacattaagc aagaaaagga aaagaagatt tcttggtttt
420

ttgttaggtg ttggatctgc aatcgccagt ggcgttgctg tatctaaggt cctgcaccta
480

gaaggggaag tgaacaagat caaaagtgtc ctactatcca caaacaaggc tgtagtcagc
540

ttatcaaatg gagttagtgt ctaaccagc aaagtgttag acctcaaaaa ctatatagat
600

aaacaattgt tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaata agaaactgtg
660

atagagttcc aacaaaagaa caacagacta ctagagatta ccagggaatt tagtgттаат
720

gcagggtgtaa ctacacctgt aagcacttac atgttaacta atagtgaatt attgtcatta
780

atcaatgata tgcctataac aaatgatcag aaaaagttaa tgtccaacaa tgttcaaata
840

gttagacagc aaagttactc tatcatgtcc ataataaaag aggaagtctt agcatatgta
900

gtacaattac cactatatgg tggtatagat acaccctgtt ggaaactaca cacatcccct
960

ctatgtacaa ccaacacaaa agaagggtcc aacatctgtt taacaagaac tgacagagga
1020

```

tggtactgtg acaatgcagg atcagtatct ttcttccac aagctgaaac atgtaaagtt
1080

caatcaaadc gagtattttg tgacacaatg aacagtttaa cattaccaag tgaaataaat
1140

ctctgcaatg ttgacatatt caaccccaaa tatgattgta aaattatgac ttcaaaaaca
1200

gatgtaagca gctccgttat cacatctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaact
1260

aaatgtacag catccaataa aaatcgtgga atcataaaga ctttttctaa cgggtgcat
1320

tatgtatcaa ataaagggat ggacactgtg tctgtaggta acacattata ttatgtaaat
1380

aagcaagaag gtaaaagtct ctatgtaaaa ggtgaaccaa taataaattt ctatgacca
1440

ttagtattcc cctctgatga atttgatgca tcaatatctc aagtcaacga gaagattaac
1500

cagagcctag catttattcg taaatccgat gaattattac ataatgtaaa tgctggtaaa
1560

tccaccacaa atatcatgat aactactata attatagtga ttatagtaat attgttatca
1620

ttaattgctg ttggactgct cttatactgt aaggccagaa gcacaccagt cacactaagc
1680

aaagatcaac tgagtggat aaataatatt gcatttagta actaa
1725

<210> 29
<211> 574
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 29

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys	65	70	75	80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu	85	90	95	
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Pro	100	105	110	
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Lys	Thr	Asn	Val	Thr	115	120	125	
Leu	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	130	135	140	
Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	145	150	155	160
Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	165	170	175	
Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	180	185	190	
Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn	195	200	205	
Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln	210	215	220	
Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn	225	230	235	240
Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	245	250	255	
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	260	265	270	
Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	275	280	285	
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro	290	295	300	

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525
 Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 30

<211> 897

<212> ДНК

<213> hRSV штам A2

<400> 30

atgagcaaga acaaggacca gcggaccgcc aagaccctgg aacggacctg ggacaccctg
60

aaccatctgc tgttcattcag tagctgcctg tacaagctga acctgaagtc cgtggcccag
120

atcaccctga gcatcctggc catgatcatc agcaccagcc tgatcattgc cgccatcatc
180

tttatcgcca gcgccaacca caaagtgacc cccaccacag ccatcatcca ggacgccacc
240

tcccagatca agaaccaccac cccacacctac ctgaccacaga accctcagct gggcatcagc
300

cccagcaacc ccagcgagat caccagccag atcacaacca tcttgacctc caccaccct
360

ggcgtgaagt ccaccctgca gagcaccacc gtgaaaacca agaataccac caccacacag
420

accagccca gcaagccac caccaagcag agacagaaca agccccctc caagcccaac
480

aacgacttc acttcgaggt gttcaacttc gtgccctgca gcatctgcag caacaacccc
540

acctgttggg ccatctgcaa gcggatcccc aacaagaagc ccggcaagaa aaccacaacc
600

aagcctacca agaagcctac cctgaaaacc accaagaagg accccaagcc ccagaccacc
660

aagagcaaag aggtgccaac caccaagccc accgaggaac ccaccatcaa caccaccaag
720

accaacatca tcaccacct gctgacctcc aacaccaccg gcaaccccg gctgacaagc
780

cagatggaaa ccttcacacag caccagcagc gagggcaacc ctagccctag ccaggtgtcc
840

accacctccg agtaccaccg ccagcctagc agccccccca acacccccag acagtga
897

```

<210> 31
<211> 298
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 31

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
1          5          10          15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
          20          25          30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
          35          40          45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
          50          55          60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65          70          75          80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
          85          90          95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
          100          105          110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
          115          120          125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
          130          135          140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
145          150          155          160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
          165          170          175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
          180          185          190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
          195          200          205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu

```

```

210                215                220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225                230                235                240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245                250                255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260                265                270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
275                280                285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
290                295

<210> 32
<211> 585
<212> ДНК
<213> hRSV штам A2

<400> 32
atgtcacgaa ggaatccttg caaatttgaa attcgaggtc attgcttaaa tggtaagagg
60

tgtcatTTtTA gTcataatta ttttgaatgg ccaccccatg cactgcttgt aagacaaaac
120

tttatgttaa acagaatact taagtctatg gataaaagta tagatacctt atcagaaata
180

agtggagctg cagagttgga cagaacagaa gagtatgctc ttggtgtagt tggagtgcta
240

gagagttata taggatcaat aaacaatata actaaacaat cagcatgtgt tgccatgagc
300

aaactcctca ctgaactcaa tagtgatgat atcaaaaagc tgagggacaa tgaagagcta
360

aattcaccca agataagagt gtacaatact gtcatatcat atattgaaag caacaggaaa
420

aacaataaac aaactatcca tctgttaaaa agattgccag cagacgtatt gaagaaaacc
480

atcaaaaaca cattggatat ccataagagc ataaccatca acaacccaaa agaatcaact
540

gttagtgata caaatgacca tgccaaaaat aatgatacta cctga
585

```

<210> 33
 <211> 194
 <212> Білок
 <213> hRSV штам A2

<400> 33

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro
 20 25 30

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys
 35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala
 50 55 60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu
 65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys
 85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys
 100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr
 115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln
 130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro
 165 170 175

Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp
 180 185 190

Thr Thr

<210> 34

```

<211> 1176
<212> ДНК
<213> hRSV штам A2

<400> 34
atggctctta gcaaagtcaa gttgaatgat acactcaaca aagatcaact tctgtcatcc
60

agcaaataca ccatccaacg gagcacagga gatagtattg atactcctaa ttatgatgtg
120

cagaaacaca tcaataagtt atgtggcatg ttattaatca cagaagatgc taatcataaa
180

ttcactgggt taataggtat gttatatgcg atgtctaggt taggaagaga agacaccata
240

aaaatactca gagatgcggg atatcatgta aaagcaaag gagtagatgt aacaacacat
300

cgtcaagaca ttaatggaaa agaaatgaaa tttgaagtgt taacattggc aagcttaaca
360

actgaaattc aaatcaacat tgagatagaa tctagaaaat cctacaaaaa aatgctaaaa
420

gaaatgggag aggtagctcc agaatacagg catgactctc ctgattgtgg gatgataata
480

ttatgtatag cagcattagt aataactaaa ttagcagcag gggacagatc tggctctaca
540

gccgtgatta ggagagctaa taatgtccta aaaaatgaaa tgaaacgtta caaaggctta
600

ctacccaagg acatagccaa cagcttctat gaagtgttg aaaaacatcc ccactttata
660

gatgtttttg ttcatttttg tatagcacia tcttctacca gaggtggcag tagagttgaa
720

gggatttttg caggattgtt tatgaatgcc tatggtgcag ggcaagtgat gttacggtgg
780

ggagtcttag caaaatcagt taaaaatatt atgttaggac atgctagtgt gcaagcagaa
840

atggaacaag ttgttgaggt ttatgaatat gcccaaaaat tgggtggtga agcaggattc
900

taccatatat tgaacaaccc aaaagcatca ttattatctt tgactcaatt tctcacttc
960

tccagtgtag tattaggcaa tgctgctggc ctaggcataa tgggagagta cagaggtaca
1020

ccgaggaatc aagatctata tgatgcagca aaggcatatg ctgaacaact caaagaaaat
1080

```

ggtgtgatta actacagtgt actagacttg acagcagaag aactagaggc tatcaaacat
1140

cagcttaatc caaaagataa tgatgtagag ctttga
1176

<210> 35
<211> 391
<212> Білок
<213> hRSV штам A2

<400> 35

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
20 25 30

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
35 40 45

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
50 55 60

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
65 70 75 80

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
85 90 95

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
100 105 110

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
115 120 125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
130 135 140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
165 170 175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn
180 185 190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser
195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val
210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
385 390

<210> 36

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> RT-PCR праймер.

<400> 36
gaactcagtg taggtagaat gtttgca
27

<210> 37
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> RT-PCR праймер.

<400> 37
ttcagctatc attttctctg ccaat
25

<210> 38
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> RT-PCR зонд.

<400> 38
tttgaacctg tctgaacatt cccgggt
27

<210> 39
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний промотор.

<400> 39
aaaaattgaa attttatttt ttttttttgg aatataaata
40

<210> 40
<211> 104
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний промотор.

<400> 40
tccaaaccca cccgcttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa tacaataatt
60

aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acgg
104


```

<210> 41
<211> 73
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний промотор.

<400> 41
taaaaattga aaaaatattc taatttatag gacggtttg attttctttt tttctattct
60

ataaataata aat
73

<210> 42
<211> 227
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний промотор.

<400> 42
gttttgaaaa tttttttata ataaatatcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat
60

tgcacgggcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgggcc ggtaaaaatt
120

gaaaaactat tctaatttat tgcacgggcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat
180

tgcacgggcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgg
227

<210> 43
<211> 112
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний промотор.

<400> 43
tacttaaaaa ttgaaaataa atacaaaggt tcttgagggt tgtgttaa at tgaaagcgag
60

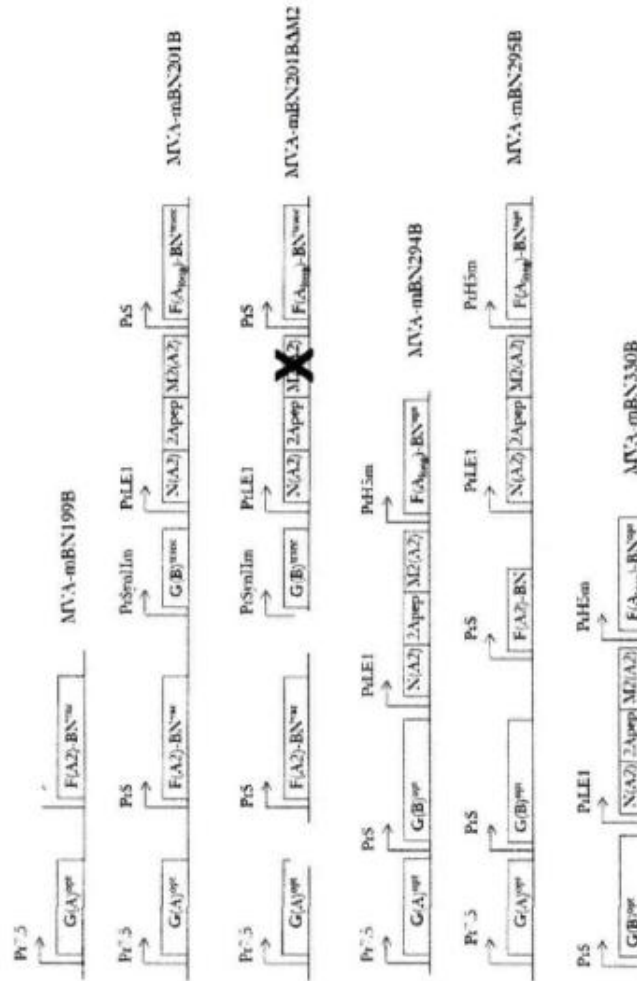
aaataatcat aaataatttc attatcgcca tatccgttaa gtttgtatcg ta
112

```

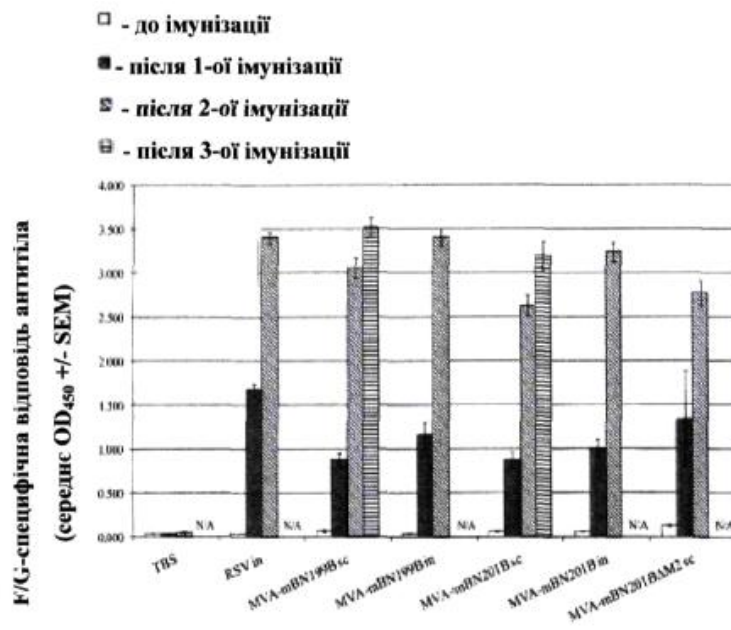
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рекомбінантний модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), який містить:
 - (а) щонайменше одну нуклеотидну послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн F респіраторно-синцитіального вірусу (RSV), де зазначена нуклеотидна послідовність кодує амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 6,
 - 10 б) нуклеотидну послідовність, яка кодує RSV-нуклеокапсидний білок N та один матриксний білок M2 RSV; і
 - с) одну або дві нуклеотидні послідовності, які кодують мембранний глікопротеїн RSV G.

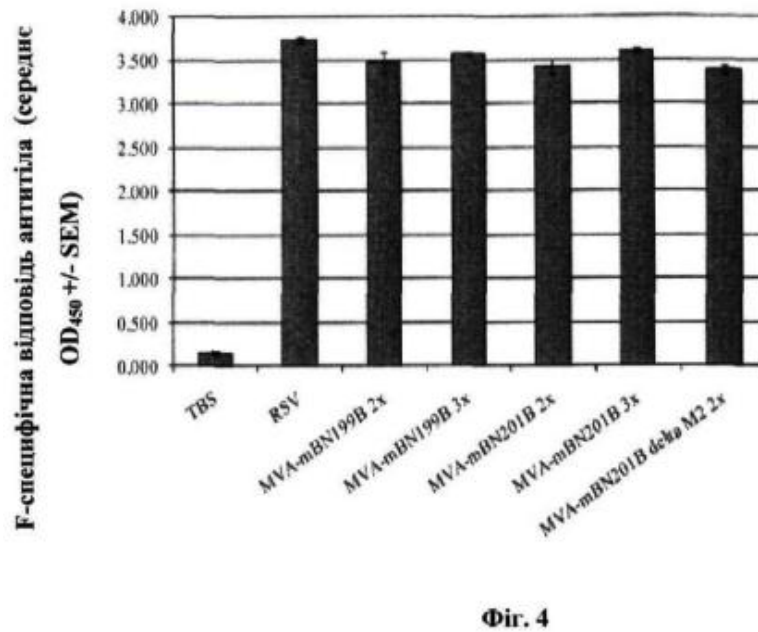
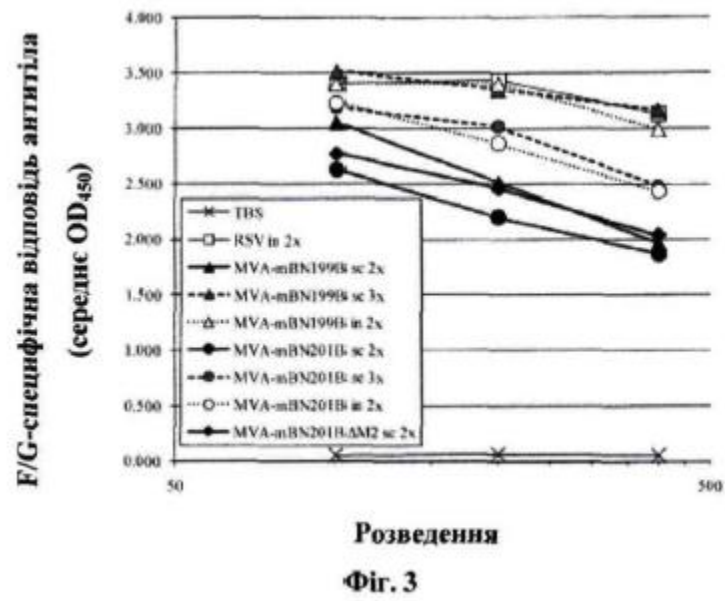
2. Рекombінантний вірус MVA за п. 1, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн F RSV, містить нуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 3, 5 або 15.
3. Рекombінантний вірус MVA за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що як нуклеокапсидний
- 5 білок N RSV, так і матриксний білок M2 RSV кодуються єдиною відкритою рамкою зчитування, розділеною протеазним доменом, що саморозщеплюється.
4. Рекombінантний вірус MVA за п. 3, який **відрізняється** тим, що протеазний домен, що саморозщеплюється, є послідовністю фрагмента протеази 2A з вірусу ящура.
5. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна
- 10 послідовність кодує матриксний білок M2, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність RSV SEQ ID NO: 14 без стартового кодону метіоніну.
6. Рекombінантний вірус MVA за п. 3 або 4, який **відрізняється** тим, що єдина відкрита рамка зчитування містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 та SEQ ID NO: 14 без стартового кодону метіоніну.
- 15 7. Рекombінантний вірус MVA за п. 3 або 4, який **відрізняється** тим, що єдина відкрита рамка зчитування містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18.
8. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 3 або 4, який **відрізняється** тим, що єдина відкрита рамка зчитування містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 17.
- 20 9. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн G RSV, одержана зі штаму A вірусу RSV, переважно зі штаму A2 та/або B.
10. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн G RSV, містить нуклеотидну послідовність,
- 25 яка кодує амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 та SEQ ID NO: 8.
11. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна послідовність, яка кодує мембранний глікопротеїн G вірусу RSV, містить нуклеотидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 1 та SEQ ID NO: 7.
12. Рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-11, утворений на основі MVA-BN, депонованого в Європейській колекції клітинних культур (ECACC) під номером V00083008.
- 30 13. Фармацевтична композиція, яка містить рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-12 та фармацевтично прийнятний носій та/або розчинник.
14. Вакцина, яка містить рекombінантний вірус MVA за будь-яким з пп. 1-12 і фармацевтично прийнятний носій і/або розчинник.
- 35 15. Застосування рекombінантного вірусу MVA за будь-яким з пп. 1-12 для виготовлення фармацевтичної композиції з метою лікування або попередження інфекції вірусу RSV.
16. Застосування рекombінантного вірусу MVA за будь-яким з пп. 1-12 для виготовлення фармацевтичної композиції з метою лікування або попередження інфекції вірусу RSV у суб'єкта шляхом інтраназального або внутрішньом'язового введення.
- 40 17. Застосування рекombінантного вірусу MVA за п. 15 або 16, який **відрізняється** тим, що рекombінантний вірус MVA знаходиться або вводиться в одній або декількох дозах імунологічно наївному або імунологічно компетентному пацієнту-людині.
18. Застосування рекombінантного вірусу MVA за будь-яким з пп. 15-17 для введення пацієнту-людині віком старше 2 років.
- 45 19. Застосування рекombінантного вірусу MVA за будь-яким пп. 15-17 для введення пацієнту-людині віком молодше 2 років.
20. Спосіб лікування або попередження інфекції вірусу RSV у суб'єкта, який включає інтраназальне або внутрішньом'язове введення суб'єкту рекombінантного вірусу MVA за будь-яким з пп. 1-12.

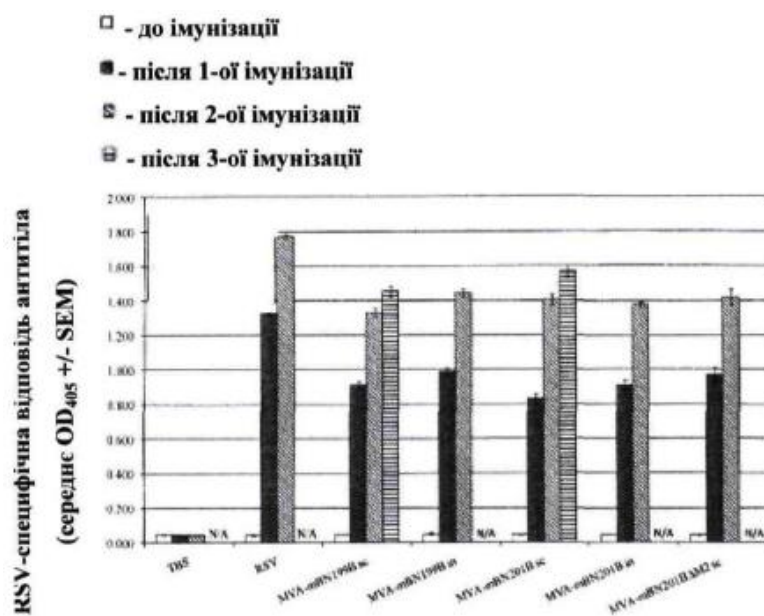


Фиг. 1

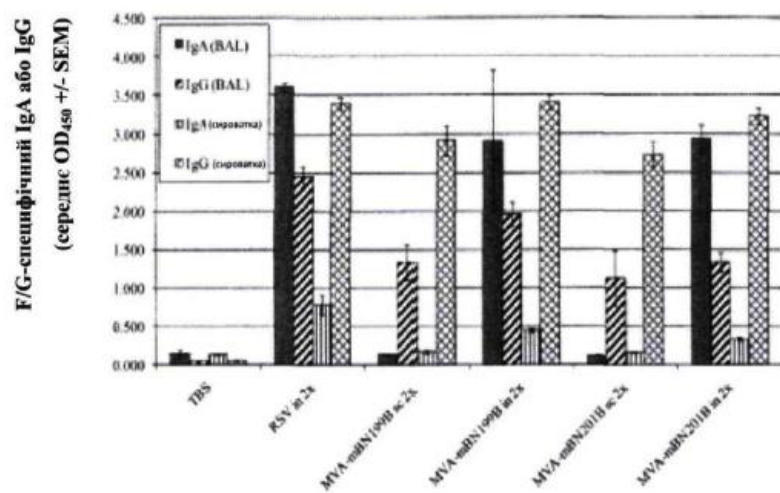


Фиг. 2

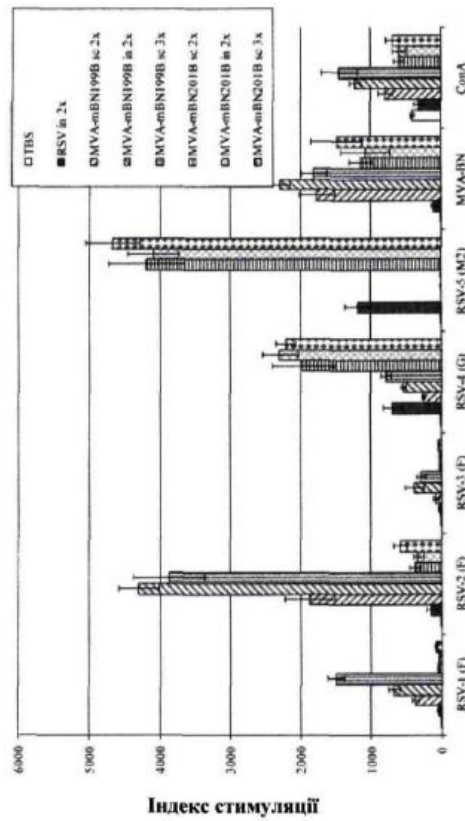




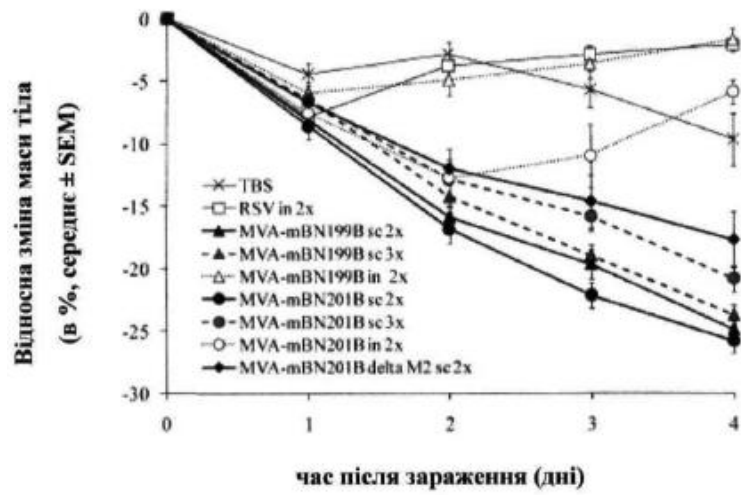
Фиг. 5



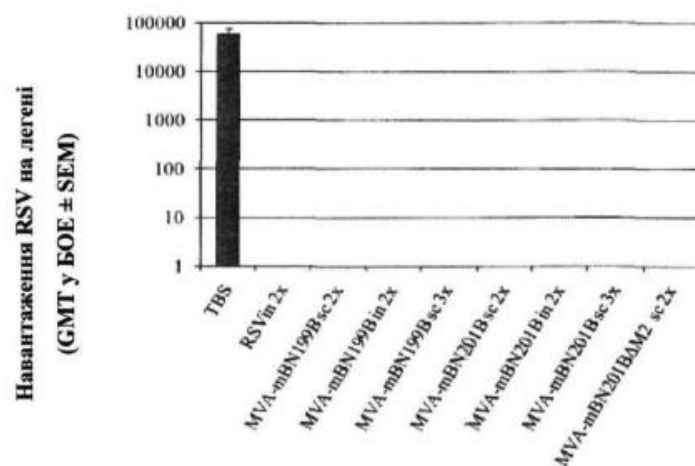
Фиг. 6



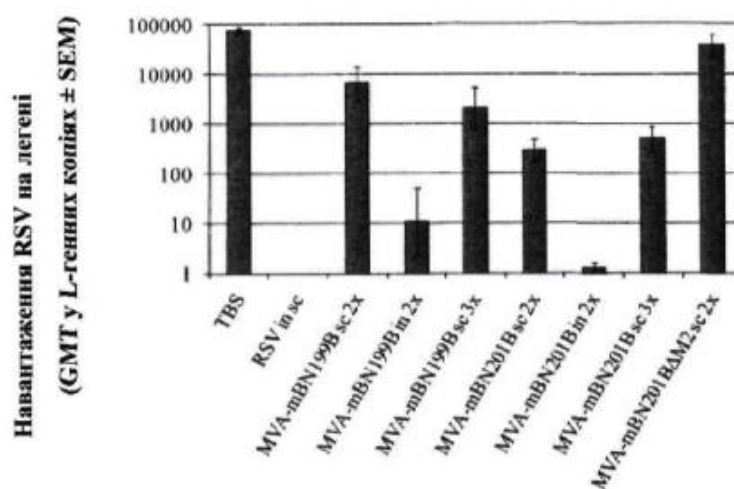
Фіг. 7



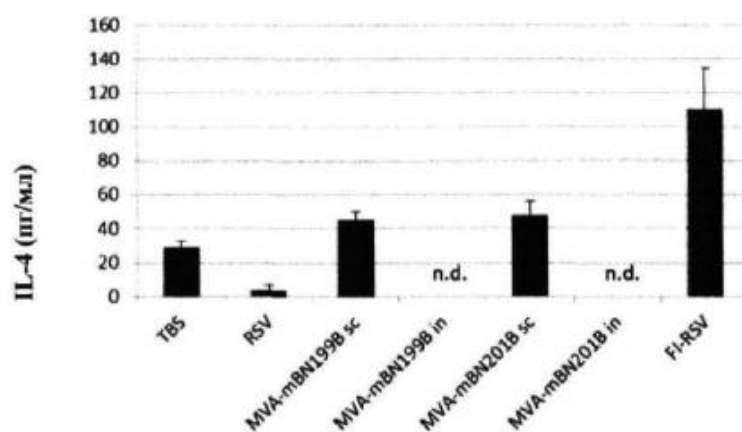
Фіг. 8



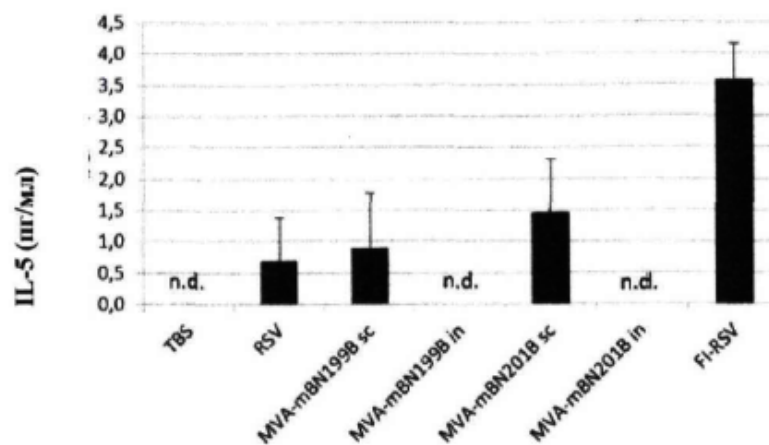
Фиг. 9



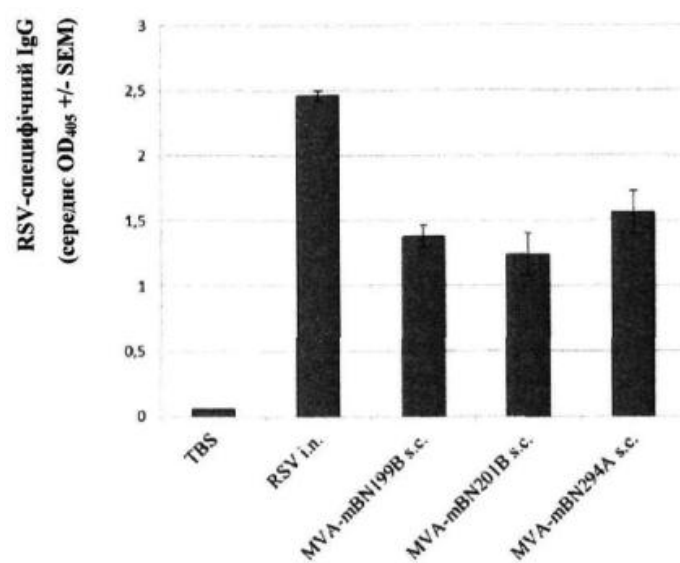
Фиг. 10



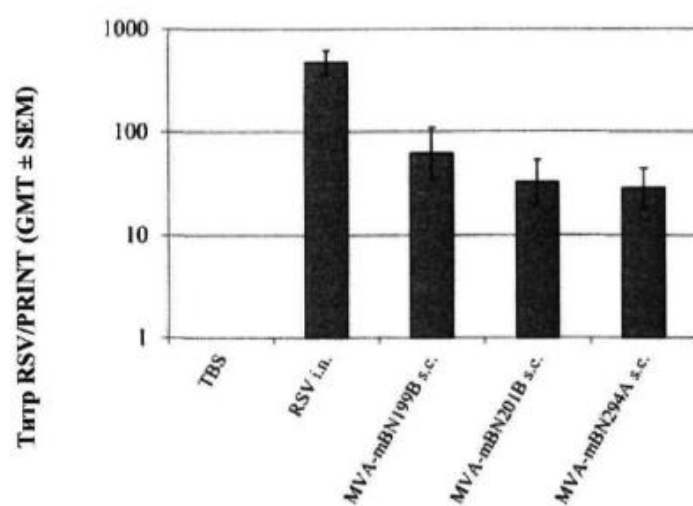
Фиг. 11



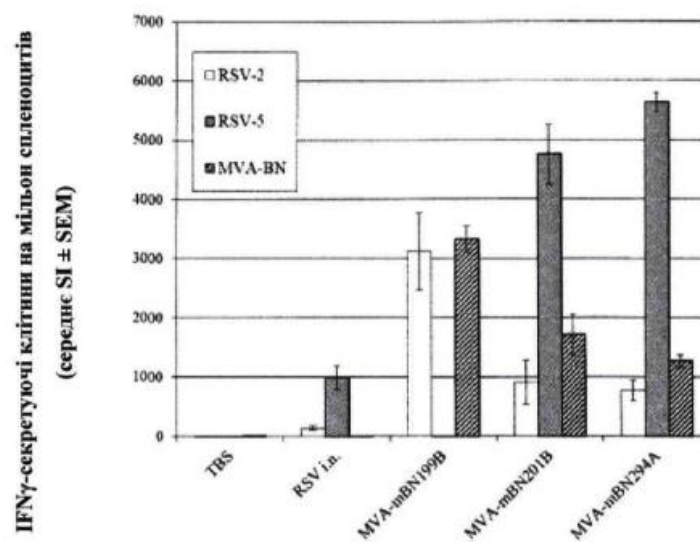
Фиг. 12



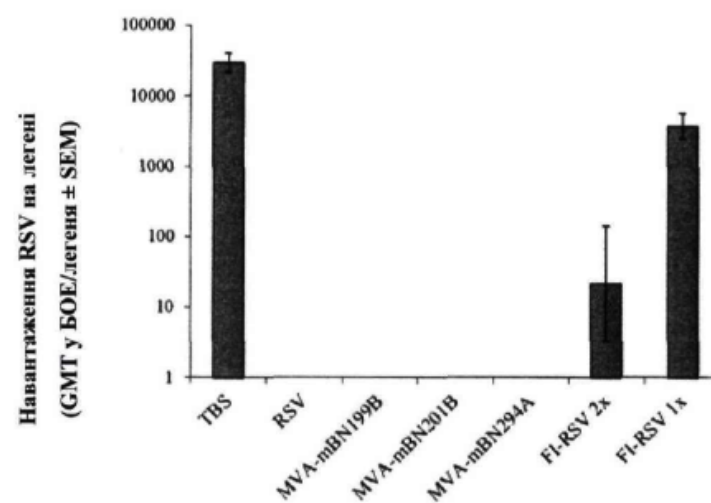
Фиг. 13



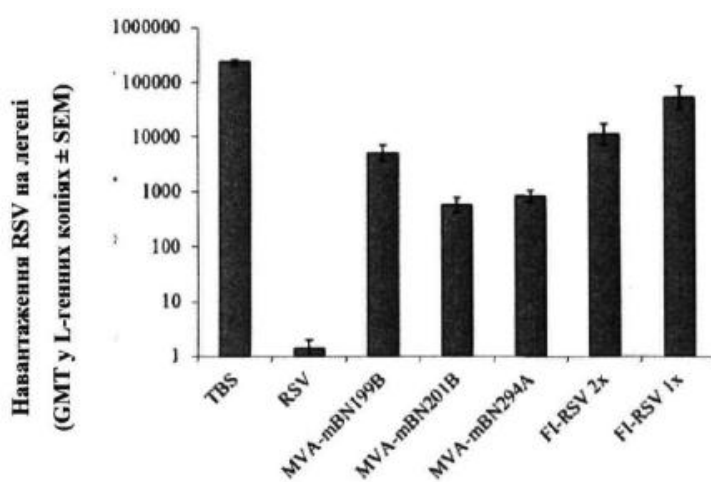
Фиг. 14



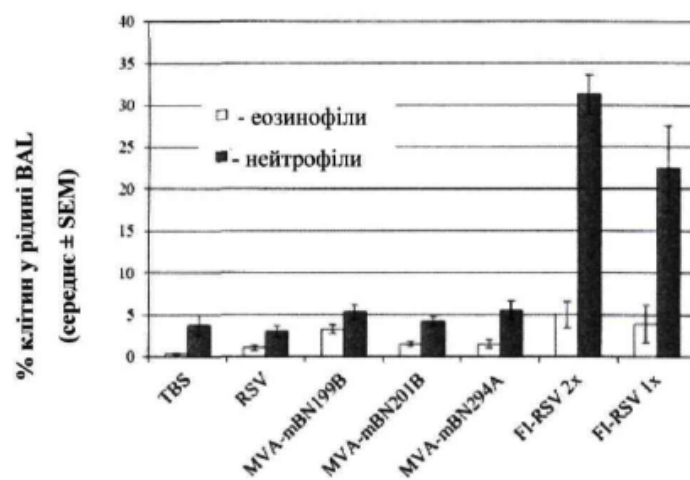
Фіг. 15



Фіг. 16



Фіг. 17



Фіг. 18