



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 114086

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 14534	(72) Винахідник(и):	Ілхей Мартін (AU), Бродер Крістофер С. (US), Хуан Цзинь-ань (AU)
(22) Дата подання заявки:	14.05.2012	(73) Власник(и):	ЗОЕТИС ЕлЕлСі, 235 East 42nd Steet New York, NY 10017, United States of America (US), ГЕНРІ М. ДЖЕКСОН ФАУНДЕЙШН ФОР ДЗЕ ЕДВАНСМЕНТ ОФ МІЛІТАРІ МЕДСІН, ІНК., 6720-a Rockledge Drive, Suite 100, Bethesda, MD 20817, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.04.2017	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/485,992	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2009/0041772 A1, 12.02.2009 US 2002/0081329 A1, 27.06.2002 Mungall BA. «Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine», J Virol., 2006 Dec; 80(24):12293-302 WO 2006/115548 A2, 02.11.2006
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.05.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2014, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2017, Бюл.№ 8		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/037839, 14.05.2012		

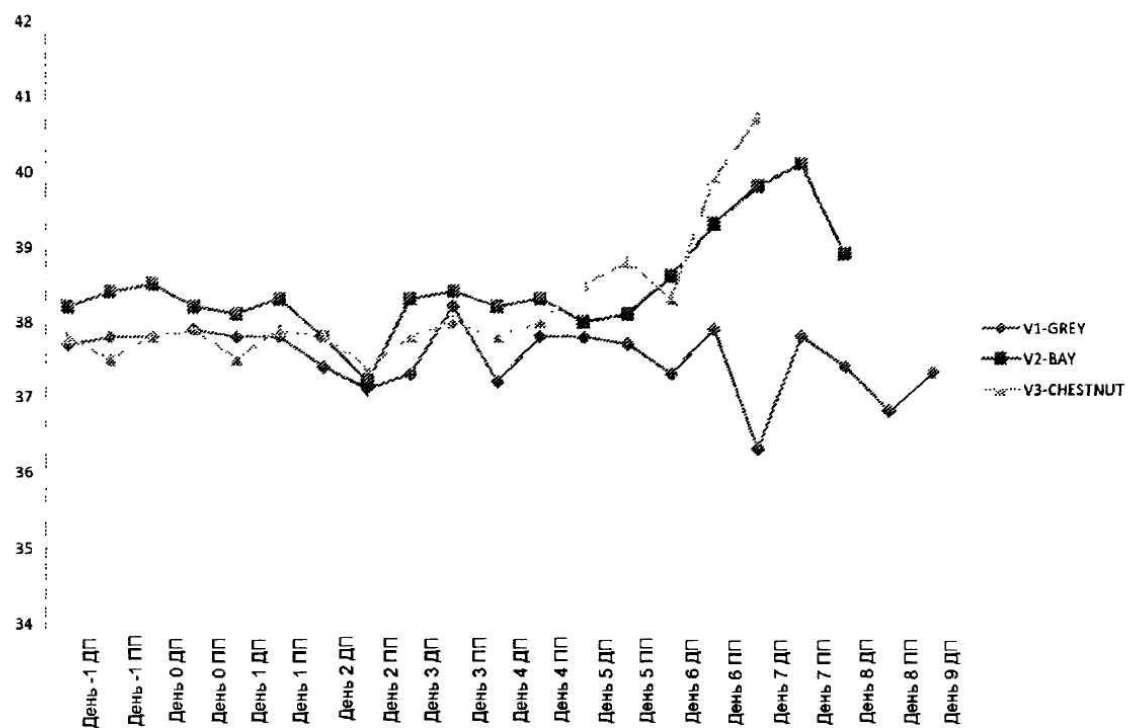
(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСУ HENDRA І/АБО NIPAH

(57) Реферат:

Винахід стосується вакцини, що містить глікопротеїн G вірусу Hendra і/або Nipah у кількості 5-100 мкг/дозу, імуностимулюючий комплекс (ISC), який містить сапонін та стероїд, і один або більше ексципієнтів, у кількості, здатній ефективно викликати імунологічний захист проти вірусів Hendra і/або Nipah після введення суб'єкту, який сприйнятливий до вірусу Hendra і/або Nipah, де вказаний суб'єкт являє собою коня або свиню.

UA 114086 C2

Ректальна температура для V1, V2, V3



Фіг. 1

Опис

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується імуногенних і вакцинних композицій, що містять глікопротеїн G вірусу Hendra (HeV) і/або вірусу Nipah (NiV), і способів їх застосування.

5 Опис відомого рівня техніки

Повторювані спалахи NiV, що приводять до значного числа людських смертей, останнім часом стали проблематичними (див., наприклад, Butler (2000) Nature 429, 7). Відомо також, що HeV приводить до загибелі людей і тварин, і генетично та імунологічно знаходиться у близькій спорідненості з NiV. У наш час відсутня вакцина або терапевтичні засоби для запобігання інфікуванню або захворюванням, що викликаються вірусом Nipah або вірусом Hendra. Як вірус Nipah, так і вірус Hendra, Національним інститутом Алергічних та Інфекційних Захворювань США віднесені до агентів категорії C стосовно біозахисту. Крім того, оскільки вказані віруси є зоонозними агентами 4 рівня біологічної безпеки (BSL-4), виробництво вакцин і/або діагностичних засобів з вказаною безпекою досить дороге і складне. Таким чином, існує необхідність у створенні вакцин і діагностичних засобів, що стосуються вірусу Nipah або вірусу Hendra, які зможуть забезпечити високу продуктивність вакцин і/або діагностичних засобів.

Параміксовіруси, такі як HeV і NiV, містять два основних закріплених на мембрані глікопротеїни в оболонці вірусної частинки. Один глікопротеїн потрібен для прикріплення віріону до рецепторів на клітинах хазяїна і позначається або як гемаглютинин-нейрамідазний білок (HN), або як гемаглютиніновий білок (H), і інший являє собою глікопротеїн (G), який не має ні гемаглютиназної, ні нейрамідазної активності. Глікопротеїни приєднання являють собою мембранні білки II типу, в яких аміно (N) кінець молекул орієнтований у напрямі цитоплазми, і карбокси (C) кінець білків є позаклітинним. Іншим основним глікопротеїном є злитий глікопротеїн (F), який являє собою тривимірний ф'юзогенний оболонковий глікопротеїн класу I, що містить дві ділянки гептадних повторів (HR) і гідрофобний злитий пептид. HeV і NiV інфікують клітини за рахунок рН-незалежного процесу мембранного злиття у сприймаючі клітини хазяїна за рахунок узгодженої дії їх глікопротеїну G і глікопротеїну F після рецепторного зв'язування. Основна функція глікопротеїну G приєднання HeV і NiV полягає в ангажуванні відповідних рецепторів на поверхні клітин хазяїна, які для більшості добре охарактеризованих параміксовірусів є фрагментами сілової кислоти. Глікопротеїни G HeV і NiV використовують рецептори білків ефрину B2 і/або ефрину B3 клітин хазяїна, і були створені антитіла, які блокують приєднання вірусів за рахунок глікопротеїну G (WO2006137931, Bishop (2008) J. Virol. 82: 11398-11409). Крім того, були створені вакцини, які також використовують глікопротеїн G як засіб для вироблення імунозахисної реакції проти HeV і NiV інфекції (WO2009117035).

Доза-сайт реакційна здатність є основною проблемою як у ветеринарії, так і для використання людиною Quil A у препаратах вакцин. Одним зі способів, які дозволяють уникнути вказаної токсичності Quil A, є використання імуностимулюючих комплексів (Rajput (2007) J. Zhejiang Univ. Sci. B, 8: 53-161). Це відбувається, головним чином, тому, що Quil A є менш реакційноздатним при включенні в імуностимулюючі комплекси, оскільки його зв'язок з холестериним у комплексі знижує його здатність витягувати холестерин з клітинних мембран, і, отже, його клітинолітичні ефекти. Крім того, для створення ефекту, аналогічного рівню ад'юванту, потрібна менша кількість Quil A. Імуномодуляторні властивості Quil A сапонінів і додаткові переваги, які можна одержати з вказаних сапонінів, якщо вони включені в імуностимулюючий комплекс, були розкриті у WO2000041720.

Комбінація глікопротеїнів G HeV і/або NiV з імуностимулюючими комплексами в одній вакцині являє собою вдосконалення у розробці ефективних HeV і NiV вакцин, створюючи потенціал для підвищеної імунореактивності при зниженні побічних ефектів ад'ювантів, якщо вказані компоненти вводять у комбінації.

Суть даного винаходу

Даний винахід включає імуногенну композицію, що містить білок G вірусу Hendra і/або Nipah, імуностимулюючий комплекс (ISC) і один або більше ексципієнтів у кількості, ефективній для того, щоб викликати продукування нейтралізуючих антитіл проти вірусу Hendra і/або Nipah після введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення вказана імуногенна композиція містить сапонін, фосфоліпід і стероїд.

У деяких варіантах здійснення розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra складається з амінокислот 73-604 нативного глікопротеїну G Hendra (SEQ ID NO:2). У деяких варіантах здійснення розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra кодується нуклеотидною послідовністю, що включає нуклеотиди 64-1662 у послідовності SEQ ID NO:16. У деяких варіантах здійснення розчинний білок G вірусу Hendra присутній у димерній формі, де кожна розчинна субодиниця димеру глікопротеїну G вірусу Hendra з'єднана одним або більше дисульфідними зв'язками. У

деяких варіантах здійснення розчинний білок G вірусу Hendra присутній у формі тетрамеру. У деяких варіантах здійснення тетрамерна форма представлена у вигляді димеру димерів, нековалентно зв'язаних і/або з'єднаних одним або більше дисульфідними зв'язками. Концентрація розчинного G білка вірусу Hendra може складати від 5 до 100 мкг/мл в імуногенній композиції.

У деяких варіантах здійснення вказаний сапонін виділяють з *Quillaja saponaria* Molina, і може бути вибраний з QH-A, QH-B, QH-C або QS21. У деяких варіантах здійснення вказаний фосфоліпід вибирають з групи, що складається з фосфатидилхоліну (PC), дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC), фосфатидинової кислоти (фосфатидату) (PA), фосфатидилетаноламіну (PE), фосфатидилсерину (PS), фосфатидилінозиту (PI), фосфатидилінозитфосфату (PIP), фосфатидилінозитбісфосфату (PIP2), фосфатидилінозиттрифосфату (PIP3), фосфорилхоліну (SPH), керамідфосфорилетаноламіну (Cer-PE) і керамідфосфорилгліцерину. У деяких варіантах здійснення вказаний сапонін являє собою Quil A, вказаний фосфоліпід являє собою DPPC, стероїд являє собою холестерин і відношення Quil A:DPPC:холестерин у вказаній композиції становить 5:1:1 за масою.

Даний винахід також включає спосіб вироблення у суб'єкта нейтралізуючої реакції антитіл проти вірусів Hendra і/або Nipah, що включає введення вказаному суб'єкту зазначеної імуногенної композиції, що розкривається у даному описі, у кількості і протягом періоду часу, ефективних для вироблення нейтралізуючої реакції антитіл. У деяких варіантах здійснення нейтралізуюча реакція антитіл знижує репродукування вірусів Hendra і/або Nipah у суб'єкта і може також зменшити шедінг Hendra і/або Nipah вірусу у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт був підданий впливу вірусу Hendra і/або Nipah, тоді як в інших варіантах здійснення суб'єкт уражений інфекцією вірусу Hendra і/або Nipah. У деяких варіантах здійснення даний винахід включає спосіб вироблення у суб'єкта нейтралізуючої реакції антитіл проти вірусу Hendra, що включає введення вказаному суб'єкту вказаної імуногенної композиції, що розкривається у даному описі, у кількості і протягом періоду часу, ефективних для вироблення нейтралізуючої реакції антитіл. У деяких варіантах здійснення даний винахід включає спосіб вироблення у суб'єкта нейтралізуючої реакції антитіл проти вірусу Nipah, що включає введення вказаному суб'єкту імуногенної композиції, що розкривається у даному описі, у кількості і протягом періоду часу, ефективних для вироблення нейтралізуючої реакції антитіл.

У деяких варіантах здійснення вказану імуногенну композицію вводять внутрішньом'язово. У деяких варіантах здійснення вказану імуногенну композицію вводять у вигляді множини доз, причому після першої дози другу дозу вводять щонайменше від близько двадцяти одного дня до близько двадцяти восьми днів після першої дози. У деяких варіантах здійснення кожна доза містить близько 50 або близько 100 мкг розчинного білка G вірусу Hendra.

Даний винахід, крім того, включає спосіб диференціації суб'єкта, вакцинованого імуногенною композицією, що розкривається у даному описі, від суб'єкта, який був підданий впливу вірусу Hendra і/або Nipah, що включає детектування присутності антитіл у біологічному зразку, виділеному з суб'єкта, проти щонайменше одного з будь-яких наступних вірусних білків HeV і/або NiV, вибраних з групи, що складається зі злитого білка (F), матричного білка (M), фосфопротейну (P), великого білка (L) і нуклеокапсидного білка (N).

Імуногенну композицію і способи даного винаходу можна застосовувати для суб'єктів, таких як людина, кінь, корова, вівця, свиня, коза, курка, собака або кішка.

Даний винахід також включає спосіб вироблення у людини нейтралізуючої реакції антитіл проти вірусів Hendra і/або Nipah, що включає введення вказаному суб'єкту імуногенної композиції, що містить розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra у кількості і протягом періоду часу, ефективних для вироблення нейтралізуючої реакції антитіл. У деяких варіантах здійснення вказана імуногенна композиція додатково містить ад'ювант.

Опис фігур

На фіг. 1 показана ректальна температура протягом часу для коней, яким вводять розчинний рекомбінантний глікопротеїн (sG) вірусу Hendra у кількості 50 або 100 мкг/доза з доданням як ад'юванту 250 мкг імуностимулюючого комплексу, з подальшим впливом живого вірусу Hendra у день 0.

На фіг. 2 показана частота скорочень серця з плином часу у коней, яким вводять розчинний рекомбінантний глікопротеїн (sG) вірусу Hendra у кількості 50 або 100 мкг/доза з доданням як ад'юванту 250 мкг імуностимулюючого комплексу, з подальшим впливом живого вірусу Hendra у день 0.

На фіг. 3 схематично показане одержання імуностимулюючого комплексу.

На фіг. 4 схематично показана діаграма sGHeV вакцинації і схема зараження NiV. Дати sGHeV вакцинації, NiV зараження і евтаназії вказані стрілками. Зразки крові і мазків відбирають

у дні -42, -7, 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 і 28 після зараження, як вказано (*). Сірий текст відповідає зараженню тимеліном (верхній ряд); чорний текст відповідає вакцинації тимеліном (нижній ряд). Показане число африканських зелених макак (AGM) як суб'єктів для кожної групи дозування вакциною і один контрольний суб'єкт.

На фіг. 5 показана крива виживання інфікованих NiV тварин. Результати для контрольних тварин (n=2) і вакцинованих sGHeV тварин (n=9) використовують для побудови кривої виживання Каплан-Мейєра. Контроль включає результати для однієї додаткової ретроспективної контрольної тварини. Вакциновані тварини одержують 10 мкг, 50 мкг або 100 мкг sGHeV, які двічі вводять підшкірно. Середній час до кінцевої стадії захворювання становить 11 днів для контрольних тварин, тоді як всі вакциновані суб'єкти залишалися живими до евтаназії у кінці дослідження.

На фіг. 6 показаний NiV- і HeV-специфічний імуноглобулін (Ig) у вакцинованих тварин. Сироватку і назальні мазки відбирають у вакцинованих тварин, оцінюють реакції IgG, IgA і IgM, використовуючи sGHeV і sGNiV мультиплексний мікросферний аналіз. Сироватку або мазки від тварин в одній і тій самій групі вакцинної дози (n=3) аналізують індивідуально і розраховують середню інтенсивність флуоресценції мікросфер (M.F.I.), які відкладають на Y-осі. Планки погрешностей являють собою середню стандартну помилку від середнього. Сироватковий sG-специфічний Ig зображений чорним (sGHeV (відкриті трикутники), sGNiV (затушовані трикутники)) і мукозальний sG-специфічний IgA представлений сірими символами (sGHeV (відкриті трикутники), sGNiV (затушовані трикутники)).

Переважний варіант здійснення даного винаходу

Вакцинні та імуногенні композиції

Вакцинна та імуногенна композиція даного винаходу викликає щонайменше одну з числа гуморальних і клітинних імунних реакцій у суб'єкта, якому вводять вказану композицію, або є ефективною для посилення щонайменше однієї імунної реакції проти щонайменше одного штаму HeV і/або NiV, тому їх введення придатне з метою вакцинації і/або запобігання проти HeV і/або NiV інфікування одним або більше штамми HeV і/або NiV. Вказана композиція даного винаходу доставляє суб'єкту, який потребує цього, глікопротеїн G, включаючи розчинні глікопротеїни G з HeV і/або NiV та імуностимулюючий комплекс (ISC), який діє як ад'ювант. У деяких варіантах здійснення кількість глікопротеїну G включає, але без обмежень, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200 або 250 мкг/мл, які також можуть містити 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 або 300 мкг/мл ISC. У деяких варіантах здійснення кількість глікопротеїну G становить 5, 50 або 100 і кількість ISC становить 250 мкг на мл.

А. Білки G HeV і NiV

У деяких варіантах здійснення вказані вакцинні та імуногенні композиції включають один або більше глікопротеїнів G HeV і/або NiV, як розкрито в описі. Термін білок в описі використовують у широкому значенні і він включає поліпептиди або їх фрагменти. Як приклад, але без обмеження, глікопротеїн G HeV може бути у розчинній формі і може включати амінокислоти 73-604 амінокислотної послідовності глікопротеїну G HeV за Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979 (див. також Yu (1998) Virology 251, 227-233). Також як приклад, але без обмеження, глікопротеїн G NiV може бути у розчинній формі і може включати амінокислоти 71-602 амінокислотної послідовності глікопротеїну G NiV за Harcourt (2000) Virology 271: 334-349, 2000 (див. також Chua (2000) Science, 288, 1432-1).

Звичайно розчинні форми глікопротеїнів G HeV і NiV включають весь або частину ектодомену (наприклад, позаклітинну) глікопротеїну G з HeV або NiV, і звичайно їх одержують делецією всього або частини трансмембранного домену глікопротеїну G і всього або частини цитоплазмичного кінцевого сегмента глікопротеїну G. Як приклад, розчинний глікопротеїн G може включати повний ектодомен глікопротеїну G HeV або NiV. Також як приклад, але без обмежень, розчинний глікопротеїн G може включати весь або частину ектодомену і частину трансмембранного домену глікопротеїну G HeV або NiV.

Розчинні глікопротеїни G HeV або NiV даного винаходу, які звичайно зберігають одну або більше з характеристик відповідного нативного вірусного глікопротеїну, таку як здатність взаємодіяти або зв'язуватися з вірусним рецептором клітин хазяїна, можуть бути одержані в олігомерній формі або формах, або здатність викликати продукування антитіл (включаючи, але, не обмежуючись ними, антитіла, що нейтралізують вірус), здатні розпізнавати нативний глікопротеїн G. Приклади додаткових характеристик включають, але не обмежуючись ними, здатність блокувати або запобігати інфікуванню клітин хазяїна. Звичайну методологію можна використовувати для оцінки розчинних глікопротеїнів G HeV або NiV стосовно однієї або більше вказаних характеристик.

Як приклад, але без обмежень, полінуклеотид, що кодує розчинний глікопротеїн G HeV, може включати полінуклеотидну послідовність, що кодує амінокислоти 73-604 амінокислотної послідовності для глікопротеїну G HeV за Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979 (SEQ ID NO:2). Також як приклад, але без обмеження, полінуклеотид, що кодує розчинний глікопротеїн G HeV, може включати нуклеотиди 9129-10727 полінуклеотидної послідовності для глікопротеїну G HeV за Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979. Крім того, також можна використовувати оптимізовану кодоном полінуклеотидну послідовність, що кодує амінокислоти 73-604 амінокислотної послідовності для глікопротеїну G HeV (SEQ ID NO:2). У деяких варіантах здійснення вказані оптимізовані кодоном послідовності включають або складаються з нуклеотидів 64-1662 з SEQ ID NO:16. У наступних варіантах здійснення оптимізовані кодоном послідовності включають або складаються з SEQ ID NO:16, яка включає нуклеотиди, що кодують Igk лідерну послідовність.

Як приклад, але без обмеження, глікопротеїн G NiV може існувати у розчинній формі і включає амінокислоти 71-602 амінокислотної послідовності для глікопротеїну G NiV за Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. Необмежувальні приклади послідовностей, які можна використовувати для конструювання розчинного глікопротеїну G NiV, можна знайти у Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. Як правило, можна використовувати послідовності глікопротеїну G з будь-якого ізоляту або штаму вірусу Nipah для одержання полінуклеотидів і поліпептидів даного винаходу.

Як приклад, але без обмеження, полінуклеотид, що кодує розчинний глікопротеїн G NiV, може включати полінуклеотидну послідовність, що кодує амінокислоти 71-602 амінокислотної послідовності для глікопротеїну G NiV за Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. Також як приклад, але без обмеження, полінуклеотид, що кодує розчинний глікопротеїн G NiV, може включати 234-2042 полінуклеотидної послідовності для глікопротеїну G NiV за Harcourt (2000) Virology 271, 334-349 (SEQ ID NO:4). Крім того, можна також використовувати оптимізовану кодоном полінуклеотидну послідовність, що кодує амінокислоти 71-602 амінокислотної послідовності для глікопротеїну G NiV.

Функціональні еквіваленти вказаних глікопротеїнів G можна використовувати в імуногенних і вакцинних композиціях даного винаходу. Як приклад, але без обмеження, функціонально еквівалентні поліпептиди мають одну або більше наведених далі характеристик: їм властива здатність взаємодіяти або зв'язуватися з вірусним рецептором клітини хазяїна, їх можна одержувати у димерній або тетрамерній формі або формах, їм властива здатність викликати продукування антитіла (включаючи, але не обмежуючись ними, нейтралізуючі віруси HeV і/або NiV антитіла), здатність розпізнавати нативний глікопротеїн G і/або здатність блокувати або запобігати інфікуванню клітини хазяїна.

У деяких варіантах здійснення вказаний глікопротеїн G може бути у димерній і/або тетрамерній формі. Такі димери залежать від утворення дисульфідних зв'язків, що утворюються між цистеїновими залишками у глікопротеїні G. Такі дисульфідні зв'язки можуть відповідати таким, які утворюються у нативному глікопротеїні G (наприклад, положення цистеїнів залишається незмінним), коли експресовані у поверхні HeV або NiV, або можуть бути змінені у присутності або розташуванні (наприклад, за рахунок зміни положення цистеїну(ів) в амінокислотній послідовності) глікопротеїну G, таким чином утворюються відмінні димерна і/або тетрамерна форми глікопротеїну G, які підвищують антигенність. Крім того, недимеризовані і нететрамеризовані форми також включені в обсяг даного винаходу, знову беручи до уваги той факт, що глікопротеїн G присутній у вигляді численних конформаційно-залежних епітопів (тобто таких, що виникають за рахунок третинних тривимірних структур) і що збереження множини таких природних епітопів є особливо переважним, оскільки забезпечує реакцію нейтралізації антитіл.

HeV імуногенні і вакцинні композиції даного винаходу можуть містити білки різної довжини, але включають амінокислотні залишки 73-604 з SEQ ID NO:2. В одному варіанті даного винаходу оболонкові білки даного винаходу щонайменше на близько 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичні глікопротеїну HeV SEQ ID NO:2 (включаючи амінокислоти 73-604). Відповідно, глікопротеїни G HeV даного винаходу включають імуногенні фрагменти нативного глікопротеїну G HeV з достатньою кількістю амінокислот, щоб одержати конформаційні епітопи. Необмежувальні приклади імуногенних фрагментів включають амінокислотні послідовності, які можуть бути довжиною щонайменше 530, 531, 532, 533, 534 або 535, або більше амінокислот. У деяких варіантах здійснення вказаний глікопротеїн G HeV включає або складається з SEQ ID NO:2, або синтетичних конструкцій, що додатково включають Igx лідерну послідовність (SEQ ID NO:15).

Вказані NiV імуногенні і вакцинні композиції даного винаходу можуть містити білки різної довжини, але включають амінокислотні залишки 71-602 з SEQ ID NO:4. В одному варіанті

даного винаходу капсульні білки даного винаходу щонайменше на близько 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичні білкам глікопротеїну NiV SEQ ID NO:4 (включаючи амінокислоти 71-602). Відповідно, вказані глікопротеїни G NiV даного винаходу включають імуногенні фрагменти нативного глікопротеїну G NiV з достатньою кількістю амінокислот, щоб

5 забезпечити одержання конформаційних епітопів. Необмежувальні приклади імуногенних фрагментів включають амінокислотні послідовності, які можуть бути довжиною щонайменше 528, 529, 530, 531, 532 або 533, або більше амінокислот. У деяких варіантах здійснення глікопротеїн G NiV включає або складається з SEQ ID NO:4 або синтетичних конструкцій, що

10 додатково включають лідерну послідовність. Імуногенні фрагменти, як розкрито у даному описі, містять щонайменше один епітоп антигену і проявляють HeV і/або NiV антигенність, і здатні підвищувати імунну реакцію, якщо представлені у придатній конструкції, такій як, наприклад, коли вони злиті з іншими HeV і/або NiV антигенами або представлені на носії, причому імунна реакція направлена проти нативного антигену. В одному варіанті даного винаходу вказані імуногенні фрагменти містять щонайменше

15 20 безперервних амінокислот з HeV і/або NiV антигену, наприклад, щонайменше 50, 75 або 100 безперервних амінокислот з HeV і/або NiV антигену.

Варіанти здійснення глікопротеїну G HeV і NiV крім того включають ізольований поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % ідентичністю нативним глікопротеїнам G HeV або NiV, де

20 вказана поліпептидна послідовність може бути ідентична нативній амінокислотній послідовності глікопротеїну G HeV або NiV, або може включати аж до деякого цілого числа амінокислотних змін у порівнянні з амінокислотною послідовністю нативного HeV або NiV білка G, де вказані зміни вибирають з групи, що складається з щонайменше однієї амінокислотної делеції, заміщення, включаючи консервативне і неконсервативне заміщення, або вставки, і де вказані

25 зміни можуть відбуватися по аміно- або карбокси-кінцевих положеннях порівняльної поліпептидної послідовності, або у будь-якому місці між вказаними кінцевими положеннями, розсіяними украленими або розсіяними індивідуально між амінокислотами у порівняльній послідовності, або в одній або більше безперервних групах всередині амінокислотної послідовності нативного глікопротеїну G HeV або NiV.

30 Рівень ідентичності або гомологічності послідовності по амінокислотній послідовності можна визначити, використовуючи BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) аналіз (програма для виявлення подібності послідовностей білків шляхом їх локального вирівнювання), при використанні алгоритму, що використовується програмами blastp, blastn, blastx, tblastn і tblastx (Altschul (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402 і Karlin (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268), які сконструйовані для пошуку подібності послідовностей. Підхід, який

35 використовується у вказаній BLAST програмі, зводиться спочатку до пошуку аналогічних сегментів, з гемами (не безперервними) і без гепів (безперервних), між послідовністю, що вивчається, і послідовністю з бази даних, потім оцінюють статистичну значущість всіх виявлених збігів і, нарешті, підсумовують тільки ті збіги, які відповідають заздалегідь вибраному

40 порогу значущості. Для обговорення основних проблем пошуку подібності з базою даних послідовностей див. Altschul (1994) Nature Genetics 6, 119-129. Параметри пошуку для гістограм, описів, вирівнювань, припущень (тобто порогу статистичної значущості для інформованих збігів проти послідовностей бази даних), відсічок, матриць і фільтрів (низька комплексність) встановлені за умовчанням. Дефолтна матриця замінів, що використовується blastp, blastx, tblastn і tblastx, являє собою BLOSUM62 матрицю (Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919), рекомендується для послідовностей, що вивчаються, довжиною більше 85 амінокислот.

Вакцинні та імуногенні композиції даного винаходу можуть додатково включати додаткові білки G HeV і/або NiV з різних штамів, які можуть далі потенціювати способи імунізації даного

50 винаходу.

В. Імуностимулюючі комплекси

Як правило, у даному винаході запропоновані імуногенні композиції, включаючи вакцинні композиції, що містять розчинні форми глікопротеїну G HeV і/або NiV оболонкового білка у комбінації з імуностимулюючим комплексом (ISC), і способи застосування вказаних композицій

55 для запобігання і лікування HeV і/або NiV інфекцій у суб'єкта. У даному винаході вакцинні і/або імуногенні композиції включають імуностимулюючий комплекс, який діє як ад'ювант. Як використовується у даному описі, термін "ад'ювант" стосується агентів, які, хоча самі по собі не мають якого-небудь специфічного антигенного ефекту, можуть стимулювати імунну систему, підвищуючи реакцію на антиген.

60 ISC має ряд відмітних ознак, які роблять його ідеальним для деяких застосувань:

Економія антигену: Як відмічено, наприклад, у Wee (2008) *Mucosal Immunol.* 1, 489-496, у ситуаціях, коли доступність антигену обмежена або вартість антигену висока, було показано, що ISC дозволяють здійснювати 10-100 кратну економію антигену. Найбільш вірогідно це пов'язано з комбінацією підвищеної ефективності або більш придатним механізмом дії у порівнянні з іншими ад'ювантами.

Крос-презентація: Як відмічено, наприклад, у Schnurr (2009) *J. Immunol.* 182, 1253-1259, надання антигену клітинами, що представляють антиген (APC), звичайно відбувається за однією з двох схем. Чужий антиген звичайно захоплюється APC, потім процесується і знову експресується на поверхню APC у контексті молекул II класу головного комплексу гістосумісності (MHC). Потім вони здатні до виявлення лімфоцитами і, якщо присутні правильні ко-стимуляторні фактори/сигнали, реагувати на них відповідним чином. Власні або ракові антигени і вірусні антигени звичайно процесуються і експресуються у контексті молекул класу I, оскільки вони присутні у цитоплазмі APC. Ефективний імунітет стосовно ракових і вірусних антигенів вимагає доступу до схеми класу I. Це відбувається природним шляхом у процесі інфікування вірусом або клітинного гомеостазу (клітинна регенерація внутрішніх антигенів). Антигенам (вірусним або власним), введеним у вигляді вакцини, необхідно потрапити із зовнішньої сторони клітини у механізм процесингу антигену вказаної клітини зі схеми класу II у схему класу I. Це може відбуватися природним шляхом у дендритних клітинах (DC-фахівці APC) або цього можна досягти шляхом вакцинації антигенами, змішаними з ISC як ад'ювантом. Вказаний процес знаходження шляху зовні одержаним антигеном у схему презентації антигену класу I називають перехресною презентацією. Точний механізм, за рахунок якого ISC досягає перехресної презентації антигену, повністю не був з'ясований, але може базуватися на порушенні структури мембран ISC компонентів.

Гуморальні і опосередковані клітинами реакції: Як відмічено, наприклад, у Марасковського (2009) *Immunol. Cell Biol.* 87, 371-376, за рахунок механізму дії ISC задіяні як гуморальні, так і клітинні "плечі" адаптивної імунної системи. Для деяких видів це є паралельним профілю цитокінів, стимульованих вакцинацією вказаним ад'ювантом. Імунні реакції типу 1 характеризуються експресією інтерлейкіну-2 і IFN-гамма, і захистом від внутрішньоклітинних патогенів (бактерій, найпростіших і вірусів), і реакції типу 2 характеризуються експресією інтерлейкіну-4 і виробленням нейтралізуючих антитіл для імунітету, пов'язаного з анитоксинами і антипатогенами. ISC забезпечує збалансований профіль для цитокінів між вказаними двома крайнощами, забезпечуючи велику міру свободи імунної реакції. Крім того, у ряді досліджень було показано, що ISC можуть бути ефективними, якщо вакцини вводять інтраназально. Такий спосіб забезпечує сенсibiлізацію поверхонь слизових оболонок і, таким чином, забезпечує відповідний імунітет у сайті введення патогену, особливо для вказаного випадку (захисні властивості слизових оболонок), див. також Sjolander (2001) *Vaccine* 19, 4072-4080.

Критерії стерильного фільтрування і стабільного одержання: Розміри ISC частинок звичайно складають 40 нм у діаметрі, що дозволяє їм проходити через фільтри, які використовують для подальшої стерилізації препаратів у лікарській формі. Крім того, природну тенденцію для тритерпеноїдних сапонінів, як виявлено у Quil A, асоціюватися з холестерином і фосфоліпідами, розглядають як перевагу при розробці способів одержання ISC. Зразки Quil A, які не утворюють ISC частинок, видаляють діалізом з кінцевого продукту. Регулюючи відношення компонентів, однорідний продукт одержують з гетерогенного спектра Quil A сапонінів. Вказане відношення є важливим, оскільки відхилення приводять до структур, які не характеризуються розміром частинок 40 нм (спіралі, листи і т.д.). Характер, що вільно пересипається, ISC колоїду і можливість його вимірювання з використанням трансмісійної електронної мікроскопії, ВЕРХ та інших методів, робить вказаний ад'ювант придатним для розробки оцінок виходів та інших характеристик якості.

Таким чином, на основі викладеного вище, у деяких варіантах здійснення лікарська форма імуностимулюючих комплексів з оптимальною кількістю глікопротеїну G включає молекули сапоніну, фосфоліпіду і стероїду. У деяких варіантах здійснення молярне відношення молекул сапоніну, фосфоліпіду і стероїду складає 5:1:1. Імуностимулюючі комплекси можуть містити, наприклад, 5-10 % мас. сапоніну, 1-5 % молекул стероїду і фосфоліпіду та інше складає глікопротеїн G. Глікопротеїн G можна включати в імуностимулюючі комплекси або безпосередньо, або хімічним поєднанням з білком носія (наприклад, у вигляді гібридного або злитого білка) після включення білка в імуностимулюючі комплекси. У посиленнях на імуностимулюючі комплекси потрібно розуміти, що вони включають посилення на їх похідні, хімічні еквіваленти і аналоги. У деяких варіантах здійснення ISC змішують окремо від глікопротеїнів G HeV і/або NiV, і потім домішують глікопротеїни G, з одержаним ISC. У деяких

варіантах здійснення глікопротеїни G змішують безпосередньо з молекулами сапоніну, фосфоліпиду і стероїду.

У деяких варіантах здійснення вказаний сапонін для використання у даному винаході являє собою Quil A і/або його похідні. Quil A являє собою препарат сапоніну, виділений з Південноамериканського дерева *Quillaja saponaria* Molina, і був вперше описаний як такий, що має ад'ювантну активність Dalsgaard (1974) *Saponine adjuvants*, Archiv. Fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, pp. 243-254. Очищені фрагменти Quil A були виділені за допомогою ВЕРХ, причому цей метод зберігає ад'ювантну активність, але без токсичності, пов'язаної з Quil A (EP 0362278), наприклад, QS7 і QS21 (також відомі як QA7 і QA21). QS21 являє собою природний сапонін, одержаний з кори *Quillaja saponaria* Molina, який індукуює CD8+ цитотоксичні Т клітини (CTL), Th1 клітини і переважно реакцію IgG2a антитіл, і являє собою сапонін для використання у контексті даного винаходу. Інші сапоніни, придатні для використання в ISC, включають, але не обмежуючись ними, QH-A, QH-B і QH-C субфракції Quil A, які одержують з видів, відмінних від *Quillaja saponaria*, такі, які одержані з роду *Rapax* (женьшень), *Astragalus*, *Achyranthes*, соєвих бобів, *Acacia* і *Codonopsis*. У деяких варіантах здійснення вказаний сапонін виділяють з видів, відмінних від *Quillaja saponaria*.

Необмежувальні приклади фосфоліпідів для використання в імуногенних і вакцинних композиціях даного винаходу включають молекули з діацилгліцеридними структурами і фосфоспінголіпідами. Необмежувальні приклади фосфоліпідів з діацилгліцеридними структурами включають фосфатидинову кислоту (фосфатидат) (PA), фосфатидилетаноламін (цефалін) (PE), фосфатидилхолін (лецитин) (PC), дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC) або фосфатидилсерин (PS). Інший необмежувальний приклад фосфоліпідів з діацилгліцеридними структурами включає фосфоінозитиди. Приклади фосфоінозитидів включають, але не обмежуючись ними, фосфатидилінозит (PI), фосфатидилінозитфосфат (PIP), фосфатидилінозитбісфосфат (PIP2) або фосфатидилінозиттрифосфат (PIP3). Необмежувальні приклади фосфоспінголіпідів включають фосфорилхолінцерамід (сфінгомієлін) (SPH), фосфорилетанол-амінцерамід (сфінгомієлін) (Cer-PE) або фосфорилгліцеринцерамід.

Стероїдні молекули для використання в імуногенних і вакцинних композиціях даного винаходу включають молекули, які містять стероїд як частину своєї структури. Необмежувальні приклади стероїдних молекул включають холестерин, прегненолон, 17-альфа-гідроксипрегненолон, дегідроепіандростерон, адростендіол, прогестерон, 17-альфа-гідроксипрогестерон, андростендіон, тестостерон, дигідрокситестостерон, деоксикортикостерон, 11-деоксикортикостерон, кортизол, кортикостерон, альдостерон, естрон, естрадіол або естріол.

У деяких варіантах здійснення імуностимулюючі комплекси являють собою як правило, але не обмежуючись ними, дрібні кейдж-структури діаметром 30-40 нм. У деяких варіантах здійснення утворення імуностимулюючих комплексів вони мають молярне відношення Quil A:холестерин:фосфатидилхолін і глікопротеїн G, що відповідає 5:1:1. Імуностимулюючі комплекси можуть містити, наприклад, 5-10 % мас. Quil A, 1-5 % холестерину і фосфоліпідів, та інше складає глікопротеїн G. Глікопротеїн G може бути включений в імуностимулюючі комплекси або безпосередньо, або шляхом поєднання з білком носія (наприклад, гібридним або злитим білком) після включення білка в імуностимулюючі комплекси. При посиленні на імуностимулюючі комплекси потрібно розуміти, що вони включають також посилення на похідні, хімічні еквіваленти і аналоги. Наприклад, посилення на похідне імуностимулюючого комплексу включає посилення на імуностимулюючий комплекс, в якому один або більше з Quil A, холестерину, фосфатидилхоліну або білка, наприклад, виключений, заміщений, або який-небудь компонент крім Quil A, холестерину, фосфатидилхоліну або білка доданий до комплексу. Функціональний еквівалент імуностимулюючого комплексу може бути імуностимулюючим комплексом, в якому один або більше з його чотирьох компонентів замінений функціональним еквівалентом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу G глікопротеїновий компонент імуностимулюючого комплексу виключений. Такий тип імуностимулюючого комплексу в описі називають імуностимулюючим комплексом, що не містить білка (безбілковим).

У деяких варіантах здійснення даний винахід включає, але без обмежень, імуногенну композицію, що містить виділений білок G HeV або NiV, здатний викликати продукування перехресно-реакційної нейтралізуючої антисироватки проти численних штамів HeV і/або NiV in vitro, і ад'ювант, що включає Quil A, DPPC і холестерин, наприклад, де композиція містить: 5, 50 або 100 мкг розчинного G білка HeV або NiV, і відповідні кількості Quil A, DPPC і холестерину. Додаткові приклади варіантів здійснення імуностимулюючих комплексів і способів їх одержання розкриті в EP 0242380B1 і EP 0180564B1, а також у WO2000041720 (див., наприклад, стор. 3 і 9, посилення на: Cox & Coulter (1992) *Advances in Adjuvant Technology and Application in Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*, Chapter 4, Yong (ed.), CRC Press; Dalsgard (1974)

Gesamte Bipycforsch, 44, 243-254; Australian Patent Specification Nos. 558258, 589915, 590904 & 632067. Див. також репрезентативні протоколи, розкриті у патенті США 6506386, і посилання, що наводяться там на добре відомий факт, що імуностимулюючі комплекси можна використовувати, якщо білковий антиген включений в імуностимулюючий комплекс при його створенні (див. EP 0109942B1), або, альтернативно, надані заздалегідь одержані імуностимулюючі комплекси, які потім змішують з аліквотою антигену, що окремо додається, для створення вакцини (див. EP 0436620B1). Як звичайно потрібно розуміти, білковий антиген може бути також ковалентно приєднаний до імуностимулюючого комплексу (див. знову EP 0180564B1). Як також повинно бути добре зрозуміло фахівцям у даній галузі, імуностимулюючі комплекси можна вводити шляхом вакцинації через слизову оболонку (див. Mowat (1991) Immunology 72, 317-322) і імуностимулюючі комплекси даного винаходу можна далі вдосконалити для вакцинації через слизову оболонку шляхом включення в них націлених на мембрану білків (WO 9730728).

У деяких варіантах здійснення даний винахід включає, але без обмежень, імуногенну композицію, що містить виділений білок G HeV або NiV, здатний індукувати продукування перехресно-реактивної нейтралізуючої антисироватки проти численних штамів HeV і/або NiV in vitro, і ад'ювант, що включає Quil A, DPPC і холестерин, наприклад, де композиція містить: 5, 50 або 100 мкг розчинного G білка HeV або NiV, і відповідні кількості Quil A, DPPC і холестерину. Додаткові приклади варіантів здійснення імуностимулюючих комплексів розкриті у WO 200004720.

У наступному варіанті здійснення даного винаходу вказані вакцинні та імуногенні композиції можуть складати частину фармацевтичної композиції. Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть містити придатні фармацевтично прийнятні носії, що включають ексципієнти і допоміжні речовини, які полегшують переробку активних сполук у лікарські препарати, які можна використовувати фармацевтично для доставки їх у місце дії.

С. Ексципієнти

Імуногенні та вакцинні композиції даного винаходу можуть додатково включати фармацевтично прийнятні носії, ексципієнти і/або стабілізатори (див., наприклад, Remington: The Science and practice of Pharmacy (2005) Lippincott Williams), у формі ліофілізованих лікарських препаратів або водних розчинів. Придатні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у вказаних дозах і концентраціях і можуть включати буфери, такі як фосфат, цитрат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як натрієва сіль ртуть(о-карбоксифеніл)тіо)етилу (тіомерсал), октадецилдиметилбензиламонійхлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид, бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метилпарабен або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідін; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізін; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; протиіони, що утворюють солі, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG), твін або плуронікс.

Композиції даного винаходу можуть бути у дозованій формі, суспендованій у будь-якому придатному фармацевтичному засобі доставки або носії, у достатньому об'ємі, для здійснення дозування. Як правило, кінцевий об'єм, включаючи носії, ад'юванти і т.п., складає щонайменше 1,0 мл. Верхня межа визначається практично кількістю, яку необхідно ввести, звичайно не більше, ніж від близько 0,5 мл до близько 2,0 мл.

Способи застосування

Даний винахід включає способи запобігання і/або лікування вірусної інфекції Hendra і/або Nipah, що включають введення імуногенних і вакцинних композицій даного винаходу будь-якому ссавцю. Активний імунітет, що виробляється шляхом вакцинації глікопротеїном G HeV і/або NiV з ад'ювантами, розкритими у даному описі, може ініціювати або підвищувати клітинну або гуморальну імунну відповідь. Ефективна кількість глікопротеїнів G HeV і/або NiV або їх антигенних фрагментів може бути одержана у суміші з ад'ювантом для одержання вакцини.

Даний винахід включає способи запобігання і/або лікування людей, інфікованих вірусом Hendra і/або Nipah, що включають введення імуногенних і/або вакцинних композицій, які містять розчинний глікопротеїн G HeV і/або NiV або їх комбінації, окремо або у комбінації з щонайменше одним ад'ювантом, придатним для використання у медицині. Ад'юванти, придатні для використання у медицині, можна використовувати окремо або у комбінації. Приклади ад'ювантів, придатних для використання у медицині, включають, але не обмежуючись ними,

солі алюмінію. Приклади солей алюмінію включають, але не обмежуючись ними, гідроксид алюмінію, гель гідроксиду алюмінію (Alhydrogel™), фосфат алюмінію, алюм (калійалюмінійсульфат) або суміші солей алюмінію. Додаткові приклади ад'ювантів, придатних для використання у медицині, включають, але не обмежуючись ними, емульсії типу вода-у-маслі, емульсії типу масло-у-воді і AS04 (комбінацію гідроксиду алюмінію і монофосфорилліпідів А) і CpG олігодезоксинуклеотиди. CpG олігодезоксинуклеотиди являють собою синтетичні олігонуклеотиди, які містять неметильовані CpG динуклеотиди у визначеній послідовності контекстів (CpG фрагменти). Вказані фрагменти CpG присутні у 20-кратному надлишку у бактеріальних ДНК у порівнянні з ДНК ссавців. CpG олігодезоксинуклеотиди розпізнаються Toll-подібним рецептором 9 (TLR9), що приводить до сильних імуностимулюючих ефектів.

Введення вакцини або імуногенної композиції, що містить глікопротеїн G HeV і/або NiV з одним або більше розкритими в описі ад'ювантами, може здійснюватися або з профілактичною, або з терапевтичною метою. В одному аспекті даного винаходу вказану композицію можна використовувати з метою профілактики. Якщо вакцинну композицію вводять профілактично, її вводять до виявлення яких-небудь ознак або симптомів інфікування HeV і/або NiV. Профілактичне введення ефективної кількості сполуки(сполук) служить для запобігання або ослаблення якого-небудь подальшого інфікування HeV і/або NiV.

Якщо вакцину вводять з терапевтичною метою, тоді вказану вакцину вводять в ефективній кількості після визначення симптомів реального інфікування. Вважають, що композиція "фармакологічно прийнятна", якщо її введення переноситься реципієнтом. Таку композицію потрібно вводити у "терапевтично або профілактично ефективній кількості", якщо кількість, що вводиться, є фізіологічно значущою. Вакцинна або імуногенна композиції даного винаходу є фізіологічно значущими, якщо їх присутність приводить до помітних змін у фізіології реципієнта, наприклад, підвищуючи високореакційні гуморальні або клітинні реакції відносно одного або більше зі штамів HeV і/або NiV. Захист, що надається, не повинен бути абсолютним (тобто HeV або NiV інфікування не повинно бути повністю запобігнуте або усунене), за умови, що існує статистично значуще поліпшення у порівнянні з контрольною популяцією. Захист може бути обмежений ослабленням тяжкості захворювання або зменшенням швидкості виникнення симптомів захворювання.

Вакцинна або імуногенна композиція даного винаходу може надавати стійкість до численних штамів HeV і/або NiV. Як використано у даному описі, вакцина призначена для запобігання або ослаблення інфікування, якщо її введення суб'єкту приводить або до повного, або часткового ослаблення (тобто придушення) симптому або стану інфекції, або до вироблення повного або часткового імунітету індивідуума до інфікування.

Щонайменше одну вакцинну або імуногенну композицію даного винаходу можна вводити будь-якими способами, які досягають поставленої мети, використовуючи фармацевтичну композицію, як розкрито у даному описі. Наприклад, вводити таку композицію можна різними парентеральними способами, такими як підшкірне, внутрішньовенне, черезшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне, інтраназальне, трансдермальне, букальне введення. В одному варіанті здійснення даного винаходу вказану композицію вводять підшкірно. Парентеральне введення може бути болюсною ін'єкцією або може здійснюватися введення у вигляді постійної перфузії протягом деякого проміжку часу.

Звичайна схема запобігання, придушення або лікування захворювання або стану, які можна ослабити за рахунок клітинної імунної реакції, викликаной активною специфічною клітинною імунотерапією, включає введення ефективної кількості вакцинної композиції, як вказано вище, здійснюване як окреме введення або як повторне введення у вигляді посилюючих або бустерних доз, протягом проміжку часу аж до і включаючи від одного тижня до близько двадцяти чотирьох місяців. Необмежувальні приклади включають першу дозу з подальшою другою дозою через близько щонайменше 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 або 24 дні після першої дози (день 0). Кількість імуногенної або вакцинної композиції у дозі може бути менше ніж, рівна або більше ніж у першій дозі, введеній у день 0.

Відповідно до даного винаходу, "ефективна кількість" вакцинної або імуногенної композиції є такою, якої досить для досягнення необхідного біологічного ефекту, причому у цьому випадку виникає щонайменше одна з клітинних або гуморальних реакцій на один або більше штамів HeV і/або NiV. Потрібно розуміти, що величина ефективної дози буде залежати від віку, статі, стану здоров'я і маси суб'єкта, типу супутнього лікування, якщо воно проводиться, частоти введення дози і характеру очікуваного ефекту. Інтервали ефективних доз, які наводяться нижче, жодним чином не обмежують даний винахід і являють собою приклади інтервалів доз, які можуть виявитися придатними для введення композицій даного винаходу. Однак, вказані дози

можуть бути підібрані відповідно до конкретного суб'єкта, як легко може бути зрозуміло фахівцям у даній галузі, без якого-небудь експериментування.

Реципієнтами вакцинних та імуногенних композицій даного винаходу можуть бути будь-які суб'єкти, які можуть набуті специфічного імунітету за рахунок клітинної або гуморальної імунної реакції на HeV і/або NiV, де клітинна реакція опосередкована білком MHC класу i або класу ii. Серед ссавців реципієнтами можуть бути ссавці типу приматів, включаючи людей, шимпанзе, приматів і мавп. В одному варіанті здійснення даного винаходу запропонований спосіб лікування людей вакцинними або імуногенними композиціями даного винаходу. Суб'єкти можуть бути інфіковані HeV і/або NiV, або можуть представляти модель HeV або NiV інфікування в експериментальних дослідженнях. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є домашній ссавець, включаючи, але не обмежуючись ними, коня, корову, бика, буйвола, вівцю, свиню (Mingyi (2010) Vet. Res. 41, 33), козу, собаку (Biosecurity Alert-Hendra Virus Update, 27 July 2011, Press Release, Biosecurity Queensland) або кішку. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є домашні птахи, включаючи курку.

Вакцини даного винаходу також забезпечують перехресний імунітет проти інфікування вірусом Nipah, у дозах, які використовують для захисту проти інфікування вірусом Hendra, а також забезпечують ефективну вакцинацію проти вірусу Nipah.

Посилання на ефективну імунну реакцію потрібно розуміти як посилання на імунну відповідь, яка безпосередньо або опосередковано приводить до сприятливого профілактичного або терапевтичного ефекту. У тому випадку, якщо імуноген включає глікопротеїн G HeV або NiV, як розкрито у даному описі, така реакція включає зниження або припинення вірусного репродукування і/або вірусного шедінгу, і/або ослаблення симптомів захворювання у тварини. Потрібно розуміти, що ефективність є функціональною мірою і не визначається тільки посиланням на титри анти-HeV і/або анти-NiV антитіл, оскільки тільки присутність циркулюючих антитіл не є необхідним показником ефективності вказаних циркулюючих антитіл стосовно припинення вірусного репродукування і шедінгу.

Також як приклад, але без обмеження, якщо розчинний G білковий поліпептид даного винаходу вводять для посилення імунної відповіді у суб'єкта, інфікованого або такого, який підозрюється в інфікуванні Hendra або Nipah, і/або якщо антитіла даного винаходу вводять у вигляді пасивної імунотерапії, вказані композиції можуть додатково включати, наприклад, інші терапевтичні засоби (наприклад, противірусні засоби).

Приклад 4 нижче пропонує інформацію про деякі переважні композиції для застосування при вакцинації коней. Що стосується інших тварин, які можуть бути інфіковані вірусом Hendra, і яким тому потрібна вакцинація для захисту як тварин, так і людей від інфікування обома вірусами Hendra і Nipah, звичайно застосовна наступна інформація, яка може бути легко адаптована фахівцями у даній галузі. Кажучи загалом, тваринам-компаньйонам (собакам і кішкам) потрібно приблизно 25 мікрограмів антигену Hendra, і може бути сприятливим використання ISC ад'юванту в інтервалі 25-150 мікрограмів, при відношенні 5:1:1 сапоніну, фосфоліпиду і стерину, що входять у переважні ISC композиції, причому можна використовувати будь-який з типів компонентів, як розкрито у даному описі. Для тварин-компаньйонів переважно, щоб кінцева доза складала близько 1 мл. Polygen™ (MVP Technologies), ад'ювант на базі співполімеру, також можна використовувати, переважно у кількості близько 5-15 % (об./об.).

Кажучи загалом, для великих фермерських тварин (овець, корів, свиней і т.д.) застосовні дозові кількості антигену і ад'юванту (і кінцевий об'єм доз), які відрізняються від наведених в описі для коней, тобто, можна використовувати близько 50-100 мікрограмів антигену, і звичайно близько 250 мікрограмів ISC, при кінцевому об'ємі, наприклад, 1-3 мл. Що стосується свиней, то альтернативна і ефективна композиція ад'юванту містить (приблизно для такої ж кількості антигену) суміш ISC та іонного полісахариду, конкретно 100 мг DEAE декстрану і 800 мікрограмів ISC в 1-3 мл кінцевого об'єму дози (знову 5:1:1 Quil A:фосфатидилхолін:холестерин (див. WO 2000/41720)).

Диференціація вакцинованих тварин

Даний винахід також включає способи диференціації здорових вакцинованих тварин від тварин, які були піддані впливу або інфіковані HeV і/або NiV. За час інфікування HeV і NiV експресують додаткові білки, відмінні від глікопротеїну G (G), включаючи злитий білок (F), матриксний білок (M), фосфопротеїн (P), великий білок (L) і нуклеокапсидний білок (N). Вказані додаткові білки мають здатність індукувати у тварин імунні відповіді у формі антитіл, які зв'язуються з вказаними білками, або Т клітинний імунітет. Рівень реакції антитіл на вказані інші білки звичайно можна виміряти, використовуючи аналізи, такі як імуноферментний аналіз (EIA). Імуногенні і вакцинні композиції даного винаходу у деяких варіантах здійснення містять тільки глікопротеїн G як HeV і/або NiV антиген і тому індукують імунні реакції антитіл тільки з

глікопротеїнами G HeV і/або NiV. Тварини, вакциновані розкритими у даному описі імуногенними композиціями, яких потім інфікують HeV або NiV, виробляють бустерну імунну реакцію на глікопротеїн G, але також демонструють презентацію антитіл на деякі інші HeV і NiV білки, відмінні від глікопротеїну G. Таким чином, присутність антитіл до будь-якого зі злитого білка (F), матричного білка (M), фосфопроїну (P), великого білка (L) і нуклеокапсидного білка (N) можна виміряти, використовуючи EIA, для визначення присутності або відсутності антитіл, специфічних до вказаних білків у зразках сироватки. Якщо детектується антитіло до будь-якого з вказаних інших білків (тобто відмінних від глікопротеїну G), це означає, що тварина була піддана впливу HeV і/або NiV. Альтернативно, якщо не детектується антитіло до вказаних інших білків, а детектуються тільки антитіла, що зв'язують білок G, це означає, що тварина була тільки вакцинована.

EIA даного винаходу одночасно і високоспецифічні, і високоселективні при детектуванні і диференціюванні між тваринами, інфікованими HeV і/або NiV та здоровими тваринами, які були вакциновані розкритими у даному описі імуногенними композиціями. У даному винаході можна використовувати різні способи аналізів, включаючи ELISA, як у гомогенному, так і у гетерогенному оточенні. Вказані способи аналізів можна проводити на зразках, таких як кров, сироватка, молоко або будь-які інші рідини організму, що містять антитіла.

У деяких варіантах здійснення антитіла, що використовуються для EIA, можуть унікально конкурувати з антитілами, що виробляються за рахунок вакцинації глікопротеїном G, але не з антитілами, що виробляються у тварин внаслідок інфікування HeV і/або NiV. Це дозволяє не тільки проводити серологічну діагностику HeV і NiV інфікування, але і диференціацію вакцинованих від інфікованих тварин в одному аналізі. Процедура EIA можна проводити на стандартних зразках сироватки крові або на будь-яких рідинах організму або секретах організму, що містять антитіла. У процедурах EIA можна використовувати моноклональні і/або поліклональні антитіла до глікопротеїнів G і будь-яких інших HeV і/або NiV вірусних білків (наприклад, до злитого білка (F), матричного білка (M), фосфопроїну (P), великого білка (L) і нуклеокапсидного білка (N), оскільки такі білки не присутні у вакцинованих здорових тварин, які не були піддані впливу HeV і/або NiV). Вказані EIA можна здійснювати на будь-якій з комерційно доступних стаціонарних або портативних-ручних, напівавтоматичних або роботехнічних автоматизованих ELISA установок з програмним забезпеченням і комп'ютерною обробкою результатів. У деяких варіантах здійснення вказані способи диференціації здорових вакцинованих тварин від тварин, підданих впливу або інфікованих HeV і/або NiV, можна проводити на біологічних зразках, виділених з домашніх ссавців, включаючи, але не обмежуючись ними, коней, корів, овець, свиней, кіз, собак або кішок. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є домашні птахи, включаючи курей. У деяких варіантах здійснення суб'єктом є людина.

Приклади

Наведені нижче приклади ілюструють тільки деякі, але аж ніяк не всі варіанти здійснення даного винаходу, і тому їх не треба розглядати як такі, що обмежують обсяг даного винаходу.

Приклад 1: Конструкції векторів

Вектори конструюють для експресії HeV G або NiV G з видаленням трансмембранним/цитоплазмичним кінцем. Клоновану кДНК повної довжини білка G HeV або NiV ампліфікують, використовуючи ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію) для створення фрагментів з близько 2600 нуклеотидів, що кодують білок G HeV або NiV з видаленням трансмембранним/цитоплазмичним доменом/цитоплазмичним кінцем.

Для ампліфікації HeV G синтезують наведені нижче олігонуклеотидні праймери

sHGS: 5'-GTGACCAACCATGCAAAATTACACGAAACGACTGATAAT-3' (SEQ ID NO:5).

sHGAS: 5-GTTTAAACGTCGACCAATCAACTCTCTGAACATTGGGCAGGTATC-3'. (SEQ ID NO:6).

Для ампліфікації NiV G були синтезовані наведені нижче олігонуклеотидні праймери.

sNGS: 5'-CTCGAGCACCATGCAAAATTACACAAGATCAACAGACAA-3' (SEQ ID NO:7).

sNGAS: 5-CTCGAGTAGCAGCCGGATCAAGCTTATGTACATTGCTCTGGTATC-3'. (SEQ ID NO:8).

Всі ПЛР реакції проводять, використовуючи Accupol ДНК полімеразу (PGS Scientifics Corp) у наступному режимі: спочатку 94 °C протягом 5 хвилин і потім 94 °C протягом 1 хвилини, 56 °C протягом 2 хвилин, 72 °C протягом 4 хвилин; 25 циклів. Вказані праймери створюють продукт ПЛР для sHeV G ORF оточеної Sal 1 сайтами і sNiV G ORF оточеної Xho 1 сайтами. ПЛР продукти очищають на гелі (Qiagen). Після очищення на гелі sHeV G і sNiV G субклонують у TOPO вектор (Invitrogen).

PSeCTag2B (Invitrogen) купують і модифікують таким чином, щоб вони містили S-пептидний маркер або мус-епітопний маркер. Синтезують олігонуклеотиди, що перекриваються, які кодують послідовність для S-пептиду, і переварюють Kpn 1 і EcoR1 виступаючі ("липкі") кінці.

5 SPEPS: 5'-CAAGGAGACCGCTGCTGCTAAGTTCTGAACGCCAGCACATGGATTCT-3' (SEQ ID NO:9).

SPEPAS: 5'-AATTAGAATCCATGTGCTGGCGTTCTGAACCTTAGCAGCAGCGGTCTCCTTGGTAC-3' (SEQ ID NO:10).

Синтезують олігонуклеотиди, що перекриваються, які кодують послідовність для мус-епітопного маркера і переварюють Kpn 1 і EcoR1 виступаючі ("липкі") кінці.

10 MTS: 5'-CGAACAAAAGCTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3' (SEQ ID NO:11).

MTAS: 5'-AATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGCTTTTGTTCGGTAC-3' (SEQ ID NO:12).

15 64 пмоль SPEPS і 64 пмоль SPEPAS змішують і нагрівають до 65 °C протягом 5 хвилин і повільно охолоджують до 50 °C. 64 пмоль MTS і 64 пмоль MTAS змішують і нагрівають до 65 °C протягом 5 хвилин і повільно охолоджують до 50 °C. Дві одержані суміші розбавляють і клонують у Kpn1-EcoR1 переварений pSecTag2B з одержанням модифікованого S-пептидом pSecTag2B або модифікованого мус-епітопом pSecTag2B. Всі конструкції спочатку скринують, використовуючи фрагменти рестрикції, і потім підтверджують секвенуванням.

20 TOPO sG конструкцію переварюють, використовуючи Sal 1, очищають на гелі (Qiagen) і субклонують у рамці у сайт Xho 1 модифікованого S-пептидом pSecTag2B або модифікованого мус-епітопом pSecTag2B. Всі конструкції спочатку скринують, використовуючи фрагменти рестрикції, і потім підтверджують секвенуванням.

Створюють Igk лідер-S-пептид-s HeVG (sG_{S-tag}) і Igk лідер-мус tag-sHeVG (sG_{myc-tag}) конструкції, які потім субклонують у вакцинний шатл вектор pMCO2. Синтезують олігонуклеотид SEQs: 5'- TCGACCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTA-3' (SEQ ID NO:13) і використовують у комбінації з олігонуклеотидом sHGAS для ампліфікації за допомогою ПЛР sG_{S-tag} і sG_{myc-tag}. Всі ПЛР реакції здійснюють, використовуючи Accupol ДНК полімеразу (PGS Scientifics Corp.) у наступному режимі: 94 °C протягом 5 хвилин спочатку і потім 94 °C протягом 1 хвилини, 56 °C протягом 2 хвилин, 72 °C протягом 4 хвилин; 25 циклів. Вказані праймери створюють ПЛР продукти, фланковані Sal 1 сайтами. ПЛР продукти очищають на гелі (Qiagen). Після очищення на гелі sG_{S-tag} і sG_{myc-tag} субклонують у TOPO вектор (Invitrogen). sG S-маркер і sG мус-маркер переварюють за допомогою Sal 1 і субклонують у Sal 1 сайт pMCO2. Всі конструкції спочатку скринують, використовуючи фрагменти рестрикції, і потім підтверджують секвенуванням. Потім створюють оптимізовану кодоном нуклеотидну послідовність для полегшення продукування в еукаріотній клітинній лінії, яка представлена у SEQ ID NO:16.

35 Приклад 2: Одержання розчинного білка G з використанням вакцин

Для одержання білка генетичні конструкції, що містять оптимізовані кодоном послідовності, використовують для створення рекомбінантних поксвірусних векторів (вакцинний вірус, штам WR). Потім одержують рекомбінантний поксвірус, використовуючи стандартні методики, що використовують tk-селекцію і фарбування GUS. Коротко, CV-1 клітини трансфікують, або використовуючи pMCO2 sHeV G злиття або pMCO2 sNiV G злиття, використовуючи кальцій-фосфатний трансфекційний набір (Promega). Одержані моношари потім інфікують вакцинним вірусом штамом дикого типу Western Reserve (WR) при множинності зараження (MOI) 0,05 БУЕ/клітина. Через 2 дні клітинний осад збирають як сирі рекомбінантні вірусні маси. ТК клітини інфікують, використовуючи сирі рекомбінантні вірусні маси у присутності 25 мкг/мл 5-бром-2'-дезоксіуридину (BrdU) (Calbiochem). Через 2 години вірус замінюють, наносячи верхній шар EMEM-10, що містить 1 % агарози (Life Technologies) з низькою температурою плавлення (LMP) і 25 мкг/мл BrdU. Після 2 днів інкубування додають додатково верхній шар EMEM-10, що містить 1 % LMP агарози, 25 мкг/мл BrdU і 0,2 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-індоліл-Р-D-глюкуронової кислоти (X-GLUC) (Clontech). Протягом 24-48 годин стають помітні сині пляшки, які збирають і здійснюють ще два раунди очищення пляшок за рахунок подвійної селекції. Потім одержані рекомбінантні вакцинні віруси vKB16 (sHeV G злиття) і vKB22 (sNiV G злиття) ампліфікують і очищають стандартними способами. Коротко, рекомбінантні вакцинні віруси очищають методом очищення пляшок, ампліфікації клітинних культур, сахарозного пелетування в ультрацентрифузі і титруванням в аналізі пляшок. Експресію sHeV G перевіряють у клітинних лізатах і культуральних супернатантах.

55 Приклад 3: Одержання розчинного G білка з використанням 293F клітин

Генетичні конструкції, що містять оптимізовані кодоном послідовності, використовують для трансформації 293F клітин (Invitrogen) для одержання стабільної клітинної лінії, яка експресує розчинний глікопротеїн G HeV. CHO-S клітини (Invitrogen) також можна використовувати для трансформації і експресії розчинного глікопротеїну G HeV. Трансформовані клітини висівають у

162 см² колби для культури тканин, що містять 35 мл DMEM-10. Клітинам дають можливість прикріпитися і рости при 37 °C і 5-8 % CO₂ протягом декількох днів. Коли клітини досягають конфлюентності, їх розділяють на декілька колб з DMEM-10 зі 150 мкг/мл гігроміцину В (по 30 мл у колбі). Коли клітини досягають 70-80 % конфлюентності, їх двічі промивають 30 мл PBS, потім додають 20 мл 293 SFM II (Invitrogen) і клітини інкубують при 37 °C і 5-8 % CO₂ протягом ночі. На наступний день клітини переносять у колби Ерленмейєра, що містять 200 мл SFM II середовища. Клітинам дають рости при 37 °C і 5-8 % CO₂ при 125 об./хв. протягом 5-6 днів доти, доки вони не починають гинути. У цей час збирають одержаний супернатант.

Середовище з кожної колби Ерленмейєра центрифугують зі швидкістю 3500 об./хв. протягом 30 хвилин. Одержаний супернатант потім переносять у 250 мл центрифугів колби і обертають зі швидкістю 10000 об./хв. протягом однієї години. Одержаний супернатант збирають і додають інгібітор протеази відповідно до рекомендацій виробників разом з Triton X-100 до кінцевої концентрації 0,1 %. Одержаний супернатант потім фільтрують через 0,2 мкм мембранний фільтр з низьким зв'язуванням білка.

HeVsG очищають, використовуючи S-білкову агарозну афінну колонку. 20 мл об'єму шару S-протеїнагарози (Novagen) завантажують у колонку XK 26 (GE Healthcare). Колонку промивають 10× об'ємами шару зв'язувального/промивального буфера (0,15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 і 0,1 % Triton X-100). Одержаний супернатант HeV sG вводять у колонку, підтримуючи швидкість потоку 3 мл/хв. Колонку промивають 10× об'ємами шару (200 мл) зв'язувального/промивального буфера I, потім 6× об'ємами шару (120 мл) промивального буфера, 1× промивального буфера (0,15 M NaCl, і 20 mM Tris-HCl, pH 7,5).

Потім насос вимикають і промивальний буфер зливають доти, доки він не досягає поверхні кульок, і тоді додають 30 мл елюювального буфера (0,2 M лимонна кислота, pH 2). Збирають перші 10 мл прохідного потоку (це все ще повинен бути промивальний буфер) і потім елюювальний буфер інкубують з кульками протягом 10 хвилин. Потім 15 мл елюату збирають у 50 мл стерильну кінчну центрифугувальну ампулу, що містить 25 мл нейтралізуючого буфера (1M Tris, pH 8). pH доводять до нейтрального значення і елювання та інкубування повторюють тричі. Весь нейтралізуючий елюат об'єднують і концентрують до близько 4 мл. Зібрані HeV sG (4 мл) очищають, використовуючи 0,2 мкм мембранний фільтр з низьким зв'язуванням білка (Acrodisc 13 мм шприцьовий фільтр з 0,2 мкм HT Tuffryn мембраною).

Гельфільтрацію можна використовувати для подальшого очищення HeV sG. Після якісного контрольного аналізу і підтвердження чистоти олігомерного статусу, аліквоти HeV sG зібраних фракцій тетрамер+димер, димеру і мономеру зберігають при -80 °C.

Приклад 4: Одержання вакцинного препарату

Схема одержання препарату ISC представлена далі на фіг. 3 і описана нижче.

Стадія 1: Розчин 90 г/л деканоїл-н-метилглюкамід (Mega-10 детергент) одержують у воді для ін'єкцій (WFI). Одержаний розчин нагрівають для забезпечення повного розчинення Mega-10, потім його використовують або негайно на стадії 2, або стерилізують на фільтрі.

Стадія 2: Одержують розчин, що містить 25 г/л холестерину і 25 г/л дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC), розчиняючи вказані компоненти у початковому розчині Mega-10 детергенту. Одержаний розчин нагрівають до розчинення всіх компонентів, потім або використовують негайно на стадії 3, або стерилізують на фільтрі.

Стадія 3: Одержують буферований ізотонічний сольовий розчин, 10 mM фосфатний буфер, pH 6,2±1 (BIS) з WFI і використовують стерилізуючу фільтрацію, якщо не використовують негайно.

Стадія 4: Quil A одержують у BIS до кінцевої концентрації 100 г/л і використовують стерилізуючу фільтрацію, якщо не використовують негайно.

Стадія 5: ISC одержують у реакторі з регульованою температурою при перемішуванні (22-37 °C) шляхом послідовного додавання попередньо нагрітих BIS, холестерин/DPPC у розчині Mega-10 (160 мл/л), і Quil розчину (200 мл/л). Реакційну суміш доводять до потрібного об'єму, додаючи BIS.

Стадія 6: Всю композицію доводять до стану рівноваги при потрібній температурі (цільова 27 °C з прийнятним робочим інтервалом 22-37 °C), потім інкубують протягом 15 хвилин при перемішуванні для полегшення утворення ISC. Розчин ISC або обробляють додатково на стадії 7, або використовують стерилізуючу фільтрацію для проміжного зберігання.

Стадія 7: ISC реакційну суміш промивають, використовуючи діаліз (мембрана: Hydrosart 30 кДа (Sartorius AG Goettingen)) мінімум у 20 об'ємах обмінів проти BIS при контролі температури (цільова 27 °C з прийнятним робочим інтервалом 22-37 °C) для видалення компонентів, що не ввійшли в утворені комплекси.

Стадія 8: Діалізовані ISC концентрують приблизно у два рази шляхом ультрафільтрації, використовуючи ту саму мембрану, яку використовували для діалізу. У фільтраційну систему додають BIS для відновлення початкового об'єму ISC.

Стадія 9: ISC переносять у стерильні контейнери для зберігання, використовуючи стерилізуючу фільтрацію через 0,22 мкм целюлозоацетатний фільтр.

Стадія 10: ISC ад'ювант зберігають при 2-8 °C до реалізації для застосування у вакцинних композиціях.

Імуностимулюючу композицію (250 мкг/мл) потім комбінують з відповідними кількостями розчинного глікопротеїну G HeV (наприклад, 5, 50, 100 мкг/мл) і доводять до об'єму, використовуючи BIS.

Приклад 5: Перший клінічний експеримент на конях

Вакцина 1, що тестується: Розчинний рекомбінантний глікопротеїн вірусу Hendra (sG) у кількості 100 мкг/доза, доповнений ад'ювантом 250 мкг імуностимулюючого комплексу; об'єм доводять до 1 мл/доза при використанні сольового розчину.

Вакцина 2, що тестується: Розчинний рекомбінантний глікопротеїн вірусу Hendra (sG) у кількості 50 мкг/доза, доповнений ад'ювантом 250 мкг імуностимулюючого комплексу; об'єм доводять до 1 мл/доза при використанні сольового розчину.

Вакцина 3, що тестується: Розчинний рекомбінантний глікопротеїн вірусу Hendra (sG) у кількості 5 мкг/доза, доповнений ад'ювантом 250 мкг імуностимулюючого комплексу; об'єм доводять до 1 мл/доза при використанні сольового розчину.

Серологічні дані і результати захисту від зараження коней збирають для двох груп коней, яким вводять вакцини, що містять більш високі рівні антигену (50 мкг/доза і 100 мкг/доза).

Серологія: Кожного з двох коней імунізують двома дозами вакцини (100 мкг sG з ISC) з проміжком у 21 день. Серологічні дослідження зразків, одержаних після примування і до зараження, підтверджують індуковану вакциною серологічну конверсію у HeV (таблиця 1). До зараження рівні нейтралізуючих вірус антитіл були порівнянні з рівнями, які, як було виявлено, є захисними для кішок, підданих впливу в іншому випадку летальної дози близько спорідненого вірусу Nipah. У коня, якому вводили тільки ад'ювант (негативний контроль), не вироблялися антитіла до HeV до зараження вірусом.

Таблиця 1

Кінь No.	Базова лінія	Титр після примування	Титр після зараження
V1	<2	32	1024
V2	<2	32	512
V3 (Контроль)	<2	<2	<2

Відповідно, кожного коня піддають впливу живого HeV у BSL4, що містить допоміжні речовини, через 27 днів після проведення бустерної імунізації. Вірус вводять інтраназально (1×10^6 TCID₅₀) і перорально (1×10^6 TCID₅₀). У момент зараження і протягом подальшого періоду спостереження тотожність контрольного коня не була відома штату, який брав участь у вказаній частині роботи.

Клінічні спостереження за V1: Вказаний кінь залишався клінічно здоровим протягом періоду спостереження після впливу HeV, якщо не брати до уваги, що локалізоване інфікування сайту введення постійного шийного катетера відмічалось на 8 день після зараження. Це не було пов'язано з жодними конституціональними ознаками захворювання. На 9 день після вірусного зараження здійснюють довільну евтаназію коня. Ненормальності при дослідженнях при розтині підтверджують наявність 10 см брижової ліпоми (випадково виявлена) і помірне розширення лімфатичних судин біля вентрального кінця лівої частки застійної легені, що приписують дії барбітурату. Початкове скринування тканин не виявило яких-небудь свідочів ні про патологічні ушкодження, ні про наявність HeV антигену у коней.

Клінічні спостереження за V2: У цього коня з'явився слабкий короточасний нежить на 2 день, на 3 день, але потім кінь залишався в іншому здоровим до того як на 6 день спостерігалось підвищення температури, пов'язане з локалізацією запальної реакції у місці постійного шийного катетера. Катетер видаляють, але ураження продовжує збільшуватися, і кінь стає дуже збудливим, тому на наступний день (7 день) коню вводять пеніцилін тривалої дії. Як температура коня, так і його темперамент повертаються до нормальних значень на 8 день і його довільно піддають евтаназії. Порушення при ретельному дослідженні при розтині обмежуються невеликим розширенням лімфатичних судин біля вентрального кінця правої частки застійної легені, що приписують барбітуратам. У результаті початкового скринування

тканин не було виявлено яких-небудь доказів ні уражень, ні присутності HeV антигену у цього коня; докладне дослідження у даний час завершується.

Клінічні спостереження за V3: У цього коня розвинулися помірні короточасні виділення з носа на 4 день, але потім у всьому іншому він залишався здоровим доти, доки на 6 день не підвищилася температура без ознак локалізації. Частота серцевих скорочень також підвищилася і спостерігалася легке почервоніння шкіри, що супроводжувалося невеликим зневодненням і пригніченим виглядом. Така комбінація ознак є типовою для активного HeV інфікування у лабораторних умовах дослідників. Температура коня і частота серцевих скорочень продовжували підвищуватися протягом наступних 12 годин (фіг.1 і 2), і він був у дещо пригніченому стані, і потім його гуманно піддали евтаназії на 7 день. При дослідженні при розтині було виявлене помірне розширення лімфатичних судин у частках застійної легені, що зачіпає вентральні 8-10 см, що супроводжується плевральним ущільненням і набряком.

При гістологічному дослідженні виявлений легеневий васкуліт з фібриноїдним некрозом стінок судин, набряк інтерлобулярної перегородки і фокальний некротизуючий альвеоліт. Спостерігається інтенсивне відкладення HeV антигену в ендотелії та у кровоносних судинах легені; в оболонках головного мозку; у паренхімі головного мозку; у тригемінальному ганглії; у підщелепних, бронхіальних, пахових і ниркових лімфатичних вузлах; у селезінці; печінці; серці; м'якому піднебінні; надниркових залозах; ниркових клубочках; тонкому і товстому кишечнику; яєчках; у глотці і носових раковинах, а також у зародкових центрах у селезінці та у випадкових серцевих міоцитах. Спинний мозок, кармани евстахієвої труби, сечовий міхур і нюховий центр мозку дали негативний результат. Результати гістологічних та імуногістологічних досліджень відповідають гострому HeV інфікуванню.

Молекулярний аналіз клінічних зразків. Не спостерігається ознак шедингу HeV у жодному з біологічних зразків, одержаних від імунізованих коней V1 і V2 протягом періоду клінічних спостережень. Більш визначено, з глибоких носових мазків або з крові у жоден з днів після впливу не був виділений який-небудь генотип.

Навпаки, у неімунізованого коня V3 вірусний генотип був виявлений у мазках з носа, починаючи з 3 дня після зараження. Зниження значень Ct у подальші дні відбору проб передбачає вірусну реплікацію у верхній частині дихального шляху і узгоджується з більш ранніми лабораторними спостереженнями авторів після впливу на здорових коней HeV Redlands 2008. Виявлення вірусного генотипу у крові безпосередньо перед настанням гарячки і у всіх секретах після, що співпадає з раннім розпізнаванням інших клінічних симптомів, таких як депресія, також узгоджується з більш ранніми спостереженнями.

Таблиця 2

Взяття зразка у день	День взяття зразка									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кінь #V1										
Оральний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Ректальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Назальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Урина	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
EDTA крові	U	U	U	U	U	U	U	U	N/A	41,4
Кінь #V2										
Оральний мазок	U	U	U	U	U	42,0/U	U	U	U	
Ректальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Назальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Урина	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
EDTA крові	U	41,7/U	U	U	U	U	U	N/A	U	

35

Взяття зразка у день	День взяття зразка								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Кінь #V3									
Оральний мазок	U	U	U	U	U	39,9			
Ректальний мазок	U	U	U	U	U	U	U		
Назальний мазок	U	U	40,5						
Урина	U	U	U	U	U	U	42,2/U		
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	41,9/U	
EDTA крові	U	U	U	U	U	40,3			

- Зразки при розтині. TaqMan ПЛР (HeV N-ген) підтверджують реплікацію інфікуючого вірусу у V3 (контроль), що супроводжується поширенням інфікування у численні тканини (таблиця 3).
- 5 Найвищі рівні реплікації, очевидно, спостерігаються у тканинах легенів, селезінки, нирок, міокарда і лімфоїдних тканинах, зв'язаних з верхніми і нижніми дихальними шляхами, як повідомлялося раніше. Не спостерігалось реплікації вірусу у тканинах імунізованих коней (V1 і V2).

Таблиця 3

		Результати HeV, N-ген TagMan	
Тип тканини	Кінь #V1	Кінь #V2	Кінь #V3
Надниркова залоза	U	U	
Сечовий міхур	U	U	39,8/U
Мозок	U	U	39,6/U
CSF	U	U	U
Глотка	U	U	
Серце коня	U	U	
Нирка коня	U	U	
Товстий кишечник	U	U	
Печінка	U	U	
Легені	U	U	
Лімф.-бронхи	U	U	
Лімф.-голова	U	41,2/U	
Лімф.-язик	U	U	
Лімф.-мандибулярний	U	U	
Лімф.-нирки	U	U	
Мозкові оболонки	U	U	
Носова раковина	U	U	
Нерви	U	U	
Нюхова частка	U	U	
Яєчники	41,3/U	U	
Глотка	U	U	
Тонкий кишечник	U	U	
Спинний мозок	U	U	42
Селезінка	U	U	
Тригемінальний ганглії	U	U	
Матка	U	U	
	U=	Негативний	Відсутність ампліфікації

10

- Серологічні дослідження після зараження. У імунізованих коней V1 і V2 відсутнє зростання у титрах після HeV зараження (таблиця 4). Це свідчить про відсутність значної реплікації інфікуючого вірусу у вказаних тварин. У контрольного коня V3 у момент евтаназії на 7 день після зараження не детектуються жодні антитіла. Передбачають, що пройшло недостатньо часу між впливом вірусу і смертю тварини для вироблення детектованої кількості антитіл, і це

15

співпадає з більш ранніми спостереженнями у лабораторії авторів для HeV Redlands інфікування коней.

Таблиця 4

Кінь #	Базова лінія титру	Титр після примування	Титр до зараження	Кінцевий титр
V1	<2	32	1024	128, 128 (день 9)
V2	<2	32	512	128, 256 (день 8)
V3 (контроль)	<2	<2	<2	<2, <2 (день 7)

5 Двоє коней (V1 і V2), які були вакциновані 100 мкг sG+ISC ад'ювантом у режимі "прайм-буст", були сероконвертовані до HeV перед впливом HeV. Один кінь (V3), якому ввели тільки ISC, залишався серонегативним до інфікуючого вірусу.

Після зараження летальною в інших випадках дозою HeV, імунізовані коні залишалися клінічно здоровими протягом періоду спостережень, що перевищував час настання всіх експериментально викликаних випадків HeV у коней. Коней з відсутністю серологічних проявів імунітету (V3) піддавали евтаназії після розвитку клінічних симптомів, що відповідають гострому HeV. Якого-небудь збільшення титру антитіл не спостерігалось після зараження у імунізованих коней, що відповідало відсутності реплікації інфікуючого вірусу у вказаних тварин.

Відсутні свідчення про наявність шедингу у імунізованих коней, що відображено у результатах ПЛР негативного тесту у всіх щоденних клінічних зразках. У неімунізованих контрольних тварин вірусний геном детектувався у мазках з носа, починаючи з 3 дня після впливу вірусу, у крові безпосередньо перед появою нежитю, і у всіх клінічних зразках з моменту появи нежитю. Така схема шедингу співпадає зі схемою, що спостерігається у здорових коней, підданих впливу HeV у ранніх дослідженнях за вказаною схемою.

20 Не виявлено якої-небудь HeV вірусної реплікації у жодних тканинах імунізованих коней, одержаних при дослідженні при розтині, після евтаназії через час, який, як очікувалося, повинен був бути періодом гострого інфікування. Навпаки, HeV геном і антиген були поширені у всіх тканинах контрольного коня таким чином, що відповідає гострому HeV інфікуванню, а також була ідентифікована васкулопатія, типова для HeV інфікування.

25 Приклад 6: Другі клінічні випробування для коней

Кожного з трьох коней імунізують двома дозами вакцини (50 мкг sG з ISC) з проміжком у 21 день. Серологічні дослідження після примування і до зараження підтверджують індуковану вакциною сероконверсію у HeV (таблиця 5). Рівні нейтралізуючих антитіл до зараження вірусом були порівнянні з рівнями, які, як вважають, є захисними для кішок, підданих впливу смертельних в інших випадках доз близько спорідненого вірусу Nipah, для коней, підданих впливу HeV у розкритому у даному описі першому клінічному дослідженні. У коня, якому ввели тільки ад'ювант, не вироблялися антитіла до HeV до вірусного зараження імунізованих коней (результати не представлені).

Таблиця 5

Кінь #	Базова лінія титру	Титр після примування	Титр до зараження
V4	<2	4	256/128
V5	<2	32	2048/>8192
V6	<2	4	512/1024

35

Відповідно, кожного з імунізованих коней піддавали впливу живого HeV у BSL4, що містить допоміжні речовини, через 27 днів після проведення бустерної імунізації. Вірус вводять інтраназально (1×10^6 TCID₅₀) і перорально (1×10^6 TCID₅₀). У цьому дослідженні використовують чотири морських свинки для контролю патогенічності, з очікуванням, що щонайменше одна з них загине від HeV захворювання. Морських свинок піддають впливу 50000 TCID₅₀ HeV внутрішньочеревинною ін'єкцією.

40 Клінічні спостереження за V4: Вказаний кінь залишається клінічно здоровим протягом періоду спостереження після впливу HeV, і температура, і частота серцевих скорочень залишаються у нормальних межах. Коня піддають евтаназії на 8 день після вірусного зараження. При ретельному дослідженні при розтині яких-небудь порушень взагалі не було відмічено. Первинне скринування тканин не виявило яких-небудь ознак ні уражень, ні HeV антигену у вказаного коня; докладне дослідження у даний час завершується.

45

Клінічні спостереження за V5: Цей кінь залишався клінічно здоровим протягом періоду спостережень після впливу HeV, і температура, і частота серцевих скорочень залишалися у нормальних межах (фіг.2). Вказаного коня піддають евтаназії на 7 день після зараження вірусом. Яких-небудь порушень не було виявлено при докладному дослідженні при розтині. Початкове скринування тканин не виявило яких-небудь ознак ні уражень, ні HeV антигену у цього коня; докладне дослідження у даний час завершується.

Клінічні спостереження для V6: Цей кінь залишався клінічно здоровим протягом періоду спостережень після впливу HeV, і температура, і частота серцевих скорочень залишалися у нормальних межах (фіг.2). Вказаного коня піддають евтаназії на 9 день після вірусного зараження. Яких-небудь порушень не було виявлено при докладному дослідженні при розтині. Початкове скринування тканин не виявило яких-небудь ознак ні уражень, ні HeV антигену у цього коня; докладне дослідження у даний час завершується.

Морські свинки: Одна з 4 морських свинок (№ 3) починає втрачати масу на 3 день після HeV зараження. Втрата маси прогресує до 5 дня, коли у тварини проявляються неврологічні симптоми (патологічний нахил голови, тремор) і свинку піддають евтаназії. Порушення при дослідженні при розтині обмежувалися набряком ретроперитонеальних сполучних тканин.

При гістологічному дослідженні виявлено пульмонарний васкуліт, васкуліт периферичних кровоносних судин, оофорит і негнійний енцефаліт, пов'язані з відкладеннями HeV антигенів. Гістологічні та імунологічні дослідження узгоджуються з гострим HeV інфікуванням і підтверджують патогенність вказаного інфікуючого вірусу.

Не існує доказів шедінгу HeV у жодному з біологічних зразків, одержаних від коней V4, V5 або V6, протягом періоду клінічних спостережень, не рахуючи результату для ректального мазка у коня V6 на 3 день, в якому спостерігалася Ct значення (HeV N ген), що дорівнює 36,2, одержане у TaqMan ПЛР, в одній з двох ямок, причому у другій ямці ампліфікація не спостерігалася (таблиця 6). Більш визначено, у жодному з глибоких назальних мазків або у зразках крові не спостерігався геном у жоден з днів після впливу.

Таблиця 6

Результати HeV, N-ген TagMan

Взяття зразка у день	День взяття зразка									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кінь #V4										
Оральний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Ректальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Назальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Урина	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
EDTA крові	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-
Кінь #V5										
Оральний мазок	U	41,9/U	U	U	U	U	U	U		
Ректальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U		
Назальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U		
Урина	U	U	U	U	U	U	U	U		
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	U		
EDTA крові	U	U	U	U	U	U	U	U		
Кінь #V6										
Оральний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Ректальний мазок	U	U	U	36,2/U	U	U	U	U	U	U
Назальний мазок	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Урина	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Екскременти	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
EDTA крові	U	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	U
Кольоровий код:	Негативний			(відсутність ампліфікації)						
	невизначений			(Ct40-45)						

Зразки, відібрані при розтині. У тканинах імунізованих коней V4, V5 або V6 відсутні свідчення вірусної реплікації. У однієї морської свинки (№ 3) був виявлений вірусний генوم у крові (Ct 34,2), мозку, легенях і селезінці на 5 день після зараження, що узгоджується з клінічними, гістологічними та імунологічними даними для гострого HeV інфікування у вказаній тварини (таблиця 7).

Таблиця 7

Результати HeV, N-ген TagMan

Тип тканини	Кінь #V4	Кінь #V5	Кінь #V6	Морська свинка #3
Надниркова залоза	U	U	U	
Сечовий міхур	U	U	U	
Мозок	U	U	U	35,6
CSF	U	U	U	
Глотка	U	U	U	
Серце коня	U	U	U	
Нирка коня	U	U	U	
Товстий кишечник	U	U	U	
Печінка	U	41,4/U	U	
Легені	U	U	U	33
Лімф.-бронхи	U	U	U	
Лімф.-голова	U	U	U	
Лімф.-язик	U	U	U	
Лімф.-мандибулярний	U	U	U	
Лімф.-нирки	N/A	U	U	
Мозкові оболонки	U	U	U	
Носова раковина	U	U	U	
Нерви	U	U	U	
Нюхова частка	U	U	U	
Яєчники	U	U	U	
Глотка	U	U	U	
Тонкий кишечник	U	U	U	
Спинний мозок	U	U	U	
Селезінка	U	U	U	27,1
Тригемінальний ганглії	U	N/A	U	
Матка	U	U	U	
	U=	Негативний	(Відсутність ампліфікації)	
Кольоровий код:		невизначений	(Ct40-45)	

Серологічні дослідження після зараження. У імунізованих коней V4, V5 і V6 не спостерігається збільшення титру після HeV зараження (таблиця 8). Це свідчить про відсутність реплікації інфікуючого вірусу у вказаних тварин.

Таблиця 8

Кінь #	Базова лінія титру	Титр після примування	Титр до зараження	Кінцевий титр
V4	<2	4	256/128	256/32 (день 8)
V5	<2	32	2048/>8192	1024/512 (день 7)
V6	<2	4	512/1024	128/256 (день 9)

Трьох коней (V4, V5 і V6), які були вакциновані 50 мкг sG+ISC ад'ювант у "прайм-буст" режимі, піддають сероконвертуванню до HeV до HeV впливу. Один кінь, якому вводили тільки ISC, залишається серонегативним до інфікуючого вірусу.

Після зараження в інших випадках летальною дозою HeV, імунізовані коні залишалися клінічно здоровими протягом всього періоду спостережень, який перевищував час настання всіх експериментально індукованих випадків зараження коней HeV. Одну морську свинку, використану для контролю патогенічності, піддають евтаназії після розвитку клінічних симптомів, що відповідають гострій інфекції HeV. У імунізованих коней не виявляється якого-небудь збільшення титрів антитіл після зараження, що свідчить про відсутність реплікації інфікуючого вірусу у вказаних тварин.

Відсутні свідоцтва про прояв вірусного шедінгу у імунізованих коней, що відбивається негативними результатами ПЛР тесту у всіх клінічних зразках, які відбираються щодня, за винятком результатів для ректального мазка, взятого на 3 день у коня V6. Вказаний тест повторюють; якщо б аналогічні результати повторилися, єдиним поясненням було б те, що це викликано низьким рівнем залишкового інокулюму. У однієї неімунізованої морської свинки вірусний геном детектувався в основних органах та у крові на 5 день після впливу вірусу.

Відсутні свідоцтва HeV вірусної реплікації у всіх тканинах імунізованих коней, одержаних при розтині, досліджених після евтаназії, протягом проміжку часу, який, як очікувалося, повинен був бути періодом інфікування. Навпаки, HeV геном і антиген були поширені у всіх тканинах сприйнятливої морської свинки таким чином, що відповідає гострому HeV інфікуванню, і у вказаної тварини була також ідентифікована васкулопатія, типова для HeV інфікування.

Приклад 7: Клінічні дослідження на приматах для Nipah вірусу

Статистика. При проведенні досліджень на тваринах, зокрема досліджень на нелюдських приматах, на біобезпечному рівні 4 (BSL-4) зустрічаються серйозні обмеження за числом піддослідних тварин, обсягом біологічних зразків, які можна одержати, і за здатністю проведення незалежних повторних аналізів, що обмежує статистичний аналіз. Відповідно, результати, представлені як середні або середні, розраховані з даних для зразків, що повторюються, зразків, що не повторюються, і планки погрешностей являють собою стандартні відхилення для повторів.

Віруси. NiV-Малазія (код доступу у GenBank No. AF212302) одержують зі спеціальної лінії патогенів Центрів контролю і профілактики захворювань Атланти, Джорджії. NiV розмножують і титрують на Vero клітинах, як описано для HeV у Rockx et al. (2010) J. Virol. 84, 9831.

Композиція вакцини. Використовують три вакцинні композиції sGHeV (10 мкг, 50 мкг або 100 мкг). Одержання і очищення sGHeV здійснюють, як описано раніше у Pallister (2011) Vaccine 29, 5623. Кожна вакцинна композиція також містить Allhydrogel™ (Accurate Chemical & Scientific Corporation) і CpG олігодезоксинуклеотид (ODN) 2006 (Invivogen), що містить повністю фосфоротіолатний основний ланцюг. Вакцинні дози, що містять фіксовану кількість ODN 2006, кількості sGHeV, що варіюють, та іони алюмінію (у масовому відношенні 1:25) одержують таким чином: для дози 100 мкг: 100 мкг sGHeV, 2,5 мг іонів алюмінію і 150 мкг ODN 2006; для дози 50 мкг: 50 мкг sGHeV, 1,25 мг іонів алюмінію і 150 мкг ODN 2006; і для дози 10 мкг: 5 мкг sGHeV, 250 мкг іонів алюмінію і 150 мкг ODN 2006. Для всіх доз, Allhydrogel™ і sGHeV змішують перед тим, як додають ODN 2006. Кожну вакцинну дозу доводять до 1 мл додаванням PBS, і суміші інкубують на карусельній качалці при кімнатній температурі протягом щонайменше двох-трьох годин перед ін'єкціями. Кожний суб'єкт одержує однакову дозу 1 мл для примування і посилення, і всі вакцинні дози вводять шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій.

Тварини. Десять молодих дорослих Африканських зелених макак (African Green Monkeys (AGM)) (*Chlorocebus aethiops*), масою 4-6 кг (Three Springs Scientific Inc.) утримують у клітках індивідуально. Макак анестезують шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій кетаміну (10-15 мг/кг) і вакцинують, використовуючи sGHeV у день -42 (прайм) і день -21 (буст). Трьом тваринам вводять дві дози по 10 мкг (AGM 16, AGM 17, AGM 18), трьом тваринам вводять дві дози по 50 мкг (AGM 13, AGM 14, AGM 15), трьом тваринам вводять дві дози по 100 мкг (AGM 10, AGM 11, AGM 12) і одній тварині (AGM 9) вводять тільки один ад'ювант. У день 0 тварин анестезують і їм інокулюють інтратрахеально 1×10^5 TCID₅₀ (середня інфекційна доза для тканинних культур) NiV у 4 мл мінімального підтримуючого середовища Дульбеко (DMEM) (Sigma-Aldrich). Тварин анестезують для клінічних досліджень, що включають температуру, частоту дихання, радіографію грудей, зразки крові і мазки назальної, оральної і ректальної слизової у дні 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 і 28 після інфікування (p.i.). Контрольну тварину (AGM 9) необхідно гуманно піддати евтаназії на 10 день після інфікування. Всі інші тварини виживають до кінця досліджень і їх піддають евтаназії на 28 день після інфікування. Після розтину різні тканини відбирають для вірологічних і гістологічних досліджень. Зразки тканин включають: кон'юнктиву, мигдалини,

носоглоткову порожнину, назальний слиз, трахею, правий бронх, лівий бронх, верхню правої лівої легені, середню частку правої легені, нижню частку правої легені, верхню частку лівої легені, середню частку лівої легені, нижню частку лівої легені, бронхіальний лімфатичний вузол (LN), серце, печінку, селезінку, нирки, надниркові залози, підшлункову залозу, порожню кишку, поперечну ободову кишку, мозок (фронтальний), мозок (церебелум), стовбур головного мозку, потиличний спинний мозок, гіпофіз, мандибулярні LN, LN слинних залоз, пахові LN, пахові LN, брижові LN, сечовий міхур, яєчки або яєчники, феморальний кістковий мозок. Вакцинацію проводять з BSL-2. Часова схема вакцинації, зараження і відбір біологічних зразків у визначені дні подані на фіг. 4.

Вакцинація і зараження NiV. Раніше автори продемонстрували, що інтратрахеальна інокуляція, AGM з використанням 10^5 TCID₅₀ (середня інфекційна доза для тканинних культур) NiV викликає однаковий летальний кінець (Rockx et al. (2010) J. Virol. 84, 9831). У вказаних дослідженнях відмічався швидкий розвиток клінічного захворювання; клінічні симптоми включають тяжку депресію, респіраторні захворювання, що приводять до гострої респіраторної недостатності, тяжкі неврологічні захворювання і серйозні обмеження рухливості; і час до досягнення критерію доведеної гуманної кінцевої точки для еутаназії складає інтервал від 7 до 12 днів. Подальша задача полягає у визначенні того, чи може вакцинація з використанням sGHeV запобігти NiV інфікуванню і захворюванню у AGM. Дози 10, 50 або 100 мкг sGHeV змішують з галунами і CpG фрагментами, як описано у розділі Способи. Кожну вакцинну композицію вводять підшкірно трьом суб'єктам у день 0 (прайм) і знову у день 21 (буст) і один контрольний суб'єкт (AGM 9) одержує тільки один ад'ювант як прайм і буст у ті самі дні. На 42 день всім тваринам інокулюють інтратрахеально 10^5 TCID₅₀ NiV. Контрольна тварина (AGM 9) демонструє втрату апетиту, серйозні тривалі зміни поведінки (депресію, знижену активність, сутулість), зниження кількості тромбоцитів і поступове підвищення частоти дихання на кінцевій стадії захворювання. Відповідно, у AGM 9 розвивається гострий респіраторний дистрес, і тварину доводиться гуманно піддати еутаназії на 10 день після інфікування. Навпаки, у жодної з вакцинованих тварин не з'явилися ознаки клінічного захворювання, і всі вони вижили до кінця досліджень. Графік виживання Каплан-Мейєра поданий на фіг. 5.

NiV-опосередковане захворювання у контрольної тварини. Значні патологічні зміни у контрольної тварини узгоджуються з тими змінами, які були виявлені раніше у NiV-інфікованих AGM (Geisbert et al. (2010) PLoS one 5, e10690). Спостерігаються спленомегалія і закупорення кровоносних судин на поверхні мозку, і всі частки легенів були вологими і важкими. РНК NiV та інфекційний вірус не були виділені зі зразків крові AGM 9, і не було виявлено віремії. AGM 9 містила значні рівні NiV-специфічних IgM і NiV-специфічних IgG і IgA, що детектуються. Подальший аналіз зразків тканин виявив повсюдний NiV тропізм до тканини, подібний до широко поширеного NiV інфікування, що спостерігалось раніше у AGM (Geisbert et al. (2010) PLoS One 5, e10690). AGM 9, як показано, містить РНК NiV у більшості тканин, і інфекційний вірус був виділений з численних тканин. Значні патологічні підтвердження включають інтерстиціальну пневмонію, підгострий енцефаліт і некроз, і крововиливи білої пульпи селезінки. Альвеолярні простори заповнені набряковою рідиною, фібрином, каріоректичними і клітинними уламками і альвеолярними макрофагами. Багатоосередковий енцефаліт характеризується збільшенням простору Вірхова-Робінса за рахунок помірного числа лімфоцитів і меншого числа нейтрофілів. Менше число вказаних запальних клітин простягається у прилеглу паренхіму. Численні нейрони були набряклими і вакуолезованими (дегенерація) або були фрагментовані за рахунок каріолізу (некрозу). Мультифокальні гермінальні центри фолікул у білій пульпі селезінки були знищені за рахунок кровотечі і фібрину, а також невеликим числом нейтрофілів і клітинних та каріорексичних уламків. Одержані результати відповідають некрозу і втраті гермінальних центрів у селезінці. Великі кількості вірусних антигенів, присутніх у стовбуровій області мозку, підкреслює значні ушкодження, які NiV викликає у центральній нервовій системі.

Захист sGHeV-вакцинованих тварин. Всі біологічні зразки, включаючи всі зразки крові, зібрані після зараження, і всі тканини, одержані після аутопсії, були негативними відносно РНК NiV, і інфекційний вірус не був виділений з жодного зі зразків. Після більш ретельного дослідження зрізів тканин від вакцинованих тварин, будова тканин здавалася нормальною, і NiV антиген не був детектований у жодній з тканин при дослідженні за допомогою імуногістохімічних методів. Для подальшого розкриття механізмів захисту, що викликаються вакциною, сироваткові і мукозальні і sGNiV-, і sGHeV-специфічні IgM, IgG і IgA, а також NiV і HeV титри нейтралізації сироватки, вимірюють у вакцинованих тварин. Як продемонстровано на фіг.6, за сім днів до зараження суб'єкти, яким ввели найменшу дозу sGHeV, мали такий, що детектується, антиген-специфічний сироватковий IgM і найвищий рівень sGHeV-специфічного сироваткового IgG. Суб'єкти, яким вводили 50 мкг sGHeV, також мали такі, що детектуються,

рівні сироваткового IgM і найвищі рівні сироваткового IgG за сім днів до зараження. Суб'єкти з високою дозою не мали таких, що детектуються, рівнів сироваткового IgM, і рівні сироваткового IgG були значно нижчі на 7 день у порівнянні з іншими двома групами. До дня NiV зараження рівні сироваткового IgG у тварин, яким вводили високі дози, мали підвищені рівні, і всі вакциновані суб'єкти мали аналогічні рівні IgG. Рівні сироваткових IgM не змінилися у жодної з тварин після NiV зараження. Рівні сироваткового IgG знижені у тварин з середньою дозою у день NiV зараження, і рівні IgG знижені у тварин, яким вводили низькі дози після NiV зараження. Цікаво, що рівні IgG підвищені у обох вказаних груп до дня 3 і дня 5 після інфікування, але ніколи не пригнічені рівні IgG, присутні за сім днів до зараження, і у обох груп титр помітно знижується до 28 дня після інфікування.

Навпаки, рівні сироваткового IgG у групи з високою дозою залишаються високими і були найвищими на 28 день після інфікування. Антиген-специфічні сироваткові IgA детектували у всіх тварин після вакцинації; однак, рівні були дуже низькими, і рівні до і після зараження, очевидно, помітно не відрізнялися (фіг. 6). Мінімальне підвищення мукозальних антиген-специфічних IgA детектували у назальних мазках у тварин з низькою дозою на 14 день після зараження. Однак, вказані рівні виявилися такими низькими, що вказані мукозальні антитіла, очевидно, не грають якої-небудь ролі у запобіганні поширенню NiV після зараження. Результати тестів з нейтралізації сироватки (SNT) представлені у таблиці 9. Для всіх вакцинованих суб'єктів титри HeV-специфічної нейтралізації залишаються тими самими або знижуються до 28 дня після зараження, і титри NiV-специфічної нейтралізації помітно не змінюються до 7 дня після зараження, навіть у тварин, які мали найнижчі титри до зараження. Один суб'єкт з низькою дозою і один суб'єкт з високою дозою мали логарифмічне підвищення NiV SNT титру до 14 дня після зараження, і один суб'єкт з середньою дозою має логарифмічне підвищення NiV SNT до 21 дня після зараження. Для всіх інших вакцинованих тварин зміни у титрах SNT були або невизначеними (титр підвищується і потім знижується), або незначними (титр підвищується у 3-4 рази, але не більше, ніж log). І нарешті, у вакцинованих тварин сероконверсію в оболонковий глікопротеїн NiV злиття (F) вимірюють після NiV зараження. Мінімальні рівні сироваткового анти-NiV-F IgM детектують у тварин з низькою і середньою дозами у день 10 і день 21 після зараження, відповідно, і вказані низькі M.F.I. значення передбачають слабку початкову реакцію антитіл після NiV зараження. Сироватковий анти-NiV-F IgM не детектується у тварин з високою дозою, що передбачає, що у вказаних тварин мало або взагалі немає циркулюючих вірусів після зараження.

Таблиця 9

	День ²	-42	-7	7	14	28	-42	-7	7	14	28
sG _{HeV} ДОЗИ	AGM	HeV	NiV								
0 мкг ³	9	<20	<20	24	*	*	<20	<20	<20	*	*
10 мкг	16	<20	>2560	>2560	>2560	1074	<20	379	226	>2560	2147
	17	<20	>2560	>2560	905	537	<20	134	134	537	453
	18	<20	>2560	>2560	453	537	<20	189	134	189	453
50 мкг	13	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	379	189	189	453
	14	<20	1514	>2560	>2560	537	<20	28	47	226	134
	15	<20	2147	757	>2560	905	<20	67	95	757	1074
100 мкг	10	<20	>2560	2147	1810	453	<20	67	113	268	453
	11	<20	>2560	>2560	>2560	1514	<20	134	189	905	1514
	12	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	189	226	>2560	1514

Приклад 8: Клінічні дослідження вірусу Hendra у дослідях на приматах

Другі клінічні дослідження проводять з AGM для оцінки вакцинації і зараження вірусом Hendra. Як вакцини використовують ті самі композиції, як описано вище у прикладі 7, але результати також порівнюють з іншою групою, якій вводять sGHeV тільки з Alhydrogel™ як ад'ювантом (ODN 2006 відсутній). Тварин вакцинують у день -21, бустерну ін'єкцію вводять у день 0 і зараження здійснюють у день 21. Якщо не вказано інше, всі умови відповідають умовам, описаним у прикладі 7. Експериментальні результати підсумовані нижче:

Група	Обробка	N	Режим дозування
A	100 мкг/доза вакцини Hendra sG+ад'юванти (150 мкг CpG ODN 2006+119 мкл алгідрогелю)	4	Прайм+1 буст через 3 тижні
B	100 мкг/доза вакцини Hendra sG+ад'ювант (250 мкл алгідрогелю)	4	Прайм+1 буст через 3 тижні
C	Ад'ювант тільки (150 мкг CpG ODN 2006)	1	Прайм+1 буст через 3 тижні
D	Ад'ювант тільки (250 мкл алгідрогелю)	1	Та сама схема, що і для груп A-B
Всього		10	

Результат: Всі тварини (n=4) в обох групах (A і B) пережили зараження вірусом Hendra після того, як їм інтратрахеально було інокульовано 10^5 TCID₅₀ вірусу Hendra. Контрольні тварини загинули на 8 день. У жодної з вакцинованих тварин не спостерігалися ознаки захворювання і вони залишалися здоровими до кінця випробувань.

Інші варіанти і застосування даного винаходу будуть очевидні фахівцям у даній галузі після вивчення представленого опису і практичної частини даного винаходу. Всі цитовані посилання, включаючи всі публікації, патенти і патентні описи США та інших країн, конкретно і повністю включені у даний опис за допомогою посилання. Важливо розуміти, що опис і приклади потрібно розглядати тільки як наведені як приклади, і обсяг, і суть даного винаходу визначаються тільки наведеною нижче формулою винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Elhay, Martin
Broder, Christopher

<120> ІМУНОГЕННІ КОМПОЗИЦІЇ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСІВ HENDRA І NIPAH

<130> 013306-5006

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1815

<212> ДНК

<213> Вірус Hendra

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 1

atg atg gct gat tcc aaa ttg gta agc ctg aac aat aat cta tct ggt 48
Met Met Ala Asp Ser Lys Leu Val Ser Leu Asn Asn Asn Leu Ser Gly

1 5 10 15

aaa atc aag gat caa ggt aaa gtt atc aag aat tat tac ggc aca atg 96
Lys Ile Lys Asp Gln Gly Lys Val Ile Lys Asn Tyr Tyr Gly Thr Met

20 25 30

gac atc aag aaa att aac gat ggg tta tta gat agt aag ata ctt ggg 144
Asp Ile Lys Lys Ile Asn Asp Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Gly

35 40 45

gcg ttt aac aca gtg ata gct ttg ttg gga tca atc atc atc att gtg 192
Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Ile Ile Ile Val

	50	55	60	
	atg aat atc atg ata att caa aat tac acc aga acg act gat aat cag	240		
	Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln			
5	65	70	75	80
	gca cta atc aaa gag tca ctc cag agt gta cag caa caa atc aaa gct	288		
	Ala Leu Ile Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala			
	85	90	95	
10	tta aca gac aaa atc ggg aca gag ata ggc ccc aaa gtc tca cta att	336		
	Leu Thr Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile			
	100	105	110	
15	gac aca tcc agc acc atc aca att cct gct aac ata ggg tta ctg gga	384		
	Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly			
	115	120	125	
	tcc aag ata agt cag tct acc agc agt att aat gag aat gtt aac gat	432		
20	Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp			
	130	135	140	
	aaa tgc aaa ttt act ctt cct cct tta aag att cat gag tgt aat atc	480		
	Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile			
25	145	150	155	160
	tct tgt ccg aat cct ttg cct ttc aga gaa tac cga cca atc tca caa	528		
	Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln			
	165	170	175	
30	ggg gtg agt gat ctt gta gga ctg ccg aac cag atc tgt cta cag aag	576		
	Gly Val Ser Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys			
	180	185	190	
35	aca aca tca aca atc tta aag ccc agg ctg ata tcc tat act cta cca	624		
	Thr Thr Ser Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro			
	195	200	205	
	att aat acc aga gaa ggg gtt tgc atc act gac cca ctt ttg gct gtt	672		
40	Ile Asn Thr Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val			
	210	215	220	
	gat aat ggc ttc ttc gcc tat agc cat ctt gaa aag atc gga tca tgt	720		
	Asp Asn Gly Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys			
45	225	230	235	240
	act aga gga att gca aaa caa agg ata ata ggg gtg ggt gag gta ttg	768		
	Thr Arg Gly Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu			
	245	250	255	
50	gat agg ggt gat aag gtg cca tca atg ttt atg acc aat gtt tgg aca	816		
	Asp Arg Gly Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr			
	260	265	270	
55	cca ccc aat cca agc acc atc cat cat tgc agc tca act tac cat gaa	864		
	Pro Pro Asn Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu			
	275	280	285	
	gat ttt tat tac aca ttg tgc gca gtg tcc cat gtg gga gat cct atc	912		
60	Asp Phe Tyr Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile			

	290	295	300	
	ctt aac agt act tcc tgg aca gag tca ctg tct ctg att cgt ctt gct			960
	Leu Asn Ser Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala			
5	305	310	315	320
	gta aga cca aaa agt gat agt gga gac tac aat cag aaa tac atc gct			1008
	Val Arg Pro Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala			
		325	330	335
10				
	ata act aaa gtt gaa aga ggg aag tac gat aag gtg atg cct tac ggt			1056
	Ile Thr Lys Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly			
		340	345	350
15				
	cca tca ggt atc aag caa ggg gat aca ttg tac ttt ccg gcc gtc ggt			1104
	Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly			
		355	360	365
	ttt ttg cca agg acc gaa ttt caa tat aat gac tct aat tgt ccc ata			1152
20	Phe Leu Pro Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile			
		370	375	380
	att cat tgc aag tac agc aaa gca gaa aac tgt agg ctt tca atg ggt			1200
	Ile His Cys Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly			
25	385	390	395	400
	gtc aac tcc aaa agt cat tat att ttg aga tca gga cta ttg aag tat			1248
	Val Asn Ser Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr			
		405	410	415
30				
	aat cta tct ctt gga gga gac atc ata ctc caa ttt atc gag att gct			1296
	Asn Leu Ser Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala			
		420	425	430
35				
	gac aat aga ttg acc atc ggt tct cct agt aag ata tac aat tcc cta			1344
	Asp Asn Arg Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu			
		435	440	445
	ggt caa ccc gtt ttc tac cag gca tca tat tct tgg gat acg atg att			1392
40	Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile			
		450	455	460
	aaa tta ggc gat gtt gat acc gtt gac cct cta aga gta cag tgg aga			1440
	Lys Leu Gly Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg			
45	465	470	475	480
	aat aac agt gtg att tct aga cct gga cag tca cag tgt cct cga ttt			1488
	Asn Asn Ser Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe			
		485	490	495
50				
	aat gtc tgt ccc gag gta tgc tgg gaa ggg aca tat aat gat gct ttt			1536
	Asn Val Cys Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe			
		500	505	510
55				
	cta ata gac cgg cta aac tgg gtt agt gct ggt gtt tat tta aac agt			1584
	Leu Ile Asp Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser			
		515	520	525
	aac caa act gca gag aac cct gtg ttt gcc gta ttc aag gat aac gag			1632
60	Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu			

530 535 540

atc ctt tac caa gtt cca ctg gct gaa gat gac aca aat gca caa aaa 1680
 Ile Leu Tyr Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys
 5 545 550 555 560

acc atc aca gat tgc ttc ttg ctg gag aat gtc ata tgg tgt ata tca 1728
 Thr Ile Thr Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser
 10 565 570 575

cta gta gaa ata tac gat aca gga gac agt gtg ata agg cca aaa cta 1776
 Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu
 15 580 585 590

ttt gca gtc aag ata cct gcc caa tgt tca gag agt tga 1815
 Phe Ala Val Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 595 600

20 <210> 2
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Bipyc Hendra

25 <400> 2

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

30 Lys Ile Lys Asp Gln Gly Lys Val Ile Lys Asn Tyr Tyr Gly Thr Met
 20 25 30

35 Asp Ile Lys Lys Ile Asn Asp Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Gly
 35 40 45

40 Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Ile Ile Ile Val
 50 55 60

45 Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln
 65 70 75 80

Ala Leu Ile Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala
 85 90 95

50 Leu Thr Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile
 100 105 110

55 Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly
 115 120 125

60 Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp
 130 135 140

5 Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile
 145 150 155 160

 10 Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln
 165 170 175

 15 Gly Val Ser Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys
 180 185 190

 20 Thr Thr Ser Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro
 195 200 205

 25 Ile Asn Thr Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val
 210 215 220

 30 Asp Asn Gly Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys
 225 230 235 240

 35 Thr Arg Gly Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu
 245 250 255

 40 Asp Arg Gly Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr
 260 265 270

 45 Pro Pro Asn Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu
 275 280 285

 50 Asp Phe Tyr Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile
 290 295 300

 55 Leu Asn Ser Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala
 305 310 315 320

 60 Val Arg Pro Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala
 325 330 335

 65 Ile Thr Lys Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly
 340 345 350

 70 Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly
 355 360 365

 75 Phe Leu Pro Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile
 370 375 380

Ile His Cys Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly
 385 390 395 400
 5
 Val Asn Ser Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr
 405 410 415
 10
 Asn Leu Ser Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala
 420 425 430
 15
 Asp Asn Arg Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu
 435 440 445
 20
 Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile
 450 455 460
 25
 Lys Leu Gly Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg
 465 470 475 480
 30
 Asn Asn Ser Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe
 485 490 495
 35
 Asn Val Cys Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe
 500 505 510
 40
 Leu Ile Asp Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser
 515 520 525
 45
 Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu
 530 535 540
 50
 Ile Leu Tyr Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys
 545 550 555 560
 55
 Thr Ile Thr Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser
 565 570 575
 60
 Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu
 580 585 590
 65
 Phe Ala Val Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 595 600
 70
 <210> 3
 <211> 1809

<212> ДНК
<213> Bipyc Nipah

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1809)

<400> 3

10 atg ccg gca gaa aac aag aaa gtt aga ttc gaa aat act act tca gac 48
Met Pro Ala Glu Asn Lys Lys Val Arg Phe Glu Asn Thr Thr Ser Asp
1 5 10 15

15 aaa ggg aaa att cct agt aaa gtt att aag agc tac tac gga acc atg 96
Lys Gly Lys Ile Pro Ser Lys Val Ile Lys Ser Tyr Tyr Gly Thr Met
20 25 30

20 gac att aag aaa ata aat gaa gga tta ttg gac agc aaa ata tta agt 144
Asp Ile Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser
35 40 45

25 gct ttc aac aca gta ata gca ttg ctt gga tct atc gtg atc ata gtg 192
Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val
50 55 60

atg aat ata atg atc atc caa aat tac aca aga tca aca gac aat cag 240
Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln
65 70 75 80

30 gcc gtg atc aaa gat gcg ttg cag ggt atc caa cag cag atc aaa ggg 288
Ala Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly
85 90 95

35 ctt gct gac aaa atc ggc aca gag ata ggg ccc aaa gta tca ctg att 336
Leu Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile
100 105 110

40 gac aca tcc agt acc att act atc cca gct aac att ggg ctg tta ggt 384
Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly
115 120 125

45 tca aag atc agc cag tcg act gca agt ata aat gag aat gtg aat gaa 432
Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu
130 135 140

aaa tgc aaa ttc aca ctg cct ccc ttg aaa atc cac gaa tgt aac att 480
Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile
145 150 155 160

50 tct tgt cct aac cca ctc cct ttt aga gag tat agg cca cag aca gaa 528
Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu
165 170 175

55 ggg gtg agc aat cta gta gga tta cct aat aat att tgc ctg caa aag 576
Gly Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys
180 185 190

60 aca tct aat cag ata ttg aag cca aag ctg att tca tac act tta ccc 624
Thr Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro
195 200 205

gta gtc ggt caa agt ggt acc tgt atc aca gac cca ttg ctg gct atg 672
 Val Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met
 210 215 220

5

gac gag ggc tat ttt gca tat agc cac ctg gaa aga atc gga tca tgt 720
 Asp Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys
 225 230 235 240

10

tca aga ggg gtc tcc aaa caa aga ata ata gga gtt gga gag gta cta 768
 Ser Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu
 245 250 255

15

gac aga ggt gat gaa gtt cct tct tta ttt atg acc aat gtc tgg acc 816
 Asp Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr
 260 265 270

20

cca cca aat cca aac acc gtt tac cac tgt agt gct gta tac aac aat 864
 Pro Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn
 275 280 285

25

gaa ttc tat tat gta ctt tgt gca gtg tca act gtt gga gac cct att 912
 Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile
 290 295 300

30

ctg aat agc acc tac tgg tcc gga tct cta atg atg acc cgt cta gct 960
 Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala
 305 310 315 320

35

gtg aaa ccc aag agt aat ggt ggg ggt tac aat caa cat caa ctt gcc 1008
 Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala
 325 330 335

40

cta cga agt atc gag aaa ggg agg tat gat aaa gtt atg ccg tat gga 1056
 Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly
 340 345 350

45

cct tca ggc atc aaa cag ggt gac acc ctg tat ttt cct gct gta gga 1104
 Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly
 355 360 365

50

ttt ttg gtc agg aca gag ttt aaa tac aat gat tca aat tgt ccc atc 1152
 Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile
 370 375 380

55

acg aag tgt caa tac agt aaa cct gaa aat tgc agg cta tct atg ggg 1200
 Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly
 385 390 395 400

60

att aga cca aac agc cat tat atc ctt cga tct gga cta tta aaa tac 1248
 Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr
 405 410 415

65

aat cta tca gat ggg gag aac ccc aaa gtt gta ttc att gaa ata tct 1296
 Asn Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser
 420 425 430

70

gat caa aga tta tct att gga tct cct agc aaa atc tat gat tct ttg 1344
 Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu
 435 440 445

ggt caa cct gtt ttc tac caa gcg tca ttt tca tgg gat act atg att 1392
 Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile
 450 455 460
 5
 aaa ttt gga gat gtt cta aca gtc aac cct ctg gtt gtc aat tgg cgt 1440
 Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg
 465 470 475 480
 10
 aat aac acg gta ata tca aga ccc ggg caa tca caa tgc cct aga ttc 1488
 Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe
 485 490 495
 15
 aat aca tgt cca gag atc tgc tgg gaa gga gtt tat aat gat gca ttc 1536
 Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe
 500 505 510
 20
 cta att gac aga atc aat tgg ata agc gcg ggt gta ttc ctt gac agc 1584
 Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser
 515 520 525
 25
 aat cag acc gca gaa aat cct gtt ttt act gta ttc aaa gat aat gaa 1632
 Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu
 530 535 540
 30
 ata ctt tat agg gca caa ctg gct tct gag gac acc aat gca caa aaa 1680
 Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys
 545 550 555 560
 35
 aca ata act aat tgt ttt ctc ttg aag aat aag att tgg tgc ata tca 1728
 Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser
 565 570 575
 40
 ttg gtt gag ata tat gac aca gga gac aat gtc ata aga ccc aaa cta 1776
 Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu
 580 585 590
 45
 ttc gcg gtt aag ata cca gag caa tgt aca taa 1809
 Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr
 595 600
 <210> 4
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> Bipyc Nipah
 <400> 4
 50
 Met Pro Ala Glu Asn Lys Lys Val Arg Phe Glu Asn Thr Thr Ser Asp
 1 5 10 15
 55
 Lys Gly Lys Ile Pro Ser Lys Val Ile Lys Ser Tyr Tyr Gly Thr Met
 20 25 30
 60
 Asp Ile Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser
 35 40 45

Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val
50 55 60

5 Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln
65 70 75 80

10 Ala Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly
85 90 95

15 Leu Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile
100 105 110

20 Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly
115 120 125

Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu
130 135 140

25 Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile
145 150 155 160

30 Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu
165 170 175

35 Gly Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys
180 185 190

40 Thr Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro
195 200 205

Val Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met
210 215 220

45 Asp Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys
225 230 235 240

50 Ser Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu
245 250 255

55 Asp Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr
260 265 270

60 Pro Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn
275 280 285

Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile
 290 295 300
 5
 Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala
 305 310 315 320
 10 Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala
 325 330 335
 15 Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly
 340 345 350
 20 Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly
 355 360 365
 Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile
 370 375 380
 25 Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly
 385 390 395 400
 30 Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr
 405 410 415
 35 Asn Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser
 420 425 430
 40 Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu
 435 440 445
 Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile
 450 455 460
 45 Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg
 465 470 475 480
 50 Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe
 485 490 495
 55 Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe
 500 505 510
 60 Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser
 515 520 525

	Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu	
	530 535 540	
5	Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys	
	545 550 555 560	
10	Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser	
	565 570 575	
15	Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu	
	580 585 590	
20	Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr	
	595 600	
	<210> 5	
	<211> 40	
	<212> ДНК	
25	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер	
30	<400> 5	
	gtcgaccacc atgcaaaatt acaccagaac gactgataat	40
35	<210> 6	
	<211> 45	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
40	<223> Праймер	
	<400> 6	
	gtttaaactg cgaccaatca actctctgaa cattgggcag gtatc	45
45	<210> 7	
	<211> 39	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Праймер	
	<400> 7	
55	ctcgagcacc atgcaaaatt acacaagatc aacagacaa	39
60	<210> 8	
	<211> 45	
	<212> ДНК	

	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер	
5	<400> 8 ctcgagtagc agccggatca agcttatgta cattgctctg gtatc	45
10	<210> 9 <211> 46 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
15	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
20	<400> 9 caaggagacc gctgctgcta agttcgaacg ccagcacatg gattct	46
25	<210> 10 <211> 54 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
30	<400> 10 aattagaatc catgtgctgg cgttcgaact tagcagcagc ggtctccttg gtac	54
35	<210> 11 <211> 31 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
45	<400> 11 сгаасааааг сtсatctcag ааgaggatct g	31
50	<210> 12 <211> 39 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
55	<400> 12 aattcagatc ctcttctgag atgagctttt gttcggtac	39
60	<210> 13 <211> 34 <212> ДНК	

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний олігонуклеотид

5 <400> 13
tcgacccacc atggagacag acacactcct gcta 34

10 <210> 14
<211> 1662
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Послідовність вірусу HeV sG

20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1662)

<400> 14
atg gaa acc gac acc ctg ctg ctg tgg gtg ctg ctc ctg tgg gtc ccc 48
25 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

ggc agc aca ggc gac tac acc aga acg act gat aat cag gca cta atc 96
30 Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln Ala Leu Ile
20 25 30

aaa gag tca ctc cag agt gta cag caa caa atc aaa gct tta aca gac 144
Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
35 35 40 45

aaa atc ggg aca gag ata ggc ccc aaa gtc tca cta att gac aca tcc 192
Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Ser Leu Ile Asp Thr Ser
50 55 60

40 agc acc atc aca att cct gct aac ata ggg tta ctg gga tcc aag ata 240
Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser Lys Ile
65 70 75 80

agt cag tct acc agc agt att aat gag aat gtt aac gat aaa tgc aaa 288
45 Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp Lys Cys Lys
85 90 95

ttt act ctt cct cct tta aag att cat gag tgt aat atc tct tgt ccg 336
50 Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro
100 105 110

aat cct ttg cct ttc aga gaa tac cga cca atc tca caa ggg gtg agt 384
Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser
115 120 125

55 gat ctt gta gga ctg ccg aac cag atc tgt cta cag aag aca aca tca 432
Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser
130 135 140

60 aca atc tta aag ccc agg ctg ata tcc tat act cta cca att aat acc 480

Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Thr
145 150 155 160

aga gaa ggg gtt tgc atc act gac cca ctt ttg gct gtt gat aat ggc 528
5 Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val Asp Asn Gly
165 170 175

ttc ttc gcc tat agc cat ctt gaa aag atc gga tca tgt act aga gga 576
10 Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys Thr Arg Gly
180 185 190

att gca aaa caa agg ata ata ggg gtg ggt gag gta ttg gat agg ggt 624
15 Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp Arg Gly
195 200 205

gat aag gtg cca tca atg ttt atg acc aat gtt tgg aca cca ccc aat 672
20 Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro Pro Asn
210 215 220

cca agc acc atc cat cat tgc agc tca act tac cat gaa gat ttt tat 720
25 Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu Asp Phe Tyr
225 230 235 240

tac aca ttg tgc gca gtg tcc cat gtg gga gat cct atc ctt aac agt 768
30 Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile Leu Asn Ser
245 250 255

act tcc tgg aca gag tca ctg tct ctg att cgt ctt gct gta aga cca 816
35 Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro
260 265 270

aaa agt gat agt gga gac tac aat cag aaa tac atc gct ata act aaa 864
40 Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys
275 280 285

gtt gaa aga ggg aag tac gat aag gtg atg cct tac ggt cca tca ggt 912
45 Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly
290 295 300

atc aag caa ggg gat aca ttg tac ttt ccg gcc gtc ggt ttt ttg cca 960
50 Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro
305 310 315 320

agg acc gaa ttt caa tat aat gac tct aat tgt ccc ata att cat tgc 1008
55 Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys
325 330 335

aag tac agc aaa gca gaa aac tgt agg ctt tca atg ggt gtc aac tcc 1056
60 Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser
340 345 350

aaa agt cat tat att ttg aga tca gga cta ttg aag tat aat cta tct 1104
65 Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser
355 360 365

ctt gga gga gac atc ata ctc caa ttt atc gag att gct gac aat aga 1152
70 Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg
370 375 380

ttg acc atc ggt tct cct agt aag ata tac aat tcc cta ggt caa ccc 1200

Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro
 385 390 395 400

gtt ttc tac cag gca tca tat tct tgg gat acg atg att aaa tta ggc 1248
 5 Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415

gat gtt gat acc gtt gac cct cta aga gta cag tgg aga aat aac agt 1296
 10 Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430

gtg att tct aga cct gga cag tca cag tgt cct cga ttt aat gtc tgt 1344
 Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445

15 ccc gag gta tgc tgg gaa ggg aca tat aat gat gct ttt cta ata gac 1392
 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

20 cgg cta aac tgg gtt agt gct ggt gtt tat tta aac agt aac caa act 1440
 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

gca gag aac cct gtg ttt gcc gta ttc aag gat aac gag atc ctt tac 1488
 25 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

caa gtt cca ctg gct gaa gat gac aca aat gca caa aaa acc atc aca 1536
 30 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

gat tgc ttc ttg ctg gag aat gtc ata tgg tgt ata tca cta gta gaa 1584
 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

35 ata tac gat aca gga gac agt gtg ata agg cca aaa cta ttt gca gtc 1632
 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

40 aag ata cct gcc caa tgt tca gag agt tga 1662
 Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

45 <210> 15
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 15

55 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln Ala Leu Ile
 60 20 25 30

5 Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
 35 40 45
 10 Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser
 50 55 60
 15 Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser Lys Ile
 65 70 75 80
 20 Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro
 100 105 110
 25 Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser
 115 120 125
 30 Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser
 130 135 140
 35 Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val Asp Asn Gly
 165 170 175
 40 Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys Thr Arg Gly
 180 185 190
 45 Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp Arg Gly
 195 200 205
 50 Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro Pro Asn
 210 215 220
 55 Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile Leu Asn Ser
 245 250 255
 60 Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro
 260 265 270

5 Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys
 275 280 285
 Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly
 290 295 300
 10 Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro
 305 310 315 320
 15 Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys
 325 330 335
 20 Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser
 340 345 350
 25 Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser
 355 360 365
 Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg
 370 375 380
 30 Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 35 Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415
 40 Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430
 45 Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445
 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460
 50 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480
 55 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495
 60 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525
 5

Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540
 10

Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

15 <210> 16
 <211> 1662
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <223> Ссавці – Кодон, оптимізований вірусом Hendra sG

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1662)

<400> 16
 atg gaa acc gac acc ctg ctg ctg tgg gtg ctg ctc ctg tgg gtc ccc 48
 30 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

ggc agc aca ggc gac tac acc cgg acc acc gac aac cag gcc ctg atc 96
 35 Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln Ala Leu Ile
 20 25 30

aaa gag tcc ctg cag agc gtc cag cag cag atc aag gcc ctg acc gac 144
 Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
 35 40 45

40 aag atc ggc acc gag atc ggc ccc aaa gtg tcc ctg atc gac acc agc 192
 Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser
 50 55 60

45 agc acc atc acc atc ccc gcc aac atc ggg ctg ctg ggc tcc aag atc 240
 Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser Lys Ile
 65 70 75 80

50 agc cag agc acc agc tcc atc aac gag aac gtg aac gac aag tgc aag 288
 Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp Lys Cys Lys
 85 90 95

ttc acc ctg ccc ccc ctg aag atc cac gag tgc aac atc agc tgc ccc 336
 55 Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro
 100 105 110

aac ccc ctg ccc ttc cgg gag tac cgg ccc atc agc cag ggc gtg agc 384
 Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser
 115 120 125
 60

gac ctg gtg ggc ctg ccc aac cag atc tgc ctg cag aaa acc acc tcc 432
 Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser
 130 135 140

5 acc atc ctg aag ccc cgg ctg atc agc tac acc ctg ccc atc aac acc 480
 Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Thr
 145 150 155 160

10 cgg gag ggc gtg tgc atc acc gac cct ctg ctg gcc gtg gac aac ggc 528
 Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val Asp Asn Gly
 165 170 175

15 ttc ttc gcc tac agc cac ctg gaa aag atc ggc agc tgc acc cgg ggc 576
 Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys Thr Arg Gly
 180 185 190

att gcc aag cag cgg atc atc ggc gtg ggc gag gtg ctg gac cgg ggc 624
 Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp Arg Gly
 195 200 205

20 gac aag gtg ccc agc atg ttc atg acc aac gtg tgg acc ccc ccc aac 672
 Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro Pro Asn
 210 215 220

25 ccc agc aca atc cac cac tgc agc agc acc tac cac gag gac ttc tac 720
 Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu Asp Phe Tyr
 225 230 235 240

30 tac acc ctg tgc gcc gtg agc cac gtg ggc gac ccc atc ctg aac agc 768
 Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile Leu Asn Ser
 245 250 255

35 acc agc tgg acc gag agc ctg agc ctg atc cgg ctg gcc gtg cgg ccc 816
 Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro
 260 265 270

40 aag agc gac agc ggc gac tac aac cag aag tat atc gcc atc acc aag 864
 Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys
 275 280 285

gtg gag cgg ggc aag tac gac aaa gtg atg ccc tac ggc ccc agc ggc 912
 Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly
 290 295 300

45 atc aag cag ggc gac aca ctg tac ttc ccc gcc gtg ggc ttc ctg ccc 960
 Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro
 305 310 315 320

50 cgg acc gag ttc cag tac aac gac agc aac tgc ccc atc atc cac tgc 1008
 Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys
 325 330 335

55 aag tac agc aag gcc gag aac tgc aga ctg agc atg ggc gtg aac agc 1056
 Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser
 340 345 350

aag agc cac tac atc ctg cgg agc ggc ctg ctg aag tac aac ctg tcc 1104
 Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser
 355 360 365

60

ctg ggc ggc gac atc atc ctg cag ttc atc gag atc gcc gac aac cgg 1152
 Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg
 370 375 380

5 ctg acc atc ggc agc ccc agc aag atc tac aac agc ctg ggc cag ccc 1200
 Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro
 385 390 395 400

10 gtg ttc tac cag gcc agc tac agc tgg gac acc atg atc aag ctg ggg 1248
 Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415

15 gac gtg gac acc gtg gac ccc ctg cgg gtg cag tgg cgg aac aac agc 1296
 Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430

20 gtg atc agc aga ccc ggc cag agc cag tgc ccc cgg ttc aac gtg tgc 1344
 Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445

ccc gaa gtg tgc tgg gag ggc acc tac aac gac gcc ttt ctg atc gac 1392
 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

25 cgg ctg aac tgg gtg tcc gcc gga gtg tac ctg aac tcc aac cag acc 1440
 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

30 gcc gag aac ccc gtg ttc gcc gtg ttc aag gac aac gag atc ctg tac 1488
 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

35 cag gtg ccc ctg gcc gag gac gac acc aac gcc cag aaa acc atc acc 1536
 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

40 gac tgc ttt ctg ctg gaa aac gtg atc tgg tgc atc agc ctg gtg gag 1584
 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

atc tac gac acc ggc gac tcc gtg atc cgg ccc aag ctg ttt gcc gtg 1632
 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

45 aag atc ccc gcc cag tgc agc gag agc tga 1662
 Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

50 <210> 17
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

55 <220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 17

60 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

	245	250	255		
5	Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro	260	265	270	
10	Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys	275	280	285	
15	Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly	290	295	300	
20	Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro	305	310	315	320
25	Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys	325	330	335	
30	Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser	340	345	350	
35	Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser	355	360	365	
40	Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg	370	375	380	
45	Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro	385	390	395	400
50	Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly	405	410	415	
55	Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser	420	425	430	
60	Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys	435	440	445	
	Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp	450	455	460	
	Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr	465	470	475	480
	Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr				

485

490

495

5 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
500 505 510

10 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
515 520 525

15 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
530 535 540

Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
545 550

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20

1. Вакцина що містить глікопротеїн G вірусу Hendra і/або Nipah, імуностимулюючий комплекс (ISC) і один або більше ексципієнтів у кількості, здатній ефективно викликати імунологічний захист проти вірусів Hendra і/або Nipah після введення суб'єкту, який сприйнятливий до вірусу Hendra і/або Nipah, де

25 а) глікопротеїн G вірусу Hendra і/або Nipah присутній в кількості 5-100 мкг/дозу; і

б) ISC містить сапонін і стероїд; і

с) указаний суб'єкт являє собою коня або свиню.

2. Вакцина за п. 1, де сапонін являє собою Quil A.

3. Вакцина за п. 1, де вказаний ISC додатково включає фосфоліпід.

30 4. Вакцина за п. 1, де розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra складається з амінокислот 73-604 нативного глікопротеїну G вірусу Hendra (SEQ ID NO:2).

5. Вакцина за п. 4, де вказаний розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra кодується нуклеотидною послідовністю, що включає нуклеотиди 64-1662 з SEQ ID NO:16.

6. Вакцина за п. 1, де розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra присутній у димерній формі.

35 7. Вакцина за п. 6, де кожна димерна субодиниця розчинного глікопротеїну G вірусу Hendra з'єднана одним або більше дисульфідними зв'язками.

8. Вакцина за п. 1, де розчинний глікопротеїн G вірусу Hendra присутній у формі тетрамеру.

9. Вакцина за п. 1, де кількість розчинного глікопротеїну G вірусу Hendra складає від близько 50 до близько 100 мкг, і де суб'єкт являє собою коня.

40 10. Вакцина за п. 1, де вказаний сапонін виділяють з *Quillaja saponaria* Molina.

11. Вакцина за п. 10, де вказаний сапонін являє собою QH-A, QH-B, QH-C або QS21.

12. Вакцина за п. 3, де вказаний фосфоліпід вибирають з групи, що складається з фосфатидилхоліну (PC), дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC), фосфатидинової кислоти (фосфатидат) (PA), фосфатидилетаноламіну (PE), фосфатидилсерину (PS), фосфатидилінозиту (PI), фосфатидилінозитфосфату (PIP), фосфатидилінозитбісфосфату (PIP2), фосфатидилінозиттрифосфату (PIP3), фосфорилхоліну (SPH),

церамідфосфорилетаноламіну (Cer-PE) і керамідфосфорилгліцерину.

13. Вакцина за п. 3, де вказаний сапонін являє собою Quil A, вказаний фосфоліпід являє собою DPPC і вказаний стероїд являє собою холестерин.

50 14. Вакцина за п. 13, де відношення Quil A:DPPC:холестерин у композиції становить 5:1:1 за масою.

15. Вакцина за будь-яким з пп. 1-8 або 10-14, де суб'єктом є свиня.

16. Спосіб вироблення захисної імунної відповіді проти вірусу Hendra і/або Nipah у коня або свині, що включає введення коню або свині щонайменше однієї ін'єкції імуногенної композиції, що містить глікопротеїн G вірусу Hendra і/або Nipah, де щонайменше одна ін'єкція містить від

55 близько 5 до близько 100 мкг глікопротеїну G вірусу Hendra або глікопротеїну G вірусу Nipah, і імуностимулюючий комплекс (ISC), що містить сапонін і стероїд, для одержання захисної імунної відповіді проти вірусу Hendra і/або Nipah після введення коню або свині.

60 17. Спосіб за п. 16, де захисна імунна відповідь знижує у коня або свині репродукування вірусу Hendra і/або Nipah.

18. Спосіб за п. 16, де захисна імунна відповідь знижує у коня або свині шединг вірусу Hendra і/або Nipah.

19. Спосіб за п. 16, де кінь або свиня піддані впливу вірусу Hendra і/або Nipah.

20. Спосіб за п. 19, де кінь або свиня уражені інфекцією вірусу Hendra і/або Nipah.

5 21. Спосіб за п. 16, де вказану імуногенну композицію вводять внутрішньом'язово.

22. Спосіб за п. 16, де вказану імуногенну композицію вводять у вигляді множини доз.

23. Спосіб за п. 22, де після першої дози вводять другу дозу щонайменше через від близько двадцять першого дня до близько двадцять восьмого дня після першої дози.

10 24. Спосіб за п. 22, де кожна доза містить від близько 5 до близько 100 мкг розчинного глікопротеїну G вірусу Hendra.

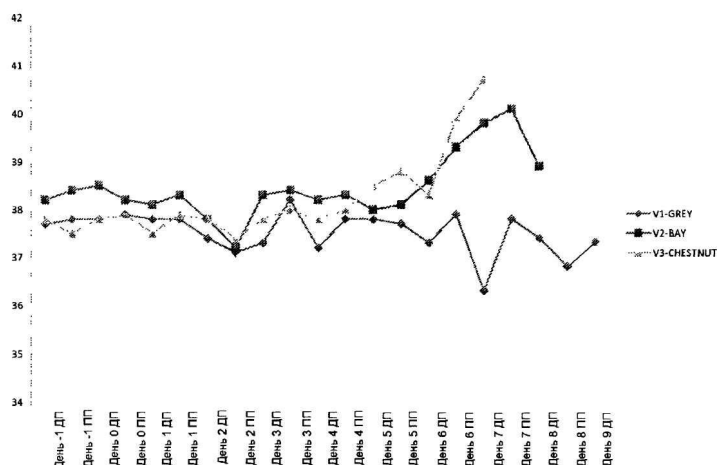
25. Спосіб диференціації суб'єкта, вакцинованого вказаною вакциною за будь-яким з пп. 1-15, від суб'єкта, підданого впливу вірусу Hendra і/або Nipah, що включає детектування присутності антитіла у біологічному зразку, виділеному з суб'єкта, проти щонайменше будь-якого одного з наступних вірусних білків HeV і/або NiV, вибраних з групи, що складається зі злитого білка (F), матричного білка (M), фосфопротеїну (P), великого білка (L) і нуклеокапсидного білка (N).

15 26. Спосіб за п. 25, в якому суб'єктом є кінь або свиня.

27. Спосіб за п. 25, в якому вказаний вірус являє собою вірус Hendra.

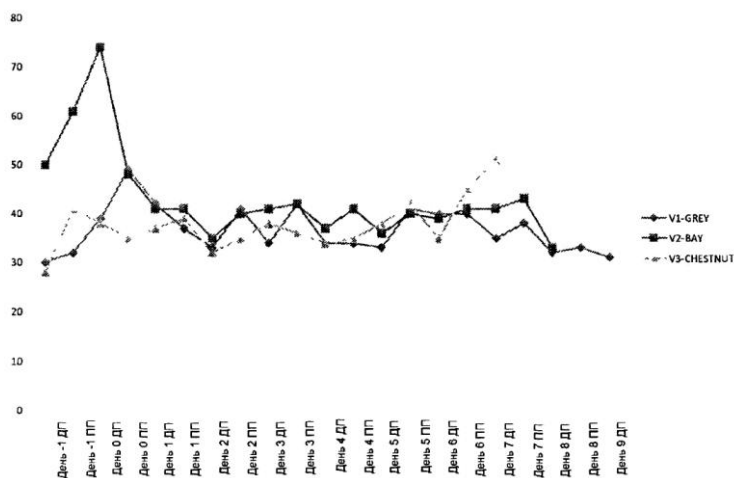
28. Спосіб за п. 25, в якому вказаний вірус являє собою вірус Nipah.

Ректальна температура для V1, V2, V3

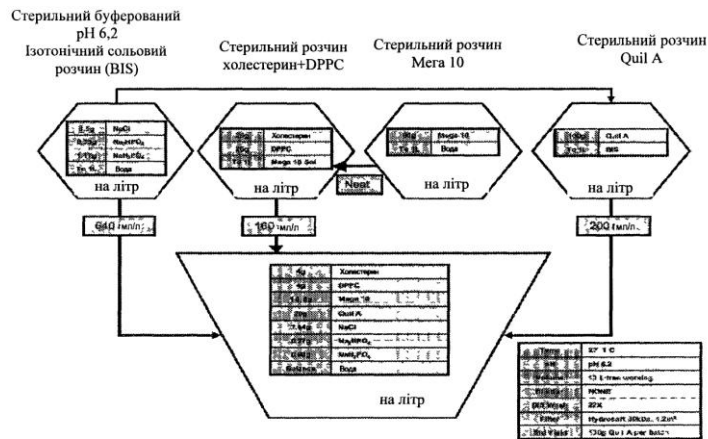


Фіг. 1

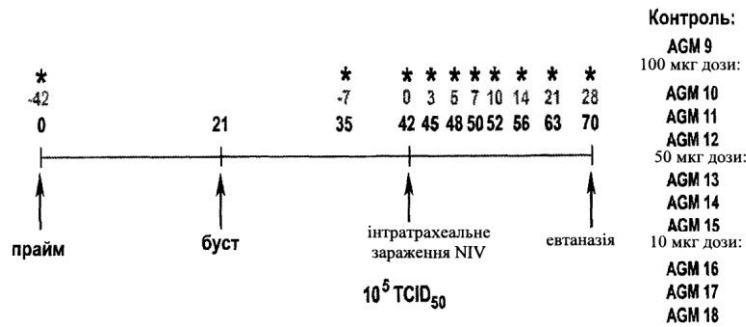
Частота серцевих скорочень для V1, V2, V3



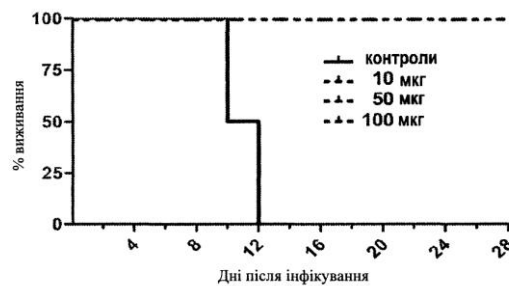
Фіг. 2



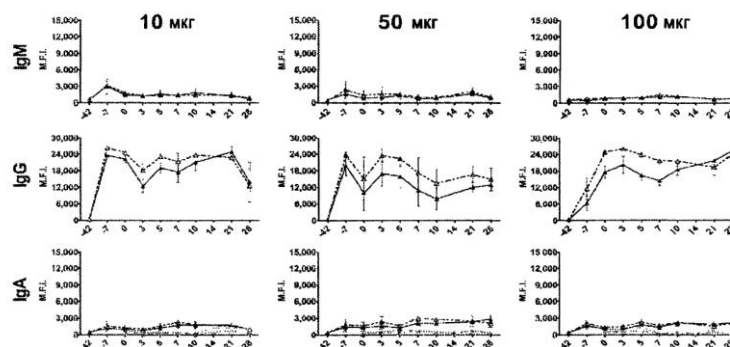
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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