

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Tereza Tomanová

Terapeutické postupy při léčbě infekce Ebola virem

Therapeutic approaches to Ebola virus infection

Bakalářská práce

Školitel:

RNDr. Alena Drda Morávková, MBA, Ph.D.

Praha 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne.....

Velice děkuji své školitelce RNDr. Aleně Drda Morávkové, MBA, Ph.D. za rady, korektury a čas, který mi věnovala při pomoci s vypracováním bakalářské práce.

## OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Filoviry.....	2
2.1 Klasifikace Filovirů .....	2
2.2 Genom ebola viru.....	2
2.3 Proteiny kódované genomem EBOV.....	2
2.4 Životní cyklus ebola viru.....	3
3. Diagnostika ebola viru .....	4
3.1 Real-time qRT PCR .....	4
3.2 ELISA .....	5
4. Testování vakcín a léčiv .....	5
5. Vakcíny .....	6
5.1 rVSV-ZEBOV .....	6
5.2 Vakcíny založené na vektoru adenovirů.....	8
5.3 DNA vakcíny .....	12
5.4 VLPs - virus like particles .....	12
5.5 VEEV vakcíny .....	14
5.6 Oslabený EBOV pomocí H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	15
5.7 RABV/EBOV vakcína.....	16
5.8 HPIV 3 vakcína .....	18
5.9 GamEvac-Combi vakcína .....	19
6. Léky .....	19
6.1 Léky, u kterých probíhá vyhodnocování klinických testů .....	19
6.1.1 Favipiravir.....	19
6.1.2 Zmapp.....	20
6.1.3 TKM-100802.....	20
6.2 Léky pro které brzy začnou klinické testy .....	21
6.2.1 MIL-77 .....	21
6.2.2 AVI-7537 .....	21
6.2.3 BCX-4430.....	22
6.2.4 rNAPc2.....	22
6.3 Léky se slibnými účinky proti EBOV, u kterých ale byla na základě nejnovějších dat pozastavena možnost spuštění klinických testů v blízké době .....	22
6.3.1 Brincidofovir.....	22
6.3.2 Krevní plasma rekonvalescentů.....	23
7. Závěr.....	24
8. Použitá literatura .....	25

## **SEZNAM ZKRATEK**

Ad - adenoviry

Ad26 - adenovirus typu 26

Ad35 - adenovirus typu 35

Ad5 - adenovirus typu 5

CMV - Cytomegalovirus

dpd - dependentní

EBOV - Ebola virus

EVD - onemocnění způsobené virem eboly (Ebola virus disease)

eVLP - ebola VLP

GP - glykoprotein

HPIV3 - lidský virus parainfluenzy typu 3

ChAd3 - vektor založený na šimpanzím adenoviru typu 3

IgG - imunoglobulin G

IgM - imunoglobulin M

kb - kilobáze

MARV - marburg virus

MVA - modifikovaný vakcinia virus Ankara

mVLP - marburg VLP

NHPs - subhumánní primáti (non-human primates)

NP - nukleoprotein

PFU - počet virových částic tvořících plaky na jednotku objemu (plaque forming units)

PU - počet virových částic (viral particle units)

RABV - virus vztekliny

rAd5 - rekombinantní vektor založený na adenoviru typu 5

rNAPc2 - rekombinantní protisrážlivý c2 protein hlístic

rVSV - rekombinantní virus vesikulární stomatitidy

SEBOV - Ebola virus kmen Sudan

siRNA - krátké RNA schopné interference (small interfering RNA)

TAFV - Taï forest Ebola virus

VEEV - virus venezuelské koňské encefalitidy (venezuelan equine encephalitis virus)

VLPs - syntetické virové částice (virus like particles)

VSV - virus vezikulární stomatitidy

wt - původní druh nacházející se v přírodě (wild-type)

ZEBOV - Ebola virus kmen Zaire

## **ABSTRAKT**

Ebola virus je velmi nebezpečný vzhledem k vysoké úmrtnosti a nedostupnosti vakcíny nebo léku schválených pro použití pro veřejnost. Od první epidemie v roce 1976 bylo zaznamenáno více než 31 000 nakažených lidí, z toho téměř 13 000 nákazu nepřežilo (cdc.gov). Ebola virus se obvykle drží v zemích západní Afriky, na ostatní kontinenty se v historii dostal jen ojediněle a pokaždé se jednalo pouze o jedince. Vyjímkou je kmen Reston, který pochází z Filipín a v roce 1989 se při transportu makaků z Filipín dostal do USA. Kmen Reston sice může nakazit lidi, ale zatím není známý případ člověka, který by na nákazu kmenem Reston zemřel (who.int). Tento případ byl však varovným signálem pro to, jak jednoduchý je přenos eboly na další kontinenty a pokud by se jednalo o některý ze smrtících kmenů, následky by byly fatální. Ebola představuje hrozbu, proti které je nutné vyvinout účinnou vakcínu a lék. Tato bakalářská práce se zabývá virem Ebola, jeho genomem, životním cyklem a především možnostmi terapie infekce způsobené tímto virem. Zaměřuje se na v současnosti testované vakcíny i léky proti infekci virem Ebola.

Klíčová slova: Filoviry, ebola, vakcíny, léky

Ebola virus is a very dangerous virus because of its high mortality rate and unavailability of an approved vaccine or medicament. There was more than 31 000 infected people since the first epidemic in 1976 and almost 13 000 of them died (cdc.gov). Ebola virus usually occurs in the west Africa, its occurrence on the other continents was rare in the past and it was always just one case. There is one exception though, strain Reston of Ebola virus. Strain Reston was spread from Philippines to the USA while deporting macaques. Strain Reston is able to infect people, but there is no case of death after being infected with this strain (who.int). This occurrence in the USA was a warning sign of how easily could Ebola virus travel to other continents. If it was one of the deadly strains, the results would be fatal. Ebola virus is a threat and it is necessary to develop effective vaccine and drug. This bachelor's thesis is about the Ebola virus, its genome, life cycle and mainly about the options of therapy of the ebola virus disease. It is focused on presently tested vaccines and drugs against the Ebola virus.

Key words: Filoviruses, ebola, vaccine, medicament

## 1. Úvod

Ebola virus je společně s marburg a cuevavirem zástupcem čeledi Filovirů. Cuevavirus byl objeven ve Španělsku v roce 2002 u netopýrů, jediným známým kmenem je Lloviu virus. Zatím není známá infekce člověka tímto virem (Negredo *et al.*, 2011). Marburg virus byl objeven v roce 1967 v německých laboratořích u pracovníků starajících se o opice pocházející z Ugandy. Kromě tohoto ojedinělého výskytu v roce 1967 v Německu a dnešním Srbsku se marburg virus vyskytuje v Africe, v zemích jako Uganda, Keňa a Kongo. Rezervoárem marburg viru jsou kaloni, virus se přenáší tělními tekutinami. Marburg virus je původcem hemoragické horečky, úmrtnost se liší mezi epidemiemi, pohybuje se mezi 23 - 90% a zatím neexistuje žádná léčba (cdc.gov). Nejnebezpečnější z filovirů je ebola virus. Rezervoárem viru jsou kaloni (Hoffman *et al.*, 2016). Je přenášen tělními tekutinami a způsobuje hemoragickou horečku. Ebola virus má pět kmenů - Zaire, Sudan, Reston, Taï Forest a Bundibugyo. Úmrtnost se pohybuje mezi 60 až 90%, nejnebezpečnější je kmen Zaire s úmrtností 79 - 90%. Úmrtnost kmene Sudan je 54%, kmene Bundibugyo 32%, kmene Reston a Taï Forest zatím nikoho nezahubily (Laupland *et al.*, 2014). Ebola virus je rozšířen hlavně v zemích západní a centrální Afriky, například v Guinei, Sierra Leone, Libérii, Gabonu, Kongo, Jižním Súdánu a v Ugandě. Ebola virus se poprvé objevil v roce 1976 ve dnešní Demokratické republice Kongo, kde se jednalo o kmen Zaire. Ve stejném roce se v dnešním Jižním Súdánu objevil kmen Sudan. Největší epidemie proběhla v letech 2013 a 2014 v Guinei, odkud se poté rozšířila od okolních států. Poslední epidemie byla zaznamenána mezi roky 2014 a 2016 opět v Sierra Leone, Guinei a Libérii. Dosavadní léčba spočívala v podpůrné léčbě příznaků, to znamená rehydratace pacienta, prokysličení a léčba případných dalších infekcí (cdc.gov). I když v současnosti počet nakažených klesá, stále je prioritou vývoj účinné vakcíny a léku pro zvládnutí další epidemie. Cílem této bakalářské práce je představit virus Ebola a především shrnout současný stav vývoje vakcín a léčiv proti viru Eboly.

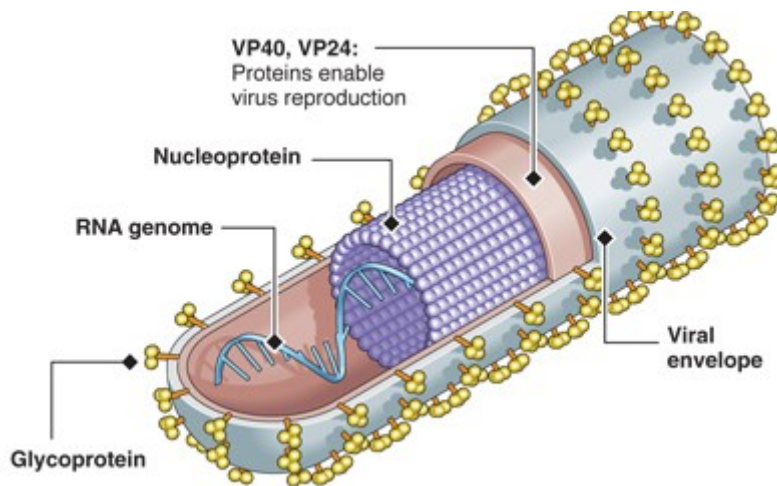
## 2. FILOVIRY

### 2.1 KLASIFIKACE FILOVIRŮ

Filoviry patří společně s Rhabdoviry, Paramyxoviry a Bornaviry do řádu Mononegavirales. Rody patřící do čeledi Filoviridae jsou Ebola virus, Marburg virus a Cueva virus. U EBOV je známých pět druhů viru - Zaire, Sudan, Reston, Taï Forest a Bundibugyo.

### 2.2 GENOM EBOLA VIRU

EBOV je obalený virus s helikální kapsidou (viz obr.č.1). Genom EBOV tvoří negativní nesegmentovaná jednovláknová RNA a jeho velikost je 19 kb. RNA má sedm genů, transkribovaných do sedmi mRNA. Tyto mRNA kódují osm proteinů díky tomu, že protein sGP je jako jediný translatován z needitované mRNA, všechny ostatní proteiny jsou translatovány z editovaných mRNA. Na koncích vlákna RNA jsou krátké oblasti nazývané jako „leader“ a „trailer“, které obsahují enkapsidační signál a transkripční a replikační promotory (Klenk *et al.*, 2004).



Obrázek č. 1: Obalený EBOV s helikální kapsidou, zdroj obrázku: jonlieffmd.com

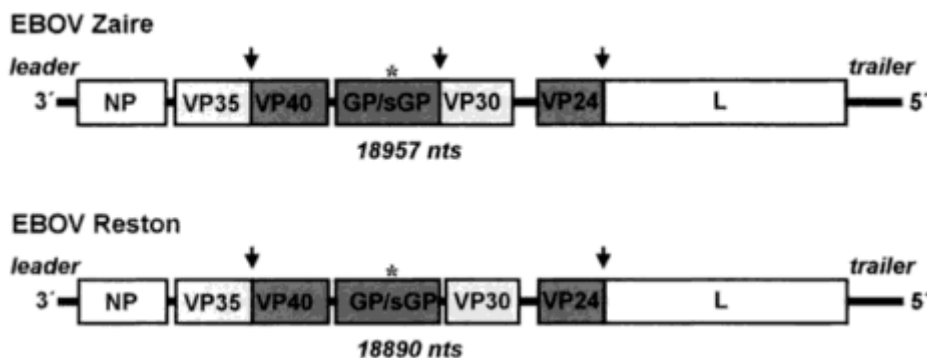
### 2.3 PROTEINY KÓDOVANÉ GENOMEM EBOV

Sedm proteinů EBOV je strukturních - NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L a jeden je nestrukturní - sGP (viz obr.č.2). Nukleoprotein NP se podílí na enkapsidaci RNA a přechodu z transkripce do replikace (Klenk *et al.*, 2004). VP30 je spojen s nukleokapsidou, váže RNA a slouží jako „enhancer“ pro virovou transkripci. VP35 je antagonistou interferonů I.typu, blokuje aktivaci jejich regulačního faktoru 3 a pravděpodobně zároveň zabraňuje transkripci interferonu  $\beta$  (Geisbert *et al.*, 2010). Proteiny L a VP35 se podílí na tvorbě polymerázového komplexu důležitého pro transkripci a replikaci EBOV genomu. L protein také zajišťuje RNA



dependentní RNA polymerázovou aktivitu celého komplexu. Cílením účinných látek na L protein se téměř zcela zamezí syntéze RNA (Geisbert *et al.*, 2010). NP, VP35, VP30 a L jsou důležité pro formování virové nukleokapsidy a jsou zcela nezbytné pro virovou transkripci. Dalším proteinem je VP40, což je matrixový protein nezbytný pro pučení a obalení virionů. V infikovaných buňkách asociuje VP40 s membránami pozdně endosomálního kompartmentu. VP24 je také matrixovým proteinem. VP24 protein inhibuje odpověď interferonů prvního typu a také tvoří homodimery vázající VP35 nebo NP (Iversen *et al.*, 2012).

Čtvrtý gen kóduje dva proteiny. Jedním z nich je povrchový GP, glykoprotein tvořící obal EBOV a hrající hlavní roli při vstupu virionu do buňky. Zajišťuje vazbu virionu k receptorům hostitelské buňky a zároveň je jedním z hlavních faktorů patogenity viru (Feldmann *et al.*, 1996). Druhým proteinem kódovaným čtvrtým genem je nestrukturní protein sGP (soluble GP), který je na rozdíl od GP translatován z needitované mRNA. sGP navíc není inkorporován do virových částic, ale je sekretován z infikovaných buněk. Jeho funkce zatím není plně známá (viralzone.expasy.org.).



Obr.č.2: Genom kmene Zaire a Reston. Bíle jsou označeny geny kódující nukleokapsidové proteiny, šedě geny kódující matrix a povrchové proteiny. Šipky naznačují překryv genů. Hvězdičkou jsou označena místa pro editaci RNA. Zdroj obrázku: Klenk *et al.*, 2004

## 2.4 ŽIVOTNÍ CYKLUS EBOLA VIRU

Pomocí GP glykoproteinu se virion přichytí na receptor hostitelské buňky, protein TIM-1. Dvnitř buňky se virion dostane makropinocytózou. V pozdním endosomu potom dochází k fúzi membrán virionu a vakuoly a nukleokapsida viru je uvolněna do cytoplazmy, kde nejprve dojde k transkripci a poté k replikaci viru a translaci virových proteinů. Poté matrixový protein řídí pučení a uvolňování virionů z hostitelské buňky (viralzone.expasy.org).

Replikace a transkripce EBOV probíhá v cytoplazmě infikovaných buněk. EBOV si musí kódovat vlastní RNA dependentní RNA polymerázu, která využívá jako templát genom EBOV, což hostitelská DNA dle RNA polymeráza neumí. Při transkripci je –ssRNA

transkribována do sedmi monocistronních mRNA. Posttranskripční modifikace řídí L protein. mRNA jsou při nich na 3' konci polyadenylovány a na 5' konec je dodána methylguanositová čepička (viralzone.expasy.org). Jako první je transkribován NP gen, poslední je L gen, genom je tedy transkribován od 3' směrem k 5' konci. Jeden replikační cyklus EBOV trvá přibližně 12 hodin a první příznaky infekce se objevují většinou do 48 hodin po setkání s virem. Nově syntetizované mRNA EBOV jsou důležité pro diagnostiku a v krvi jsou diagnostikovatelné již 6-7 hodin po vystavení viru (Klenk *et al.*, 2004).

### 3. DIAGNOSTIKA EBOLA VIRU

EBOV bývá diagnostikovatelný v krvi obvykle do tří dnů po projevení prvních symptomů onemocnění. Většinou se EBOV detekuje podle přítomnosti virových antigenů nebo virové RNA v krvi. V prvních dnech infekce se pro diagnózu používá ELISA test pro detekci antigenu, RT-PCR nebo izolace viru. V pozdějších dnech infekce se využívá diagnostika pomocí detekce IgM a IgG protilátek (cdc.gov). Používá se například ReEBOV Antigen Rapid Test Kit, který detekuje VP40 protein v krvi. Dalším možným testem pro diagnostiku je Liferiver EBOV Real Time RT-PCR Kit je založen na real-time PCR a je schopný detekovat v krvi ZEBOV, SEBOV, TAFV i BDBV (who.int).

#### 3.1 REAL-TIME QRT PCR

Real-time qRT PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) je metoda vycházející z klasické metody PCR, během které dojde k namnožení vybraného úseku DNA až do několika milionů kopií tohoto úseku a tím pádem lze provést analýzu DNA, i když je původní vzorek velmi malý. Metoda je založena na principu replikace. Nejprve dochází k denaturaci DNA, čímž dojde k rozvolnění dvoušroubovice. Úsek DNA, který chceme amplifikovat, je pak na začátku i na konci označen primery. Poté dochází k syntéze nového vlákna pomocí Taq DNA polymerázy (původem od bakterie *Thermis aquaticus*). Tento postup se opakuje až do získání požadovaného množství kopií DNA, číslo cyklu se označuje jako  $C_T$ . Celý proces probíhá v termocykleru (ncbi.nlm.nih.gov, 2017). RT-PCR se využívá při amplifikaci RNA namísto DNA. RNA je pomocí reverzní transkriptázy převedena na cDNA a poté už následuje klasická PCR (neb.com).

U EBOV je hodnota  $C_T$  spojena s mírou úmrtnosti. Nižší  $C_T$  znamená vyšší počet kopií virové RNA na ml krve a většinou znamená i vyšší úmrtnost. V některých studiích provedených během epidemie 2014/2015 bylo potvrzeno, že pacienti s  $C_T < 25$  (to znamená více než  $10^7$  virových RNA kopií na ml krve) měli značně vyšší úmrtnost než pacienti s  $C_T \geq 25$  (Broadhurst *et al.*, 2016). Tato hypotéza se potvrdila i při studii Sissoko a kol. v roce 2016 ohledně Favipiraviru. Při klinických testech byla nejnižší mortalita právě u pacientů s  $C_T \geq 20$

a v průběhu léčby u nich výrazně klesla virémie. U skupiny s  $C_T \geq 25$  pak všichni pacienti přežili. Naopak pacienti s  $C_T < 20$  měli 90% úmrtnost a virémie v průběhu léčby neklesla (Sissoko *et al.*, 2016).

### 3.2 ELISA

ELISA neboli Enzyme-linked immunosorbent assay je metoda používaná pro detekci protilátky nebo antigenu ve vzorku. Princip spočívá v navázání protilátek na antigen ve zkumavce, na druhé z přidávaných protilátek je navázán enzym. S tímto enzymem reaguje přidáný substrát, nejčastěji za změny barvy, podle které se pak test vyhodnocuje (elisa-antibody.com).

## 4. TESTOVÁNÍ VAKCÍN A LÉČIV

Klinické testování nových vakcín a léků je rozděleno do několika fází. Před začátkem klinického testování dochází k testování v laboratořích na zvířatech, obvykle myších, morčatech a subhumáních primátech (NHPs). Poté začíná samotné klinické testování, někdy má fázi 0, při které je velmi malá dávka léčiva podána malému množství lidí, většinou je počet mezi 10 - 15 lidmi. Ve fázi I je testovaná látka podána 20-100 lidem. Fáze I většinou trvá několik měsíců a testuje se reakce lidského organismu na látku, způsob podání a dávkování látky. Ve fázi II je testovaná látka podána několika stovkám lidí. Fáze II trvá obvykle od několika měsíců až po dva roky a jejím účelem je testovat účinnost spolu s vedlejšími účinky na lidský organismus. Ve fázi III dochází k testování 300 až 3 000 dobrovolníků nebo pacientů a fáze III trvá několik let, většinou od jednoho roku do čtyř let. Vzhledem k délce této fáze se sleduje dlouhodobá bezpečnost vakcíny, stejně jako dlouhodobý účinek. Během fází I až III dochází k náhodnému rozdělení do skupin (randomization). V jedné skupině pacienti obdrží testovanou látku a tato skupina je označena jako experimentální, druhá skupina je kontrolní a pacienti v ní dostanou placebo. Poslední fáze, fáze IV, testuje látku na několika tisících lidí a testuje bezpečnost a účinnost. Zároveň se zaměřuje na interakce s dalšími léčivy. Obvykle probíhá i potom, co už je vakcína schválena pro použití. Někdy dochází i k překrývání jednotlivých fází, například může probíhat fáze I/II testování, současně se ve fázi I testuje optimální dávka a ve fázi II se hned testuje její bezpečnost a účinnost (fda.gov, cancer.ca, sukl.cz).

Vakcíny mohou být v monovalentní nebo bivalentní verzi. Monovalentní vakcína proti EBOV účinkuje pouze proti jednomu kmenu EBOV, nejčastěji proti ZEBOV. Bivalentní je pak účinná proti dvou kmenům, například SEBOV a ZEBOV. Ještě existuje polyvalentní (kombinovaná) forma vakcíny, která chrání proti více onemocněním. V souvislosti s EBOV se testuje polyvalentní vakcína proti ebole a vzteklině.

Některé z vakcín proti EBOV jsou testovány formou kruhové vakcinace (ring vaccination), což znamená, že naočkovány jsou ty osoby, které přišly do styku s pacientem, u kterého byla diagnostikována ebola, tedy všechny potenciálně nakažené osoby (Henao-Restrepo *et al.*, 2015). Touto metodou je testována například vakcína rVSV-ZEBOV.

Pouze u jedné vakcíny proti EBOV byla zjištěna možnost využití v rámci postexpoziční profylaxe a to sice u rVSV-ZEBOV. I zde se ale vzhledem k účinnosti a neprovedeném výzkumu na lidech uvažuje o použití jen v rámci léčby náhodně nakažených jedinců nebo v rámci zabránění dalšího přenosu eboly (Feldmann *et al.*, 2007).

Většina testovaných vakcín proti EBOV je vytvořena vložením genu pro GP EBOV do genomu vektoru. Na proteiny VP35 a VP24 cílí PMO, tvořící lék proti EBOV AVI-7537. siRNA, ze kterých je vytvořen lék TKM-100802 cílí na proteiny VP24, VP35 a L protein kmene ZEBOV.

## 5. VAKCÍNY

Vakcíny lze rozdělit na vakcíny založené na virovém vektoru schopné replikace, vakcíny jako virové vektory neschopné dokončit svou replikaci a vakcíny založené na virovém antigenu. U všech replikace schopných virových vakcín je hlavní obavou možná mutace vakcinačních kmenů. Masová aplikace těchto vakcín zavede do populace nové člověkem vytvořené infekční viry, které po zmutování mohou představovat nebezpečí.

Atenuované vakcíny jsou oslabené vakcíny obsahující živé mikroorganismy schopné replikace. Inaktivované vakcíny obsahují patogeny zbavené schopnosti replikace.

Subjednotkové vakcíny obsahují pouze podjednotku patogenu, která vyvolává imunitní reakce, nejčastěji se jedná o povrchový glykoprotein.

### 5.1 rVSV-ZEBOV

Jedním z nejnadějnějších kandidátů na vakcínu proti ebole je vakcína nazývaná rVSV - ZEBOV nebo také V920. Na vývoji vakcíny se podílely společnosti NewLink Genetics a Merck Vaccines (WHO, 2015a). Jedná se o vakcínu obsahující atenuovaný virus vesikulární stomatitidy (VSV) kódující GP ZEBOV, viz obr. č. 6 (Henao-Restrepo *et al.*, 2015). VSV patří do čeledi Rhabdovirů, což jsou ssRNA viry s negativní polaritou. VSV má poměrně jednoduchý genom kódující pět strukturních proteinů: nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), matrixový protein (M), glykoprotein (G) a RNA dependentní RNA polymerázu (L). Tento virus napadá především zvířata, u člověka je infekce velmi ojedinělá. Pokud propukne, probíhá buď úplně bez příznaků, nebo jen s mírnými příznaky podobnými chřipce. Jeho použití je tedy při vytváření vakcín vhodné i z toho důvodu, že pro člověka není nebezpečný a již v dřívějších studiích bylo zjištěno, že Rhabdoviry mohou být použity jako

vektor pro virové vakcíny také proto, že v organismech vyvolávají silnou imunitní odpověď (Roberts *et al.*, 1999).

Pro vytvoření vakcíny byl použit klon viru VSV kmene Indiana. Celý genom VSV byl naklonován do podoby plazmidu s polymerázovým promotorem bakteriofágu T7. Poté byl ORF pro gen kódující VSV glykoprotein odstraněn. VSV glykoprotein je jeden z hlavních virulencních faktorů viru VSV a jeho odstraněním se tedy VSV výrazně oslabí a je bezpečnější pro použití jako vektor. Mezi geny G a L se nachází spojovník (linker site XhoI - NheI), který je obklopen transkripčními start a stop signály pro další přidané geny. Do této sekvence spojovníku byl vložen ORF kódující povrchový glykoprotein kmene ZEBOV Kikwit 1995 (Garbutt *et al.*, 2004). Jedním z možných postupů pro vytvoření VSV partikulí nesoucích na svém povrchu glykoprotein cizího viru je potřeba transfekce společné kultury Vero buněk a 293 T lymfocytů připraveným rVSV G/EBOV-GP plazmidem s plazmidy exprimujícími proteiny potřebné pro virovou replikaci VSV ( VSV N, VSV P, VSV L) a s plazmidem exprimujícím T7 polymerázu. Touto tranfekcí je dosaženo virové transkripce, exprese proteinů, replikace genomu a produkce rVSV vektorů. Ty jsou morfologicky stejné jako VSV wt partikule (Marzi *et al.*, 2011).

U všech naočkovaných osob se po očkování vytvořily protilátky vázající GP EBOV. Zároveň se u 85% naočkovaných osob vytvořily i neutralizační protilátky. Protilátky se obvykle vytvořily do týdne po naočkování, maximálně do měsíce po očkování a jejich přítomnost byla prokázána ještě 180 dnů po očkování (Agnandji *et al.*, 2016). Použití vakcíny je možné preventivně, postexpoziční profylaxe byla testována u myší, morčat a u makaků tak, že jim po nakažení virem kmene Zaire byla v různých časových odstupech očkována vakcína VSV $\Delta$ G/ZEBOV-GP. Všechny nakažené a do 24 hodin po vystavení patogenu naočkované myši přežily, u morčat a makaků byla 50 % úmrtnost. Ukázalo se, že mnohem vyšší účinnost, i když ne 100 %, mají v rámci postexpoziční profylaxe rVSV/MARV-GP a rVSV/SEBOV-GP, ani tyto dva vektory ale nebyly zatím testovány na lidech (Marzi *et al.*, 2011).

Účinnost vakcíny se udává mezi 75 - 100 % a výsledná účinnost závisí i na včasnosti podání vakcíny (Henao-Restrepo *et al.*, 2015). U osob, které přišly do kontaktu s pacientem nakaženým ebolou a poté byly co nejdříve naočkované vakcínou rVSV-EBOV, byla účinnost téměř 100 %. U osob naočkovaných déle než 21 dní od kontaktu vychází účinnost 75 %. Za minimální dávku se považuje dávka obsahující alespoň  $3 \times 10^5$  PFUs, menší dávka už by nemusela vyvolat žádnou imunitní odpověď (Agnandji *et al.*, 2016). V klinických studiích se většinou používá dávka obsahující  $2 \times 10^7$  PFUs (Henao-Restrepo *et al.*, 2015). U některých očkovaných pacientů se dostavily nežádoucí účinky jako artritida nebo kožní léze. Tyto problémy postihly 18% pacientů při testech v Ženevě, konkrétně byla artritida prokázána u devíti z 51 pacientů. Při testech v Hamburgu a Kilifi trpěli artritidou pouze dva pacienti ze 60. Kožní léze se vyskytla u tří pacientů v Ženevě a příznaky odezněly do sedmi až patnácti dní.

Půl roku po očkování již žádný z pacientů netrpěl vedlejšími příznaky (Agnandji *et al.*, 2016). Zatím se snad jako jediná nevýhoda vakcíny jeví nutnost skladovat ji při nízkých teplotách, nejlépe -70°C a méně. Při teplotě 4°C je vakcína stabilní týden, při teplotě 25°C musí být použita do 24 hodin (Armeno *et al.*, 2016). V současné době probíhá třetí fáze testování této vakcíny v Guinei pod názvem *Ebola ça suffit!* (Merck.com) a v Sierra Leone pod názvem STRIVE (WHO,2015a).

## 5.2 VAKCÍNY ZALOŽENÉ NA VEKTORU ADENOVIRŮ

Další v současné době testovanou vakcínou proti viru Ebola je vakcína ChAd3 – ZEBOV (VRC 207). Vakcína byla vyvinuta společností GlaxoSmithKline (GSK) a její vývoj začal v roce 2011. Vakcína obsahuje adenovirový vektor. Adenoviry jsou dsDNA viry a jejich genom je tvořen geny E1 - E4 (+ E1a, E1b), L1-5. Upravený adenovirový vektor kóduje GP ZEBOV a nebo SEBOV (Ledgerwood *et al.*, 2010). Jednou z prvních testovaných verzí vakcíny založené na adenovirovém vektoru byla vakcína využívající rekombinantní lidský adenovirus sérotypu 5 (rAd5). Vakcína rAd5 Ebola je složena z dvou rAd5 vektorů kódujících dva povrchové glykoproteiny ZEBOV a SEBOV v poměru 1 : 1. Při přípravě této vakcíny byl poprvé použit kmen ZEBOV 2014, do té doby byl pro všechny vakcíny použit kmen ZEBOV 1976. Z rAd5 vektoru byl odstraněn gen E1 a byl nahrazen genem pro povrchový glykoprotein eboly. Na tomto genu pro GP je bodová mutace aminokyseliny, konkrétně na N konci sekvence na pozici 71 (asp → glu). Bylo prokázáno, že tato bodová mutace zmírňuje cytopatogenní efekt viru na buňky hostitele. U vektoru také došlo k částečnému odstranění genu E3. Gen E1 kóduje proteiny nezbytné pro virovou replikaci a E3 virové proteiny ovlivňují imunitní odpověď hostitele (Ledgerwood *et al.*, 2010).

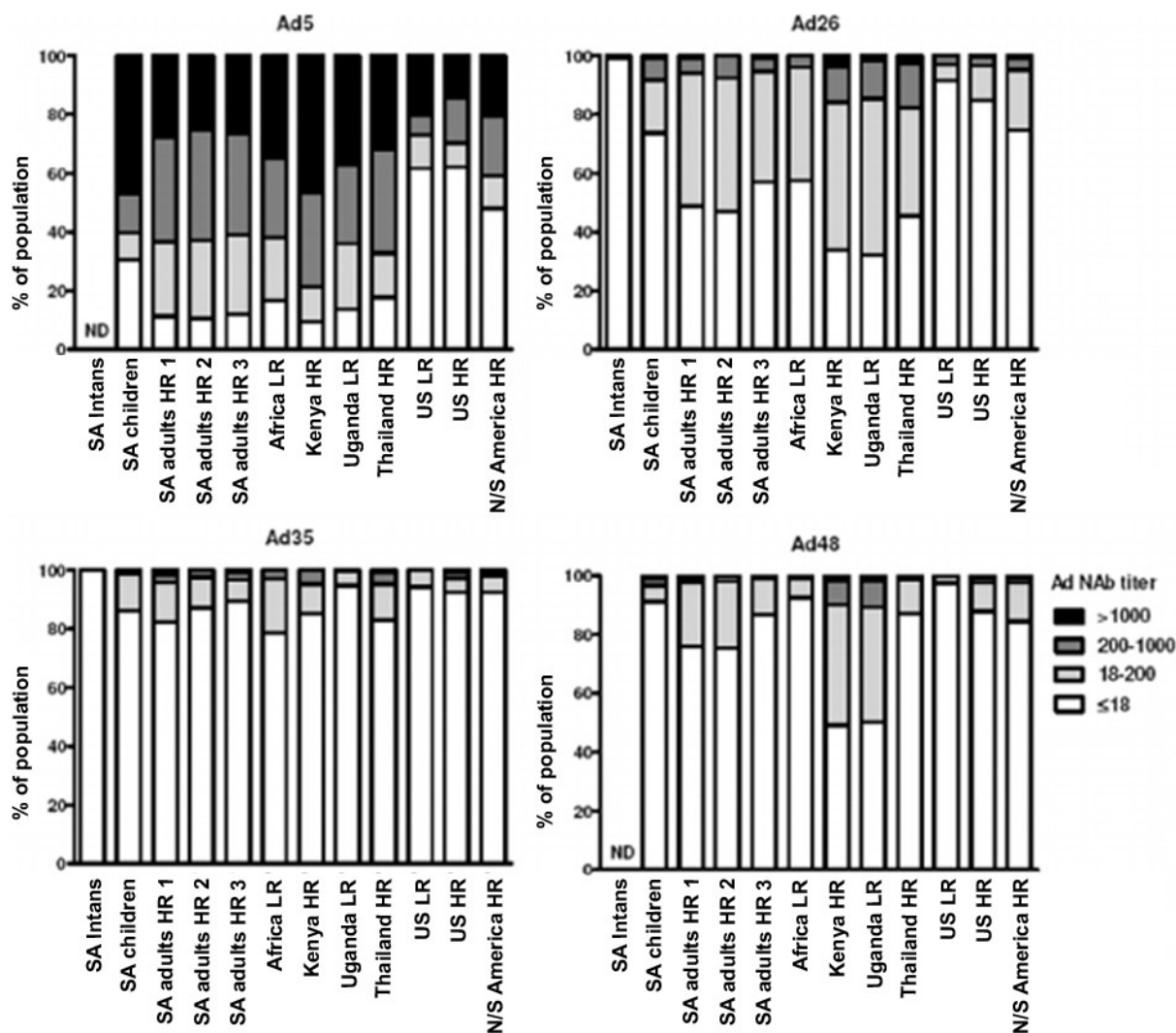
V roce 2014 začalo testování vektoru šimpanzího adenoviru sérotypu 3 (ChAd3) v monovalentní a bivalentní verzi. Monovalentní verze ChAd3 kóduje jen GP ZEBOV, bivalentní verze kóduje GP ZEBOV i GP SEBOV. Při přípravě ChAd3 byl z wild type šimpanzího adenoviru odstraněn gen E1 a gen E4, oba se podílejí na virové replikaci a transkripci. Gen E1 byl pak nahrazen genem pro GP eboly, viz obr. č. 6 (De Santis *et al.*, 2016).

Vakcína ChAd3 je bezpečná. Nežádoucí účinky jsou běžné a nejsou závažné, přibližně u poloviny naočkovaných se vyskytla do 24 h po očkování nevolnost, únava a bolesti hlavy, 30 % z celkového počtu mělo zvýšenou teplotu. Veškeré problémy po očkování brzy odezněly. Jediná dávka vyvolala imunitní odpověď téměř u všech naočkovaných, konkrétně u 96 % a protilátky v těle přetrvávaly ještě 6 měsíců po očkování, po 10 měsících už byla jejich hladina velmi nízká. ChAd3 vakcína vyvolala zvýšení hladiny IgG protilátek proti antigenu ZEBOV a neutralizačních protilátek na podobnou hladinu jako rVSV-ZEBOV (De Santis *et al.*, 2016).

Ve fázi I se pro ChAd3 testovala dávka  $1 \times 10^{10}$  virových partikulí (pu) a  $1 \times 10^{11}$  pu. Dávka  $1 \times 10^{10}$  pu je z hlediska bezpečnosti lepší pro lidský organismus, ale dávka  $1 \times 10^{11}$  vyvolá mnohem silnější imunitní reakci a nežádoucí účinky jsou stejné jako výše popsané. Dávka  $1 \times 10^{11}$  se tedy jeví jako lepší varianta, ještě ale bude třeba přesnou výši dávky potvrdit ve fázi III (De Santis *et al.*, 2016).

Výhodou vakcíny rAd5 je možnost uchovávání v podobě lyofilizovaného bílého prášku, tím pádem je mnohem více stabilní a odolná jak při transportu do cílové destinace, tak i při následném skladování. Vakcína ChAd3 se podobně jako rVSV/ZEBOV obvykle ukládá při nízkých teplotách okolo  $-60^{\circ}\text{C}$  (Zhu *et al.*, 2015).

Hlavní nevýhodou rAd5 je problém s již vytvořenou imunitou proti Ad5. Například 50 % obyvatel Severní Ameriky a 90 % populace rozvojových zemí už má vytvořené neutralizační protilátky proti Ad5. Preexistující protilátky proti Ad po naočkování adenovirovým vektorem stimulují silnější imunitní odpověď a to může vést až k závažným vedlejším imunitním reakcím. Dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, snížení množství trombocytů v krvi a vše může vést až k poškození jater (Ahi *et al.*, 2011). Preexistující protilátky zároveň zkracují a snižují účinnost vakcíny. Zvýšením dávky vakcíny rAd5 se dá tento problém vyřešit, ale takto dostatečně vysoká dávka ( $1 \times 10^{13}$  virových partikulí) může být pro NHPs i člověka toxická. Proto je v současné době snaha vytvořit vakcínu na bázi vektoru jiného lidského adenoviru než Ad5, např. Ad26 nebo Ad35. U těchto adenovirů je totiž míra již dříve vytvořených neutralizačních protilátek mnohem nižší než u Ad5, viz obr. č.2. Dalším řešením je vytvoření vakcíny na bázi zvířecích adenovirů, vakcína ChAd3 byla vytvořena právě proto, aby se obešel problém s preexistující imunitou proti Ad5. (Richardson *et al.*, 2010).

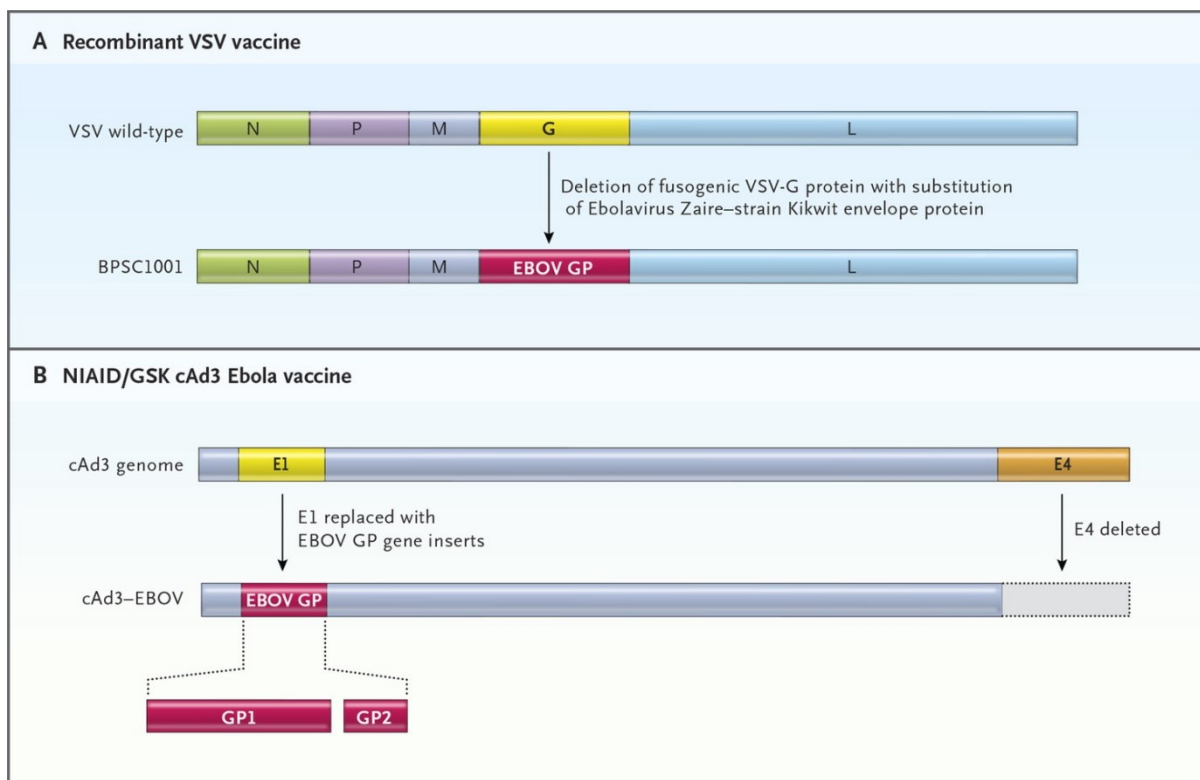


Obrázek č. 5: Míra již dříve vytvořených neutralizačních protilátek proti Ad5, Ad26, Ad35 a Ad48 u různých populací. Zkratka SA znamená jižní Afrika, HR značí skupinu s vysokým rizikem nákazy virem HIV, LR značí skupinu s nízkým rizikem infekce HIV. Zdroj obrázku: Barouch et al., 2011

Podle GSK a clinicaltrials.gov je vakcína ChAd3 aktuálně ve fázi III testování a vakcína rAd5 ukončila v červenci 2016 fázi II. Zároveň podle clinicaltrials.gov právě nyní probíhá fáze I/1b testování vakcíny bivaletní vakcíny ChAd3, chránící proti kmenům ZEBOV a SEBOV, podpořenou vakcínou MVA. Konec této fáze testování je plánován na prosinec 2017. Účinek vakcín založených na vektoru adenoviru může být zesílen pomocí výše zmíněné vakcíny MVA, konkrétně MVA-BN-FILO. To znamená, že se jedná o poxvirový vektor založený na modifikovaném vakcinia viru Ankrara (MVA) kódující glykoproteiny ZEBOV, SEBOV, MARV a nukleoprotein TAFV. MVA-BN-FILO podpoří účinek základní vakcíny tím, že zesílí imunitní odpověď T-lymfocytů i tvorbu neutralizačních protilátek (Ewer et al., 2016). Testuje se kombinace ChAd3 s MVA-BN-FILO a nebo Ad26 s MVA-BN-FILO. Ad26 vakcína je vektorem lidského adenoviru sérotypu 26 (Ad26 - ZEBOV) kódující povrchový glykoprotein



ZEBOV. Při přípravě Ad26 byly odstraněny geny E1 a E3, vznikl tak vektor neschopný dokončit replikaci. Při testování se používá monovalentní forma Ad26. MVA-BN-FILO je testována v polyvalentní formě a je neschopná replikace. Pacient je nejprve naočkován ChAd3, případně Ad26 a poté je účinek vakcíny podpořen MVA-BN-FILO. Ad26 způsobuje silnou imunitní odpověď a pokud je navíc podpořena dávkou MVA, prodlužuje a zvyšuje odolnost proti infekci virem Eboly, stejně tak funguje MVA s ChAd3. U více než 90 % očkovaných se vytvořily specifické IgG protilátky proti GP ZEBOV do 4 týdnů po naočkování a u 55 % se vytvořily specifické T lymfocyty. Místo šesti měsíců protilátky byly v krvi minimálně osm měsíců po naočkování první vakcínou (Ad26 nebo ChAd3), u některých jedinců až deset měsíců. V průběhu testování se nevyskytly žádné závažnější nežádoucí účinky (Milligan *et al.*, 2016). Za kombinací vakcín Ad26 a MVA-BN-FILO stojí firma Johnson&Johnson a v dubnu 2016 byla dokončena první fáze testování, aktuálně probíhají další fáze testování. O využití kombinace těchto vakcín se uvažuje především u skupin lidí žijících a pracujících v rizikových oblastech, kteří jsou opakovaně vystavováni možné infekci virem a proto potřebují dostatečně silnou a dlouhodobou ochranu proti Ebole (Tapia *et al.*, 2016).



Obrázek č.6: Porovnání genových delecí a úprav při přípravě rVSV a ChAd3 vakcín, zdroj obrázku: Kanopathipillai *et al.*, 2014

### 5.3 DNA VAKCÍNY

V současné době je ve fázi I testovaná DNA vakcína VRC-EBO DNA023-00-VP vytvořená společností VRC. Vakcína obsahuje dva plazmidy, VRC 6611 exprimující wt GP SEBOV a VRC 6614 exprimující GP EBOV, oba ve stejném poměru. Oba plazmidy obsahují komplementární DNA, které byly použity při klonování wt GP genu vloženého do CMV/R plazmidové DNA exprimujícího vektoru (Sarwar *et al.*, 2015). CMV/R vektor obsahuje enhancer a promotor lidského Cytomegaloviru a k tomu byl přidán regulační R region HTLV-1 (lidský T-lymfotropní virus typ 1) (Barouch *et al.*, 2005). Plazmidy VRC 6611 a VRC6614 byly vyprodukovány pomocí bakterie *Escherichia Coli*, která byla kultivována na selekčním médiu pro kanamycin. Za rezistenci na kanamycin je zodpovědný protein kódovaný plazmidovou DNA a díky kultivaci na tomto selekčním médiu je možné rozlišit bakterie obsahující plazmid VRC 6611 a 6614 od bakterií bez těchto plazmidů (Sarwar *et al.*, 2015). Oba plazmidy nejsou schopny replikace v lidských buňkách a jejich sekvence aminokyselin pro GP antigeny je shodná se sekvencí aminokyselin pro wt GP EBOV (Sarwar *et al.*, 2015). Vakcína má na svém plazmidovém DNA konstruktě geny kódující tyto proteiny, geny kódující GP ZEBOV obsahují delecii v transmembránové oblasti GP a touto delecí je zabráněno možnému poškození buněk, které se vyskytovalo při pokusech používajících plazmidy exprimující wt GP (Martin *et al.*, 2006).

DNA vakcíny obecně vyvolávají silnou CD4+ imunitní odpověď, která je spojena s dlouhodobou imunitou. Ve studii provedené Kibuuka a kol. v roce 2015 bylo dokázáno, že imunitní odpověď CD4+ T lymfocytů na vakcínu trvala ještě minimálně 1 rok po naočkování. DNA vakcíny se také jeví jako vhodná základní vakcína (priming vaccine) posílená další vakcínou, konkrétně se uvažuje o možnosti kombinace s ChAd3 (Kibuuka *et al.*, 2015).

### 5.4 VLPs - VIRUS LIKE PARTICLES

VLPs jsou neinfekční obalené nanočástice bez genomu složené ze strukturních proteinů viru. VLPs používané do vakcín proti EBOV obsahují na svém povrchu GP ZEBOV nebo VP40 ZEBOV. V minulosti byly vytvořeny hybridní VLPs obsahující heterologní molekuly GP a VP40 z EBOV a MARV, tyto hybridní VLPs ale nezajistily úplnou ochranu proti EBOV a MARV zároveň. Proto byla vytvořena polyvalentní vakcína obsahující eVLP a mVLP, poskytující u morčat ochranu více než 90% (Swenson *et al.*, 2005).

VLPs jsou produkovány savčími a hmyzími buňkami, které byly transfekovány plazmidovými vektory kódujícími GP a VP40 EBOV. Použití hmyzích buněk je lepší pro masovou produkci z hlediska nákladů na přípravu VLPs. VLPs jsou vysoce imunogenní, nemají genom a morfologicky jsou velmi podobné virům, od nichž jsou odvozeny. VLPs jsou produkovány např. lidskými buňkami 293T (lidské embryonální buňky ledvin), které jsou transfekovány

plazmidovým vektorem pWRG7077 kódujícím GP a VP40 EBOV. V buňkách Vero E6 došlo k pomnožení virů EBOV Zaire 1995 a MARV Musoke, tyto viry byly posléze inaktivovány ozářením. Po transfekci 293T buněk došlo k produkci částic morfologicky i antigenně podobných EBOV s tím rozdílem, že tyto částice neobsahovaly virové geny potřebné pro replikaci. VLPs jsou díky absenci RNA genomu bezpečné a neinfekční, tudíž mohou být jedincům podávány opakovaně. Jejich další velkou předností je, že prezentují virové glykoproteiny v jejich nativní konformaci, což usnadňuje tvorbu a aktivaci neutralizačních protilátek (Warfield *et al.*, 2003).

Jednou z vakcín založenou na VLPs je vakcína 2014 EBOV/Makona, která se od GP kmene 1995 EBOV/Kikwit liší o 17 aminokyselinových záměn a od GP kmene 1976 EBOV/Mayinga o 20 aminokyselinových záměn. Gen kódující GP EBOV byl naklonován a vložen do bakulovirového vektoru rBV-GP. rBV-GP byl použit k infekci hmyzích buněk Sf9, v nich došlo k expresi rBV-GP. Poté byly z Sf9 buněk izolovány nanočástice GP EBOV o velikosti 30-40 nm. Stejný postup lze provést i s genem kódujícím VP40 EBOV (novavax.com). Vakcína je při teplotách 25°C stabilní více než 2 měsíce, optimální teplota uchovávání je 2-8°C. Očkuje se ve dvou dávkách, přičemž rozmezí podání dávek je 21 dní a jedna dávka tvoří 5 µg. U NHPs byla prokázána přítomnost protilátek více než tři měsíce po očkování (novavax.com). Tato vakcína byla vyvinuta firmou Novavax a dokončila v dubnu 2016 fázi I testování. Byla podávána společně s Matrix-M, pomocnou látkou založenou na saponinu, která zajišťuje CD4+ a CD8+ imunitní odpověď (clinicaltrials.gov). Tato vakcína podle clinicaltrials.gov dokončila v dubnu 2016 fázi I.

Další vakcínou založenou na VLPs je vakcína složená z KUN VLPs. KUN znamená Kunjin virus, Australský podtyp WNV(west nile virus) patřící do čeledi Flavivirů. KUN VLPs obsahují enkapsidované KUN replikony neboli RNA replikon Kunjin viru. Replikon představuje oblast genomu, která je tvořena iniciačním bodem pro replikaci a tou částí nukleové kyseliny, která je z tohoto místa replikována. KUN VLPs mohou infikovat a tím doručit replikonovou RNA do většiny savčích buněk včetně dendritických buněk. Při přípravě KUN replikonů byla odstraněna většina oblasti kódující strukturní geny. Tyto odstraněné strukturní geny v replikonové RNA jsou nahrazeny genem pro GP EBOV, který je pak exprimován ve velkém množství díky samoreplikujícímu se charakteru replikonu RNA. Sekvence kódující wt GP EBOV Zaire byla naklonována do SP6 promotor KUN replikon vektoru (=SP6KUNrep5). Samotné KUN VLPs pak byly vytvořeny pomocí transfekce odpovídajících replikonových RNA pomocí Vero buněk (Reynard *et al.*, 2011).

V souvislosti s KUN VLPs probíhá v současnosti výzkum ohledně použití koňských IgG pro ochranu před EBOV. Koňe byli naočkováni plazmidovou DNA kódující GP EBOV a její účinek byl podpořen KUN VLPs, také kódujících GP EBOV. Konkrétně byly použity KUN VLPs s D637L mutací, které zajistily ve studiích větší ochranu než VLPs kódující wt GP

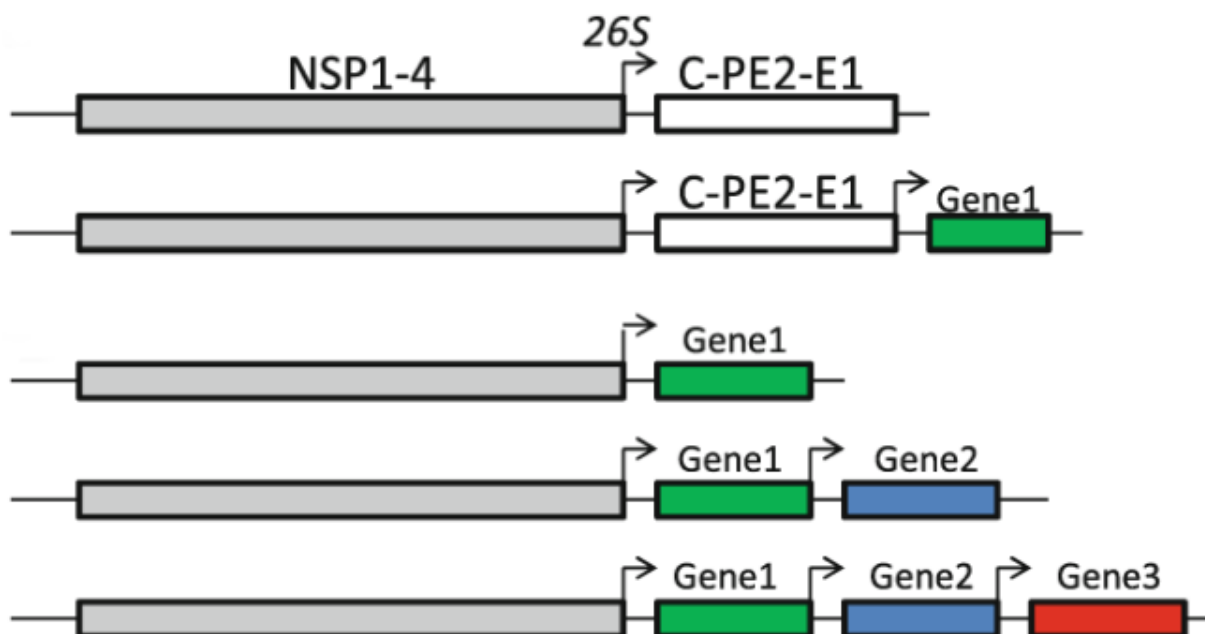
EBOV. Po této vakcinaci začal koňský imunitní systém produkovat IgG proti EBOV, které byly z koní izolovány a poskytnuty makakům 24 hodin po tom, co byla makakům vpravena smrtelná dávka EBOV. Tyto koňské IgG ochránily makaky před smrtí a byly testovány i na morčatech, která byla při postexpoziční profylaxi EBOV díky těmto IgG také chráněna. Při použití koňských IgG se u některých pacientů objevily alergické reakce jako anafylaxe a sérová nemoc. Po upravení protokolu pro výrobu koňských IgG s důrazem na důkladnou purifikaci došlo ke zlepšení výsledků. Dostatečně purifikované IgG způsobují alergické reakce jen velmi zřídka. Koňské IgG a jejich bezpečnost se tedy dále budou testovat jako jeden z dalších možných kandidátů na ochranu při postexpoziční profylaxi EBOV (Pyankov *et al.*, 2017).

## 5.5 VEEV VAKCÍNY

Jedná se o RNA replikonové částice založené na oslabeném VEEV (= Venezuelan equine encephalitis virus), exprimující na svém povrchu GP a NP EBOV. Vakcína je také označována jako VRP vakcína, což znamená VEEV replicon particle a byla zatím testována u NHPs. VRP exprimují na svém povrchu buď GP SEBOV nebo GP ZEBOV. Existují dva typy VRP, první obsahuje vektor se dvěma promotory 26S a geny pro GP EBOV jsou vloženy „downstream“ od zduplikovaného promotoru 26S, viz obr.č.7. U tohoto typu vektoru probíhá transkripce strukturních genů VEEV a zároveň i transkripce genů pro GP a NP EBOV, jeden promotor slouží pro iniciaci transkripce strukturních genů a druhý pro iniciaci transkripce vložených genů (Davis *et al.*, 1996). Tento typ vektoru je v hostitelských buňkách schopný replikačního cyklu bez omezeného počtu. Druhý typ, replikonové vektory, obsahuje pouze jeden promotor. VEEV strukturní geny byly odstraněny a „downstream“ od 26S promotoru nahrazeny heterologními geny pro GP SEBOV a ZEBOV. Odstranění strukturních genů VEEV zajistí, že v hostitelských buňkách proběhne jen jeden replikační cyklus VRP a jejich odstraněním se zároveň minimalizuje imunitní reakce proti vektoru (Pushko *et al.*, 2000).

Obě vakcíny exprimující GP SEBOV nebo GP ZEBOV mohou být používány společně, aby vytvořily ochranu proti SEBOV i ZEBOV (Pushko *et al.*, 2000).

VRP, společně s vakcínami založenými na vektoru adenovirů a VSV, jsou zatím jediné vakcíny, u kterých byla potvrzena kompletní ochrana u NHPs už po jedné dávce vakcíny. V rámci testování VRP je třeba zjistit přesný mechanismus imunitní odpovědi a zároveň zjistit, na jak dlouho ji vakcína vyvolává (Herbert *et al.*, 2013). I zde, jelikož se jedná o vakcínu založenou na vektoru viru, je riziko již vytvořené imunity proti VEEV, u většiny lidských a zvířecích populací ale nebyla zjištěna již vytvořená imunita proti VEEV (Pushko *et al.*, 2000).



Obrázek č.7: První vlákno představuje RNA VEEV, NSP jsou nonstrukturní proteiny, C-PE2-E1 značí strukturní proteiny. Druhé vlákno představuje vektor s duplikovanými 26S promotory, které jsou označeny šipkami. „Gene1“ by pak v našem případě značil gen kódující GP nebo NP EBOV. Ostatní vlákna pak zobrazují, že lze přidat více genů. Zdroj obrázku: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

## 5.6 OSLABENÝ EBOV POMOCÍ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Jako vakcína proti EBOV je testována i oslabená forma EBOV. Již v minulosti byla snaha EBOV oslabit pomocí vysokých teplot, formalinu nebo gama záření, ale žádná z těchto metod nezajistila dostatečnou ochranu před EBOV u NHPs. Gama záření způsobuje hydroxylaci a dehydroxylaci aminokyselin, štěpí polypeptidovou kostru a uvolňuje volné radikály, které mohou poškodit antigenní části epitopů. Tím tedy ovlivňuje antigenitu a tím pádem účinnost vakcíny (Marzi *et al.*, 2015). Novější přístup spočívá v odstranění VP30, nezbytného aktivátoru virové transkripce. cDNA klonu ZEBOV byl odstraněn ORF pro VP30 a nahrazen genem pro neomycin (Halfmann *et al.*, 2008).

Tím vznikl EBOVΔVP30. Po odstranění VP30 sice nebyly zaznamenány žádné mutace nebo rekombinace, ale kvůli obavám z těchto potenciálních nebezpečí byla EBOVΔVP30 ještě upravena pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Byl použit 3% roztok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nechal se působit 4 hodiny na ledu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> způsobí zlomy v DNA nebo RNA a tím inaktivuje virus, aniž by výrazně ovlivnil jeho antigenitu. To zajistilo kompletní inaktivaci viru EBOV. Úprava pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sice také lehce snížila antigenitu EBOV, ale ne nijak výrazně a navíc je mnohem bezpečnější než předchozí verze inaktivovaného EBOV. EBOVΔVP30 upravená pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vyvolala IgG odpověď a

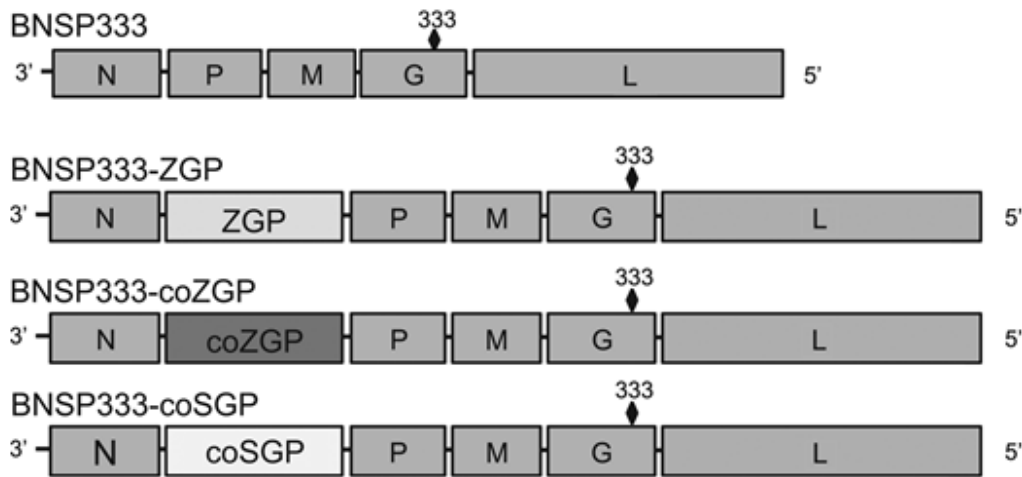
ochránila NHPs před smrtí. Dávka použitá u NHPs byla dvakrát po sobě  $10^7$  PFU, jedna dávka totiž neochránila NHPs před samotnou infekcí, ale všechna zvířata i tak přežila (Marzi *et al.*, 2015).

Velkou výhodou této vakcíny je prezentace všech virových proteinů, nejen GP jak je to u většiny ostatních vakcín proti EBOV (Marzi *et al.*, 2015).

## 5.7 RABV/EBOV VAKCÍNA

RABV/EBOV vakcína je založena na RABV, viru vztekliny patřící do čeledi Flaviviry. Existují tři typy vakcíny proti EBOV, RABV schopný replikace, RABV neschopný replikace a chemicky inaktivovaný RABV, všechny exprimující GP EBOV. RABV schopná replikace zajistila u NHPs 100 % ochranu před EBOV, zbylé dvě jen 50 %. Vakcína vektoru RABV exprimujícího GP EBOV se testovala v polyvalentní verzi společně s inaktivovaným RABV. RABV byl inaktivován pomocí beta-propiolaktonu a tato forma se standardně využívá při vakcinaci proti vzteklině u lidí. Testovaná polyvalentní verze pak chrání i před vzteklinou způsobenou RABV, protilátky se u testovaných zvířat vytvořily proti G RABV i proti GP EBOV. V Africe je RABV stále problémem, ročně zde zabije více než 24 000 lidí a proto je snaha o vytvoření polyvalentní vakcíny, která bude chránit proti RABV i EBOV zároveň (Blaney *et al.*, 2013).

Inaktivovaná vakcína je označena jako INAC-BNSP333-GP a k její inaktivaci se také používá beta-propiolakton. Další dvě jsou replikace schopná BNSP333-GP a BNSP333 $\Delta$ G-GP. BNSP333 $\Delta$ G-GP má odstraněn celý gen pro G RABV a není schopná replikace. Výchozí vektor BNSP333 byl vytvořen pomocí změny aminokyseliny 333 G RABV z ARG na GLU. Sekvence kódující GP ZEBOV byla vložena mezi sekvence genů N a P kódujících nukleoprotein a fosfoprotein (viz obr.č.8) (Blaney *et al.*, 2011).



Obrázek č.8: BNSP333 je vektor založený na RABV, druhé vlákno představuje RABV vektor kódující GP ZEBOV, třetí vlákno má vložený gen pro GP ZEBOV a čtvrté gen pro GP SEBOV. Zkratka "co" značí, že při přípravě došlo k optimalizaci kodonů. Zdroj obrázku: Willet *et al.*, 2015

Vzhledem k 50 % účinnosti došlo u inaktivované vakcíny RABV/EBOV k úpravě genu kódujícího EBOV GP pomocí optimalizace kodonů. Optimalizace kodonů znamená změnu kodonů použitých v transgenu pomocí mutace, aniž by došlo ke změně sekvence aminokyselin syntetizovaného proteinu. Dochází k náhradě řídké se vyskytujícími kodony za kodony hojně se vyskytující. Exprese cizorodých proteinů může být nízká a právě optimalizací kodonů se často dosáhne zvýšení míry exprese proteinu, který je kódován genem s optimalizovanými kodony. Tím pádem se zároveň zvýší i efektivita vakcíny. Takto byla upravena předešlá verze BNSP333-ZGP kódující GP ZEBOV na BNSP333-coZGP s optimalizovanými kodony. Optimalizací kodonů se docílilo vyšší exprese EBOV GP u RABV virionů a tím vyšší účinnosti vakcíny u testovaných zvířat (Willet *et al.*, 2015).

Vektor BNSP333-coZGP inaktivovaný beta-propiolaktonem byl nazván jako vakcína FILORAB1. Vakcína FILORAB1 byla u NHPs ve fázi II testována v kombinaci s glukopyranosyl lipidem A (GLA-SE). Použití GLA-SE společně s FILORAB1 zvýšilo účinnost vakcíny na 100% před smrtelnou infekcí EBOV a zároveň se vytvořila dostatečná míra protilátek proti RABV, potřebná pro ochranu před RABV. Pro úplnou ochranu bylo třeba podat 2 až 3 dávky vakcíny. Při testování kombinace těchto látek se nevyskytly žádné vážné vedlejší účinky. Vakcína inaktivovaného RABV může být navíc přetvořena do formy lyofilizovaného prášku, aniž by ztratila antigenitu (Johnson *et al.*, 2016).

Při výzkumu na myších různé typy vakcín dosáhly od 60 % do 100 % úspěšnosti, 60 % měla vakcína BNSP333-GP, všechny ostatní typy měly 90-100 % úspěšnost. FILORAB1 je díky omezenému růstu, snížené neurovirulenci a zároveň účinné ochraně proti RABV i EBOV infekci zvažována pro použití při očkování divokých zvířat, především NHPs. Zároveň je

velkou výhodou i možnost orální aplikace této vakcíny. FILORAB1 je vytvořena na základě oslabené SAD B19 vakcíny schopné replikace, založené také na RABV, ale při přípravě FILORAB1 byl navíc do SAD B19 vložen gen kódující GP EBOV. Nad v současnosti používanou SAD B19 má FILORAB1 výhodu vyšší bezpečnosti, při testování se nevyskytly žádné vedlejší účinky a FILORAB1 navíc chrání před EBOV i RABV. Prevence u NHPs je důležitá pro omezení přenosu EBOV na lidi a vypuknutí epidemie (Blaney *et al.*, 2011 a Walsh *et al.*, 2017).

Vakcíny RABV/EBOV bude ještě třeba dále testovat, ale už teď je jisté, že celkově jsou RABV vakcíny proti EBOV jedny z nejbezpečnějších dostupných vakcín proti EBOV (Willet *et al.*, 2015)

## 5.8 HPIV 3 VAKCÍNA

Vakcína založená na lidském viru parainfluenzy typu 3 (HPIV3), čeledi Paramyxoviry, exprimující GP ZEBOV je vakcína schopná replikace, i když její schopnost replikace je značně omezená. I zde je rizikem již existující imunita proti vektoru HPIV3 (Bukreyev *et al.*, 2009). V klinických studiích na NHPs byla prokázána jako účinná a asymptomatická (DiNapoli *et al.*, 2010).

EBOV má jen jeden transmembránový povrchový protein GP, HPIV3 má dva – HN (hemaglutinin-neuraminidázu) a F (fúzní protein). Ve studiích se osvědčil HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGP model vakcíny. Ten vychází z původního modelu, HPIV3/EboGP. HPIV3/EboGP byl vytvořen vložením sekvence kódující GP EBOV do genomu HPIV3 mezi geny P a M. Tento modelový vektor na svém povrchu exprimuje tři povrchové proteiny, F HPIV3, HN HPIV3 a GP EBOV. Později byl tento model ještě upraven odstraněním F a HN genů HPIV3 a tím vzniknul nový model HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGP, který kóduje už jen GP EBOV. Ještě existuje model HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGPct, který vychází z HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGP, ale navíc je CT GP EBOV nahrazen CT F proteinu HPIV3. CT je intracelulární doména neboli cytoplasmic tail. Nahrazení CT bylo provedeno kvůli možnosti, že CT GP je kompatibilní s „internal proteins“ (proteiny uvnitř kapsidy) HPIV3 a tato kompatibilita by pak ovlivňovala produkci infekčních částic (Bukreyev *et al.*, 2009).

Odstraněním genů pro HN a F došlo ke zrušení kompetice mezi HN a F proteiny a to, společně s přítomností pouze GP EBOV jako povrchového proteinu, vedlo k silnější imunitní reakci. HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGP je výhodnější než HPIV3/EboGP i kvůli tomu, že odstraněním HN a F genů by měla být vakcína více odolná vůči již dříve vytvořené imunitě proti HPIV3 a navíc se tímto odstraněním dosáhlo i ještě většího oslabení vakcíny, proto je HPIV3/ $\Delta$ F-HN/EboGP bezpečnější (Bukreyev *et al.*, 2009). HPIV3/EboGP dokončila v listopadu 2016 fázi I (clinicaltrials.gov).



Vakcína se aplikuje intranazálně, což znamená, že je aplikována na sliznici nosu a nosohltanu. Intranazální aplikace brání přenosu patogenů přenášených krví a také pro tuto formu aplikace vakcíny není třeba vysoce proškolený zdravotnický personál (Bukreyev *et al.*, 2006).

V souvislosti s Paramyxoviry se mluví ještě o vektoru ptačího NDV (Newcastle disease virus), který je založen na stejném principu jako HPIV3 vektor. Uvažuje se o kombinaci NDV a HPIV3 pro podpoření efektu, stejně jako je to u Ad26 společně s MVA (DiNapoli *et al.*, 2010).

## **5.9 GAMEVAC-COMBI VAKCÍNA**

Jedná se o heterologní vakcínu tvořenou vektorem VSV a Ad5 kódujících GP ZEBOV proti Ebole. Tato heterologní vakcína zajišťuje silnější imunitní reakci než samotná homologní vakcína rVSV. rAd5 zde v tomto případě funguje jako zesilovač účinku. Ve studiích byla kombinována dávka  $2,5 \times 10^7$  PFU VSV a  $2,5 \times 10^{11}$  virových částic rAd5. U všech naočkovaných pacientů vyvolala vakcína zvýšení hladiny protilátek proti ZEBOV do 28 dnů po očkování (Dolzhikova *et al.*, 2017). Podle clinicaltrials.gov probíhá fáze IV testování, která by měla být ukončena v červenci 2019.

## **6. LÉKY**

### **6.1 LÉKY, U KTERÝCH PROBÍHÁ VYHODNOCOVÁNÍ KLINICKÝCH TESTŮ**

#### **6.1.1 FAVIPIRAVIR**

Favipiravir je nukleotidový analog inhibující virovou RNA dependentní RNA polymerázu (Sangawa *et al.*, 2013). Favipiravir byl vytvořen v Japonsku, kde už byl i schválen pro léčbu chřipky. Při klinických testech pro použití proti chřipkovému viru byla dokázána jeho bezpečnost pro lidi a jeho aktivita proti EBOV byla dokázána u myší (Sissoko *et al.*, 2016). Testování Favipiraviru začlo na přelomu roků 2014/2015 v Guinee a bylo pojmenováno jako JIKI trial. Lék byl podáván pacientům s EVD (ebola virus disease) orálně a léčba trvala 10 dní. První den dostali pacienti dávku 6 g, dalších zbývajících 9 dní dostali dávku 2,4 g. Jedna tableta obsahuje 200 mg léčiva, první den tedy pacient musí spolknout 30 tablet (WHO,2015b).

Výsledky JIKI trial ukazují, že úmrtnost významně souvisela s mírou virémie a monoterapie (léčba jedním lékem) bude pravděpodobně málo účinná u pacientů s vysokou virémií. Další výzkum ohledně Favipiraviru by měl být zaměřený hlavně na pacienty se střední až vysokou virémií, konkrétně na pacienty s hodnotou  $C_T \geq 20$  nebo pacienty s virovou nákazou pod

$10^8$  kopií genomu na ml krve. Při klinických testech byla nejnižší mortalita právě u pacientů s  $C_T \geq 20$  a v průběhu léčby u nich výrazně klesla virémie. U skupiny s  $C_T \geq 25$  pak všichni pacienti přežili. Naopak pacienti s  $C_T < 20$  měli 90% úmrtnost a virémie v průběhu léčby neklesla, tudíž se nepředpokládá, že by další výzkum u těchto pacientů přinesl úspěch.

60 účastníků testů zemřelo, 51 přežilo. Všichni účastníci testu dostali Favipiravir.

U neléčených pacientů se za hraniční hodnotu považuje počet  $10^6$  kopií viru na ml krve. U pacientů, kteří mají více než  $10^6$  kopií viru na ml krve, je pravděpodobnost přežití menší než 15%, u pacientů s počtem kopií  $10^5$  na ml krve je pravděpodobnost přežití méně než 40%. Úmrtnost u pacientů s počtem nad  $10^6$  kopií na ml krve byla 60,37%, u pacientů s počtem pod  $10^6$  kopií na ml krve byla 39,02% (Ji *et al.*, 2016).

U přeživších uběhlo od počátku účinkování Favipiraviru do odeznění příznaků nemoci průměrně 9 dní. Část pacientů dostala první dávku Favipiraviru do 72 hodin po projevení prvních příznaků, druhá část pacientů obdržela Favipiravir po více než 72 hodinách od prvních projevů infekce, ale u těchto dvou skupin nebyl žádný rozdíl v hodnotách  $C_t$  (Sissoko *et al.*, 2016).

### 6.1.2 ZMAPP

ZMapp se skládá z tří monoklonálních chimerických protilátek (mAbs) c13C6, c2G4 a c4G7. Všechny rozeznávají a cílí na povrchový glykoprotein EBOV kmene Zaire. Bylo prokázáno, že tyto mAbs jsou schopny neutralizovat viriony EBOV *in vitro* (Whitmer *et al.*, 2016). mAbs jsou chimerické, to znamená, že část protilátky odpovídající za kontakt s antigenem je myšího původu, zbytek protilátky je lidského původu. mAbs byly vyprodukovány geneticky upraveným tabákovníkem *Nicotiana benthamiana* (Davidson *et al.*, 2015).

Při testování na NHPs byl ZMapp schopen ochránit 100% testovaných zvířat, pokud byl podán do 5 dní po vystavení EBOV. Testování ZMappu právě probíhá v Libérii pod názvem PREVAIL trial. Výsledky druhé fáze PREVAIL trial ukázaly, že ze 36 pacientů, kteří obdrželi ZMapp nepřežilo osm pacientů. To znamená, že míra úmrtnosti byla 22%. Zároveň se u pacientů, kteří obdrželi ZMapp nevyskytly žádné vedlejší účinky, ZMapp se tedy jeví jako velmi bezpečný lék (The PREVAIL II Writing Group, 2016).

### 6.1.3 TKM-100802

Při výrobě účinné látky pro léčbu infekce EBOV se používají i siRNA, které cílí na ZEBOV RNA polymerázu L proteinu. Tyto siRNA jsou enkapsulovány do stabilních částic z lipidů a nukleových kyselin (SNALPs). Do SNALPs byla vložena kombinace tří siRNA, EK-1 cílicí na RNA polymerázu L proteinu kmene ZEBOV, VP24-1160 cílicí na VP24 a VP35-855 cílicí na VP35. Už samotná EK-1 byla schopna zabránit replikaci ZEBOV a tím ochránit morčata infikovaná ZEBOV. V současných studiích na NHPs se ale využívá směs tří výše uvedených

siRNA, díky čemuž je virus inaktivován ve třech různých stádiích jeho životního cyklu. Tato směs už prošla částí klinických testů, při kterých byla schopna ochránit makaky před smrtí vlivem EBOV (Geisbert *et al.*, 2010).

Kombinace siRNA EK-1, VP24-1160 a VP35-855 byla označena jako TKM-100802. Jedná se o inhibitor RNA, schopný katalyticky štěpit virovou RNA uvnitř buňky (Kraft *et al.*, 2015).

Podle WHO a clinicaltrials.gov je aktuálně testování této látky pozastaveno, jelikož se při klinických testech ve fázi I u testovaných jedinců vyskytly vedlejší účinky jako je nevolnost, bolest na hrudi a zrychlený srdeční tep.

## **6.2 LÉKY PRO KTERÉ BRZY ZAČNOU KLINICKÉ TESTY**

### **6.2.1 MIL-77**

MIL-77 je lék, který je založen na Zmapp. Jedná se o směs 2 monoklonálních protilátek 13C6 a 2G4. Narozdíl od Zmapp jsou ale protilátky tvořící MIL-77 produkovány modifikovanými CHO buňkami, díky čemuž dochází k izolaci většího množství protilátek, než je tomu z tabákovníku. I účinnost se zatím ukazuje podobná jako u Zmapp, léky byly ale zatím zkoušeny jen u NHPs (Zheng *et al.*, 2016). Také je potřeba ještě více prozkoumat samotné CHO buňky, jejichž kompletní charakteristika zatím není dokončena (WHO,2015b).

### **6.2.2 AVI-7537**

Další možností léčby infekce způsobenou EBOV jsou PMO. PMO znamená fosfordiamidové morfolino-oligomery, které jsou velmi odolné proti degradaci. Jsou to syntetické molekuly, podobné nukleovým kyselinám. PMO fungují jako sterické blokátory vázající se na RNA a tím blokují navázání jiných molekul, například složek podílejících se na sestřihu nebo na translaci. Tímto mechanismem jsou schopné inhibovat genovou expresi EBOV. Do buněk vstupují PMO konjugací pomocí peptidů schopných penetrovat buňky (PPMO). PMO pro léčbu EBOV byly navrženy tak, aby odpovídaly genové sekvenci EBOV ( L,VP24, VP30, VP40, VP35, GP a NP) a aby byly schopné vázat virovou RNA.

Nejefektivnější je, když PMO působí v místě iniciace translace. Proto se předpokládá, že pro EBOV bude nejefektivnější PMO cílící na VP35 a VP24, které také u myši ukázaly větší míru přeživších. V poslední době se testuje hlavně PMO cílící na VP24, známý pod názvem AVI-7537. AVI-7537 je PMO oligomer, který se váže přímo do transkriptu VP24 RNA. VP24 protein inhibuje odpověď interferonů prvního typu, takže inhibice VP24 vede i ke zvýšení hostitelské imunitní odpovědi. VP24 také tvoří homodimery vázající VP35 nebo NP. VP35 a NP jsou důležité při přechodu z virové replikace do virové transkripce, což je klíčový bod v životním cyklu viru a AVI-7537 by tím pádem mohl mít vliv právě na tento klíčový bod (Iversen *et al.*, 2012).

### 6.2.3 BCX-4430

BCX-4430 je syntetický adenosinový analog. Inhibuje aktivitu virové RNA polymerázy tím, že se chová jako “non obligate RNA chain terminator” vázající se na konec RNA. Non obligate RNA chain terminátor způsobí, že se právě začleněný nukleotid chová jako terminátor. I když by RNA mohla být dále elongována, dojde k předčasné terminaci transkripce a replikace virové RNA (Potisopon *et al.*, 2016). K celému mechanismu je potřeba anabolismus původní sloučeniny na BCX4430-trifosfát (BCX4430-TP), který se pak po odštěpení dvou pyrofosfátů jako BCX4430-monofosfát začlení do vznikajícího vlákna virové RNA a tím způsobí, že se poslední začleněný nukleotid chová jako terminátor (Warren *et al.*, 2014).

Mimo výzkumu EBOV se BCX-4430 zkoumal i v souvislosti s léčbou žluté zimnice (Julander *et al.*, 2014).

### 6.2.4 rNAPc2

rNAPc2 je látka, která tlumí zánět, zabraňuje srážení krve a celkově zmírňuje příznaky nákazy. Jedná se o rekombinantní protisrážlivý protein c2 hlístic (Nematoda), původně izolován ze slin měchovce *Ancylostoma caninum*. rNAPc2 je protein složen z 85 aminokyselin, inhibitor serinové proteázy, který přímo inhibuje katalytický komplex aktivujícího faktoru fVIIa/TF (Lee *et al.*, 2001). fVIIa je tkáňový faktor spouštějící srážení krve. Protisrážlivý efekt způsobený inhibicí fVIIa faktoru pomocí rNAPc2 byl již prokázán při klinickém testování během fáze II při ortopedických operacích a náhradách cév (revaskularizace) a při léčbě klinické trombózy. Zároveň bylo při tomto testování dokázáno, že je rNAPc2 pro lidi bezpečný. Ve studiích týkajících se EBOV byl rNAPc2 zatím podán makakům, přičemž přežilo 33% testovaných makaků (Geisbert *et al.*, 2003).

## 6.3 LÉKY SE SLIBNÝMI ÚČINKY PROTI EBOV, U KTERÝCH ALE BYLA NA ZÁKLADĚ NEJNOVĚJŠÍCH DAT POZASTAVENA MOŽNOST SPUŠTĚNÍ KLINICKÝCH TESTŮ V BLÍZKÉ DOBĚ

### 6.3.1 BRINCIDOFOVIR

Brincidofovir je nukleotidový analog, konjugát cidofoviru. Cidofovir je taktéž nukleotidový analog, který tvoří nitrobuněčný substrát kompetující s virovou DNA polymerázou, je tedy účinný proti dsDNA virům. Cidofovir byl výchozí látkou pro brincidofovir, který taktéž účinkuje proti dsDNA virům (Dunning *et al.*, 2016). Původně byl vytvořen proti CMV- cytomegaloviru, ale *in vitro* byla zjištěna i aktivita proti EBOV. V roce 2015 bylo v Libérii zahájeno testování, fáze I ale skončila předčasně jednak kvůli nedostatku pacientů ochotných se nechat testovat a hlavně kvůli stažení této látky z testů samotnou firmou Chimerix, USA, která ji navrhla. Veškeré testování je v současné době přerušeno (WHO, 2015b).

### 6.3.2 KREVNÍ PLASMA REKONVALESCENTŮ

Plazma rekonvalescentů již byla využita při testování léčení infekce virem ptačí chřipky H5N1. Při léčbě eboly byla plazma rekonvalescentů využita poprvé v Kikwitu v roce 1995, kdy pět uzdravujících se pacientů po nákaze EBOV darovalo krev osmi pacientům prodávajícím infekci EBOV. U těchto osmi pacientů byly v krvi diagnostikovány EBOV antigeny. Krev přeživších pacientů obsahovala IgG a IgM protilátky proti EBOV a neobsahovala žádné EBOV antigeny. Pacienti, kteří obdrželi transfuzi, prodělali infekci s podobnými příznaky, které jsou typické pro nákazu EBOV (Mupapa *et al.*, 1999). Úmrtnost byla 12,5%, tzn. přežilo sedm z osmi pacientů. Všechny přeživší pacienty obdrželo krevní transfuzi druhý týden infekce EBOV. Pacient, který zemřel, obdržel transfuzi již 4. den nákazy EBOV (Kraft *et al.*, 2015).

Během roku 2015 probíhaly v Libérii a Guinei fáze II a III testování, testování ale bylo pozastaveno kvůli nulovým případům nákazy EBOV (WHO,2015a).

Plazma rekonvalescentů potřebuje další testování, každopádně to není standardní forma léčby. Je třeba mít k dispozici krev pacientů zotavujících se z nákazy EBOV a zároveň se neví, jak moc se plazma podílela na uzdravení, případně která její složka konkrétně (Kraft *et al.*, 2015).

## 7. ZÁVĚR

V současnosti probíhá testování několika vakcín a léků, které se jeví velmi nadějně pro léčbu EVD. Většina vakcín je připravena na principu oslabeného virového vektoru exprimujícího na svém povrchu GP EBOV. Některé z vakcín a léků by se v případě vypuknutí další epidemie již daly použít. Z vakcín to jsou rVSV-ZEBOV a ChAd3, z léků pak ZMapp a Favipiravir.

Vakcíny ChAd3 a rVSV-ZEBOV jsou dva nejvíce diskutované a pravděpodobně zatím nejvhodnější kandidáti, jejich výhody byly popsány výše, co se nevýhod týče, u rVSV-ZEBOV je nejvíc diskutována bezpečnost. rVSV vakcína je sice tvořena oslabeným virem, který je ale pořád schopný replikace, což sice výrazně zvyšuje účinnost vakcíny, ale zároveň to může představovat potenciální nebezpečí pro očkovaného pacienta. To dokazují i vedlejší účinky, které byly u rVSV vážnější než u ChAd3, např. artritida a kožní léze. Snížení dávky rVSV na eliminaci nežádoucích účinků nemělo vliv. ChAd3 sice není schopná úplné replikace, ale její nevýhodou je možnost, že část lidské populace již ve svém těle má protilátky proti adenovirovému vektoru a to by oslabilo účinnost vakcíny. U ChAd3 není míra těchto již vytvořených protilátek tak vysoká jako u Ad5, i tak je ale potřeba získat další poznatky v dalších fázích výzkumu. U rVSV vakcíny je míra již existujících protilátek v organismu zanedbatelná (Geisbert *et al.*, 2008).

Výhodou Favipiraviru je fakt, že je již schválen v Japonsku pro léčbu chřipky a proto je k dispozici dostatek dat ohledně bezpečnosti. Nevýhodou tohoto léku je účinnost podle hodnot  $C_T$ , na průběh infekce u pacientů s  $C_T < 20$  Favipiravir neměl žádný vliv. (Sissoko *et al.*, 2016). Lék ZMapp ještě potřebuje další testování, výhodou je jeho bezpečnost prokázaná v probíhajícím testování PREVAIL trial. I jeho účinnost se jeví poměrně dobře, úmrtnost při podání ZMappu dosáhla 22% (The PREVAIL II Writing Group, 2016).

Zároveň se neustále vyvíjí a testuje další množství léčiv a s trochou štěstí je více než pravděpodobné, že na další epidemii EVD již bude svět připraven s účinnou vakcínou pro prevenci a efektivní možnosti léčby osob infikovaných EBOV.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou.

Agnandji, Selidji T., Angela Huttner, Madeleine E. Zinser, Patricia Njuguna, Christine Dahlke, José F. Fernandes, Sabine Yerly, et al. 'Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe'. *New England Journal of Medicine* 374, no. 17 (28 April 2016): 1647–60. doi:10.1056/NEJMoa1502924.

\*Ahi, Yadvinder S., Dinesh S. Bangari, and Suresh K. Mittal. 'Adenoviral Vector Immunity: Its Implications and Circumvention Strategies'. *Current Gene Therapy* 11, no. 4 (August 2011): 307–20.

Alphavirus Replicon Vectors for Prophylactic Applications and Cancer Intervention.

*ResearchGate*. Accessed 19 April 2017.

[https://www.researchgate.net/publication/286088380\\_Alphavirus\\_Replicon\\_Vectors\\_for\\_Prophylactic\\_Applications\\_and\\_Cancer\\_Intervention](https://www.researchgate.net/publication/286088380_Alphavirus_Replicon_Vectors_for_Prophylactic_Applications_and_Cancer_Intervention).

Arnemo, Marianne, Sara Sofie Viksmoen Watle, Kristin Merete Schoultz, Kirsti Vainio, Gunnstein Norheim, Vasee Moorthy, Patricia Fast, John-Arne Røttingen, and Tor Gjøen. 'Stability of a Vesicular Stomatitis Virus–Vectored Ebola Vaccine'. *Journal of Infectious Diseases* 213, no. 6 (15 March 2016): 930–33. doi:10.1093/infdis/jiv532.

Barouch, Dan H., Sandra V. Kik, Gerrit J. Weverling, Rebecca Dilan, Sharon L. King, Lori F. Maxfield, Sarah Clark, et al. 'International Seroepidemiology of Adenovirus Serotypes 5, 26, 35, and 48 in Pediatric and Adult Populations'. *Vaccine* 29, no. 32 (18 July 2011): 5203–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.025.

Barouch, Dan H., Zhi-yong Yang, Wing-pui Kong, Birgit Koriath-Schmitz, Shawn M. Sumida, Diana M. Truitt, Michael G. Kishko, et al. 'A Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Regulatory Element Enhances the Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Vaccines in Mice and Nonhuman Primates'. *Journal of Virology* 79, no. 14 (July 2005): 8828–34. doi:10.1128/JVI.79.14.8828-8834.2005.

Blaney, Joseph E., Andrea Marzi, Mallory Willet, Amy B. Papaneri, Christoph Wirblich, Friederike Feldmann, Michael Holbrook, Peter Jahrling, Heinz Feldmann, and Matthias J. Schnell. "Antibody Quality and Protection from Lethal Ebola Virus Challenge in Nonhuman Primates

Immunized with Rabies Virus Based Bivalent Vaccine.” *PLOS Pathogens* 9, no. 5 (May 30, 2013): e1003389. doi:10.1371/journal.ppat.1003389.

Blaney, Joseph E., Christoph Wirblich, Amy B. Papaneri, Reed F. Johnson, Carey J. Myers, Terry L. Juelich, Michael R. Holbrook, et al. “Inactivated or Live-Attenuated Bivalent Vaccines That Confer Protection against Rabies and Ebola Viruses.” *Journal of Virology* 85, no. 20 (October 15, 2011): 10605–16. doi:10.1128/JVI.00558-11.

\*Broadhurst, M. Jana, Tim J. G. Brooks, and Nira R. Pollock. ‘Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future’. *Clinical Microbiology Reviews* 29, no. 4 (1 October 2016): 773–93. doi:10.1128/CMR.00003-16.

Bukreyev, Alexander, Andrea Marzi, Friederike Feldmann, Liqun Zhang, Lijuan Yang, Jerrold M. Ward, David W. Dorward, et al. “Chimeric Human Parainfluenza Virus Bearing the Ebola Virus Glycoprotein as the Sole Surface Protein Is Immunogenic and Highly Protective against Ebola Virus Challenge.” *Virology* 383, no. 2 (January 20, 2009): 348–61. doi:10.1016/j.virol.2008.09.030.

Bukreyev, Alexander, Lijuan Yang, Sherif R. Zaki, Wun-Ju Shieh, Pierre E. Rollin, Brian R. Murphy, Peter L. Collins, and Anthony Sanchez. “A Single Intranasal Inoculation with a Paramyxovirus-Vectored Vaccine Protects Guinea Pigs against a Lethal-Dose Ebola Virus Challenge.” *Journal of Virology* 80, no. 5 (March 1, 2006): 2267–79. doi:10.1128/JVI.80.5.2267-2279.2006.

‘cDNA Synthesis & RT-PCR | NEB’. Accessed 17 April 2017.

<https://www.neb.com/applications/rna-analysis/cdna-synthesis-and-rt-pcr>.

*Clinicaltrials*. Accessed 15 March 2017. <https://clinicaltrials.gov/>

Commissioner, Office of the. ‘The Drug Development Process - Step 3: Clinical Research’. WebContent. Accessed 18 April 2017.

<https://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405622.htm>.

Davidson, Edgar, Christopher Bryan, Rachel H. Fong, Trevor Barnes, Jennifer M. Pfaff, Manu Mabila, Joseph B. Rucker, and Benjamin J. Doranz. ‘Mechanism of Binding to Ebola Virus Glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 Cocktail Antibodies’. *Journal of Virology* 89, no. 21 (1 November 2015): 10982–92. doi:10.1128/JVI.01490-15.



Davis, N L, K W Brown, and R E Johnston. 'A Viral Vaccine Vector That Expresses Foreign Genes in Lymph Nodes and Protects against Mucosal Challenge.' *Journal of Virology* 70, no. 6 (June 1996): 3781–87.

De Santis, Olga, Régine Audran, Emilie Pothin, Loane Warpelin-Decrausaz, Laure Vallotton, Grégoire Wuerzner, Camille Cochet, et al. 'Safety and Immunogenicity of a Chimpanzee Adenovirus-Vectored Ebola Vaccine in Healthy Adults: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Finding, Phase 1/2a Study'. *The Lancet Infectious Diseases* 16, no. 3 (March 2016): 311–20. doi:10.1016/S1473-3099(15)00486-7.

DiNapoli, Joshua M., Lijuan Yang, Siba K. Samal, Brian R. Murphy, Peter L. Collins, and Alexander Bukreyev. "Respiratory Tract Immunization of Non-Human Primates with a Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccine Candidate against Ebola Virus Elicits a Neutralizing Antibody Response." *Vaccine* 29, no. 1 (December 10, 2010): 17–25. doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.024.

Dolzhiikova, I. V., O. V. Zubkova, A. I. Tikhvatulin, A. S. Dzharullaeva, N. M. Tikhvatulina, D. V. Shcheblyakov, M. M. Shmarov, et al. "Safety and Immunogenicity of GamEvac-Combi, a Heterologous VSV- and Ad5-Vectored Ebola Vaccine: An Open Phase I/II Trial in Healthy Adults in Russia." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 0, no. 0 (February 2, 2017): 1–8. doi:10.1080/21645515.2016.1238535.

Dunning, Jake, Stephen B. Kennedy, Annick Antierens, John Whitehead, Iza Ciglenecki, Gail Carson, Rupa Kanapathipillai, et al. 'Experimental Treatment of Ebola Virus Disease with Brincidofovir'. *PLoS ONE* 11, no. 9 (9 September 2016). doi:10.1371/journal.pone.0162199.

Ebola diagnostic. *who*. Accessed 18 April 2017. [http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/emp\\_ebola\\_diagnostics/en/](http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/emp_ebola_diagnostics/en/)

Ebola virus disease. *cdc*. Accessed 18 April 2017. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/about.html>

Ewer, Katie, Tommy Rampling, Navin Venkatraman, Georgina Bowyer, Danny Wright, Teresa Lambe, Egeruan B. Imoukhuede, et al. 'A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA'. *New England Journal of Medicine* 374, no. 17 (28 April 2016): 1635–46. doi:10.1056/NEJMoa1411627.

- Feldmann, Heinz, and Hans-Dieter Klenk. 'Filoviruses'. In *Medical Microbiology*, edited by Samuel Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8129/>.
- Feldmann, Heinz, Steven M. Jones, Kathleen M. Daddario-DiCaprio, Joan B. Geisbert, Ute Ströher, Allen Grolla, Mike Bray, et al. 'Effective Post-Exposure Treatment of Ebola Infection'. *PLOS Pathogens* 3, no. 1 (19 January 2007): e2. doi:10.1371/journal.ppat.0030002.
- Feldmann, Heinz, Steven M. Jones, Kathleen M. Daddario-DiCaprio, Joan B. Geisbert, Ute Ströher, Allen Grolla, Mike Bray, et al. 'Effective Post-Exposure Treatment of Ebola Infection'. *PLOS Pathogens* 3, no. 1 (19 January 2007): e2. doi:10.1371/journal.ppat.0030002.
- Garbutt, Michael, Ryan Liebscher, Victoria Wahl-Jensen, Steven Jones, Peggy Möller, Ralf Wagner, Viktor Volchkov, Hans-Dieter Klenk, Heinz Feldmann, and Ute Ströher. 'Properties of Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus Vectors Expressing Glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses'. *Journal of Virology* 78, no. 10 (May 2004): 5458–65. doi:10.1128/JVI.78.10.5458-5465.2004.
- Geisbert, Thomas W., Amy CH Lee, Marjorie Robbins, Joan B. Geisbert, Anna N. Honko, Vandana Sood, Joshua C. Johnson, et al. 'Postexposure Protection of Non-Human Primates against a Lethal Ebola Virus Challenge with RNA Interference: A Proof-of-Concept Study'. *The Lancet* 375, no. 9729 (29 May 2010): 1896–1905. doi:10.1016/S0140-6736(10)60357-1.
- Geisbert, Thomas W., Kathleen M. Daddario-DiCaprio, Mark G. Lewis, Joan B. Geisbert, Allen Grolla, Anders Leung, Jason Paragas, et al. 'Vesicular Stomatitis Virus-Based Ebola Vaccine Is Well-Tolerated and Protects Immunocompromised Nonhuman Primates'. *PLOS Pathogens* 4, no. 11 (28 November 2008): e1000225. doi:10.1371/journal.ppat.1000225.
- Geisbert, Thomas W., Lisa E. Hensley, Peter B. Jahrling, Tom Larsen, Joan B. Geisbert, Jason Paragas, Howard A. Young, Terry M. Fredeking, William E. Rote, and George P. Vlasuk. 'Treatment of Ebola Virus Infection with a Recombinant Inhibitor of Factor VIIa/Tissue Factor: A Study in Rhesus Monkeys'. *The Lancet* 362, no. 9400 (13 December 2003): 1953–58. doi:10.1016/S0140-6736(03)15012-X.
- Group, The PREVAIL II Writing. 'A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection'. *New England Journal of Medicine* 375, no. 15 (13 October 2016): 1448–56. doi:10.1056/NEJMoa1604330.

- Halfmann, Peter, Jin Hyun Kim, Hideki Ebihara, Takeshi Noda, Gabriele Neumann, Heinz Feldmann, and Yoshihiro Kawaoka. 'Generation of Biologically Contained Ebola Viruses'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 4 (29 January 2008): 1129–33. doi:10.1073/pnas.0708057105.
- Henao-Restrepo, Ana Maria, Ira M. Longini, Matthias Egger, Natalie E. Dean, W. John Edmunds, Anton Camacho, Miles W. Carroll, et al. 'Efficacy and Effectiveness of an rVSV-Vectored Vaccine Expressing Ebola Surface Glycoprotein: Interim Results from the Guinea Ring Vaccination Cluster-Randomised Trial'. *The Lancet* 386, no. 9996 (29 August 2015): 857–66. doi:10.1016/S0140-6736(15)61117-5.
- Henao-Restrepo, Ana Maria, Ira M. Longini, Matthias Egger, Natalie E. Dean, W. John Edmunds, Anton Camacho, Miles W. Carroll, et al. 'Efficacy and Effectiveness of an rVSV-Vectored Vaccine Expressing Ebola Surface Glycoprotein: Interim Results from the Guinea Ring Vaccination Cluster-Randomised Trial'. *The Lancet* 386, no. 9996 (29 August 2015): 857–66. doi:10.1016/S0140-6736(15)61117-5.
- Herbert, Andrew S., Ana I. Kuehne, James F. Barth, Ramon A. Ortiz, Donald K. Nichols, Samantha E. Zak, Spencer W. Stonier, et al. 'Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicon Particle Vaccine Protects Nonhuman Primates from Intramuscular and Aerosol Challenge with Ebolavirus'. *Journal of Virology* 87, no. 9 (1 May 2013): 4952–64. doi:10.1128/JVI.03361-12.
- Hoffmann, Markus, Mariana González Hernández, Elisabeth Berger, Andrea Marzi, and Stefan Pöhlmann. 'The Glycoproteins of All Filovirus Species Use the Same Host Factors for Entry into Bat and Human Cells but Entry Efficiency Is Species Dependent'. *PLOS ONE* 11, no. 2 (22 February 2016): e0149651. doi:10.1371/journal.pone.0149651.
- Iversen, Patrick L., Travis K. Warren, Jay B. Wells, Nicole L. Garza, Dan V. Mourich, Lisa S. Welch, Rekha G. Panchal, and Sina Bavari. 'Discovery and Early Development of AVI-7537 and AVI-7288 for the Treatment of Ebola Virus and Marburg Virus Infections'. *Viruses* 4, no. 11 (6 November 2012): 2806–30. doi:10.3390/v4112806.
- Ji, Ying-Jie, Xue-Zhang Duan, Xu-Dong Gao, Lei Li, Chen Li, Dong Ji, Wen-Gang Li, et al. 'Clinical Presentations and Outcomes of Patients with Ebola Virus Disease in Freetown, Sierra Leone'. *Infectious Diseases of Poverty* 5 (3 November 2016). doi:10.1186/s40249-016-0195-9.

Johnson, Reed F., Drishya Kurup, Katie R. Hagen, Christine Fisher, Rohan Keshwara, Amy Papaneri, Donna L. Perry, et al. "An Inactivated Rabies Virus–Based Ebola Vaccine, FILORAB1, Adjuvanted With Glucopyranosyl Lipid A in Stable Emulsion Confers Complete Protection in Nonhuman Primate Challenge Models." *The Journal of Infectious Diseases* 214, no. suppl\_3 (October 15, 2016): S342–54. doi:10.1093/infdis/jiw231.

Julander, Justin G., Shanta Bantia, Brian R. Taubenheim, Dena M. Minning, Pravin Kotian, John D. Morrey, Donald F. Smee, William P. Sheridan, and Yarlagadda S. Babu. 'BCX4430, a Novel Nucleoside Analog, Effectively Treats Yellow Fever in a Hamster Model'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, no. 11 (November 2014): 6607–14. doi:10.1128/AAC.03368-14.

\* Kanapathipillai, Rupa, Ana Maria Henao Restrepo, Patricia Fast, David Wood, Christopher Dye, Marie-Paule Kieny, and Vasee Moorthy. 'Ebola Vaccine — An Urgent International Priority'. *New England Journal of Medicine* 371, no. 24 (11 December 2014): 2249–51. doi:10.1056/NEJMp1412166.

Kibuuka, Hannah, Nina M Berkowitz, Monica Millard, Mary E Enama, Allan Tindikahwa, Arthur B Sekiziyivu, Pamela Costner, et al. 'Safety and Immunogenicity of Ebola Virus and Marburg Virus Glycoprotein DNA Vaccines Assessed Separately and Concomitantly in Healthy Ugandan Adults: A Phase 1b, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial'. *The Lancet* 385, no. 9977 (24 April 2015): 1545–54. doi:10.1016/S0140-6736(14)62385-0.

Klenk, Hans-Dieter, and Heinz Feldmann. *Ebola and Marburg Viruses: Molecular and Cellular Biology*. Garland Science, 2004.

'Klinické Hodnocení Léků, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv'. Accessed 24 April 2017.

<http://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>.

Kraft, Colleen S., Angela L. Hewlett, Scott Koepsell, Anne M. Winkler, Christopher J. Kratochvil, LuAnn Larson, Jay B. Varkey, et al. 'The Use of TKM-100802 and Convalescent Plasma in 2 Patients With Ebola Virus Disease in the United States'. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 61, no. 4 (15 August 2015): 496–502. doi:10.1093/cid/civ334.

- Laupland, Kevin B, and Louis Valiquette. 'Ebola Virus Disease'. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 25, no. 3 (2014): 128–29.
- Ledgerwood, J. E., P. Costner, N. Desai, L. Holman, M. E. Enama, G. Yamshchikov, S. Mulangu, et al. 'A Replication Defective Recombinant Ad5 Vaccine Expressing Ebola Virus GP Is Safe and Immunogenic in Healthy Adults'. *Vaccine* 29, no. 2 (16 December 2010): 304–13. doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.037.
- Lee, Agnes, Giancarlo Agnelli, Harry Büller, Jeffrey Ginsberg, John Heit, William Rote, George Vlasuk, et al. 'Dose-Response Study of Recombinant Factor VIIa/Tissue Factor Inhibitor Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2 in Prevention of Postoperative Venous Thromboembolism in Patients Undergoing Total Knee Replacement'. *Circulation* 104, no. 1 (3 July 2001): 74–78. doi:10.1161/hc2601.091386.
- Martin, Julie E., Nancy J. Sullivan, Mary E. Enama, Ingelise J. Gordon, Mario Roederer, Richard A. Koup, Robert T. Bailer, et al. 'A DNA Vaccine for Ebola Virus Is Safe and Immunogenic in a Phase I Clinical Trial'. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, no. 11 (1 November 2006): 1267–77. doi:10.1128/CVI.00162-06.
- \*Marzi, Andrea, Heinz Feldmann, Thomas W. Geisbert, and Darryl Falzarano. 'Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccines for Prophylaxis and Treatment of Filovirus Infections'. *Journal of Bioterrorism & Biodefense* Suppl 1, no. 4 (25 September 2011). doi:10.4172/2157-2526.S1-004.
- Marzi, Andrea, Peter Halfmann, Lindsay Hill-Batorski, Friederike Feldmann, W. Lesley Shupert, Gabriele Neumann, Heinz Feldmann, and Yoshihiro Kawaoka. 'An Ebola Whole-Virus Vaccine Is Protective in Nonhuman Primates'. *Science (New York, N.Y.)* 348, no. 6233 (24 April 2015): 439–42. doi:10.1126/science.aaa4919.
- 'Merck's R&D Journey'. *Merck.com*. Accessed 22 November 2016. <http://www.merck.com/research/index.html>.
- \*Messaoudi, Ilhem, Gaya K. Amarasinghe, and Christopher F. Basler. 'Filovirus Pathogenesis and Immune Evasion: Insights from Ebola Virus and Marburg Virus'. *Nature Reviews Microbiology* 13, no. 11 (1 November 2015): 663–76. doi:10.1038/nrmicro3524.

Milligan, Iain D., Malick M. Gibani, Richard Sewell, Elizabeth A. Clutterbuck, Danielle Campbell, Emma Plested, Elizabeth Nuthall, et al. 'Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26– and Modified Vaccinia Ankara–Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial'. *JAMA* 315, no. 15 (19 April 2016): 1610–23. doi:10.1001/jama.2016.4218.

Mupapa, K., M. Massamba, K. Kibadi, K. Kuvula, A. Bwaka, M. Kipasa, R. Colebunders, and J. J. Muyembe-Tamfum. 'Treatment of Ebola Hemorrhagic Fever with Blood Transfusions from Convalescent Patients'. *The Journal of Infectious Diseases* 179, no. Supplement\_1 (1 February 1999): S18–23. doi:10.1086/514298.

Negredo, Ana, Gustavo Palacios, Sonia Vázquez-Morón, Félix González, Hernán Dopazo, Francisca Molero, Javier Juste, et al. 'Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe'. *PLoS Pathogens* 7, no. 10 (October 2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002304.

'Phases of Clinical Trials - Canadian Cancer Society'. *Www.cancer.ca*. Accessed 18 April 2017. <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/diagnosis-and-treatment/clinical-trials/phases-of-clinical-trials/?region=on>.

'Polymerase Chain Reaction (PCR)'. Accessed 17 April 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.

Potisopon, Supanee, Francois Ferron, Véronique Fattorini, Barbara Selisko, Bruno Canard. 'Substrate selectivity of Dengue and Zika virus NS5 polymerase towards 20 -modified nucleotide analogues'. *Antiviral Research* 140 ( 30 December 2016): 25-36. doi:10.1016/j.antiviral.2016.12.021.

Pushko, Peter, Mike Bray, George V Ludwig, Michael Parker, Alan Schmaljohn, Anthony Sanchez, Peter B Jahrling, and Jonathan F Smith. 'Recombinant RNA Replicons Derived from Attenuated Venezuelan Equine Encephalitis Virus Protect Guinea Pigs and Mice from Ebola Hemorrhagic Fever Virus'. *Vaccine* 19, no. 1 (15 August 2000): 142–53. doi:10.1016/S0264-410X(00)00113-4.

Pyankov, Oleg V., Yin Xiang Setoh, Sergey A. Bodnev, Judith H. Edmonds, Olga G. Pyankova, Stepan A. Pyankov, Gabor Pali, et al. "Successful Post-Exposure Prophylaxis of Ebola Infected Non-Human Primates Using Ebola Glycoprotein-Specific Equine IgG." *Scientific Reports* 7 (February 3, 2017). doi:10.1038/srep41537.

Recombinant EBOV/Makona Glycoprotein (GP) Nanoparticle Vaccine Produced in Sf9 Insect Cells. *Novavax*. Accessed 3 April 2017.

[http://novavax.com/download/files/presentations/Novavax\\_EBOV\\_GP\\_Vaccine\\_ISBIO\\_GSmith\\_final.pdf](http://novavax.com/download/files/presentations/Novavax_EBOV_GP_Vaccine_ISBIO_GSmith_final.pdf)

Reynard, O., V. Mokhonov, E. Mokhonova, J. Leung, A. Page, M. Mateo, O. Pyankova, et al. 'Kunjin Virus Replicon-Based Vaccines Expressing Ebola Virus Glycoprotein GP Protect the Guinea Pig Against Lethal Ebola Virus Infection'. *The Journal of Infectious Diseases* 204, no. Suppl 3 (1 November 2011): S1060–65. doi:10.1093/infdis/jir347.

\* Richardson, Jason S., Joseph D. Dekker, Maria A. Croyle, and Gary P. Kobinger. 'Recent Advances in Ebolavirus Vaccine Development'. *Human Vaccines* 6, no. 6 (1 June 2010): 439–49. doi:10.4161/hv.6.6.11097.

Roberts, Anjeanette, Linda Buonocore, Ryan Price, John Forman, and John K. Rose. "Attenuated Vesicular Stomatitis Viruses as Vaccine Vectors." *Journal of Virology* 73, no. 5 (May 1, 1999): 3723–32.

Sangawa, Hidehiro, Takashi Komeno, Hiroshi Nishikawa, Atsushi Yoshida, Kazumi Takahashi, Nobuhiko Nomura, and Yousuke Furuta. 'Mechanism of Action of T-705 Ribosyl Triphosphate against Influenza Virus RNA Polymerase'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, no. 11 (November 2013): 5202–8. doi:10.1128/AAC.00649-13.

Sarwar, Uzma N., Pamela Costner, Mary E. Enama, Nina Berkowitz, Zonghui Hu, Cynthia S. Hendel, Sandra Sitar, et al. 'Safety and Immunogenicity of DNA Vaccines Encoding Ebolavirus and Marburgvirus Wild-Type Glycoproteins in a Phase I Clinical Trial'. *The Journal of Infectious Diseases* 211, no. 4 (15 February 2015): 549–57. doi:10.1093/infdis/jiu511.

Sissoko, Daouda, Cedric Laouenan, Elin Folkesson, Abdoul-Bing M'Lebing, Abdoul-Habib Beavogui, Sylvain Baize, Alseny-Modet Camara, et al. 'Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea'. *PLoS Medicine* 13, no. 3 (1 March 2016). doi:10.1371/journal.pmed.1001967.

Swenson, Dana L., Kelly L. Warfield, Diane L. Negley, Alan Schmaljohn, M. Javad Aman, and Sina Bavari. 'Virus-like Particles Exhibit Potential as a Pan-Filovirus Vaccine for Both Ebola and Marburg Viral Infections'. *Vaccine* 23, no. 23 (27 April 2005): 3033–42. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.070.

Tapia, Milagritos D., Samba O. Sow, Kirsten E. Lyke, Fadima Cheick Haidara, Fatoumata Diallo, Moussa Doumbia, Awa Traore, et al. 'Use of ChAd3-EBO-Z Ebola Virus Vaccine in Malian and US Adults, and Boosting of Malian Adults with MVA-BN-Filo: A Phase 1, Single-Blind, Randomised Trial, a Phase 1b, Open-Label and Double-Blind, Dose-Escalation Trial, and a Nested, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial'. *The Lancet Infectious Diseases* 16, no. 1 (1 January 2016): 31–42. doi:10.1016/S1473-3099(15)00362-X. Walsh, Peter D., Drishya Kurup, Dana L. Hasselschwert, Christoph Wirblich, Jason E. Goetzmann, and Matthias J. Schnell. "The Final (Oral Ebola) Vaccine Trial on Captive Chimpanzees?" *Scientific Reports* 7 (March 9, 2017): 43339. doi:10.1038/srep43339.

'The Very Intelligent Ebola Virus Takes Front and Center'. *Jon Lieff, M.D.*, 2 November 2014. <http://jonlieffmd.com/blog/the-very-intelligent-ebola-virus-takes-front-and-center>.

'ViralZone: Ebolavirus'. Accessed 14 April 2017. [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/207.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/207.html).

Warfield, Kelly L., Catharine M. Bosio, Brent C. Welcher, Emily M. Deal, Mansour Mohamadzadeh, Alan Schmaljohn, M. Javad Aman, and Sina Bavari. 'Ebola Virus-like Particles Protect from Lethal Ebola Virus Infection'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, no. 26 (23 December 2003): 15889–94. doi:10.1073/pnas.2237038100.

Warren, Travis K., Jay Wells, Rekha G. Panchal, Kelly S. Stuthman, Nicole L. Garza, Sean A. Van Tongeren, Lian Dong, et al. 'Protection against Filovirus Diseases by a Novel Broad-Spectrum Nucleoside Analogue BCX4430'. *Nature* 508, no. 7496 (17 April 2014): 402–5. doi:10.1038/nature13027.

'What Is ELISA'. Accessed 17 April 2017. <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>.

Whitmer, Shannon L. M., César Albariño, Samuel S. Shepard, Gytis Dudas, Mili Sheth, Shelley C. Brown, Deborah Cannon, et al. 'Preliminary Evaluation of the Effect of Investigational Ebola Virus Disease Treatments on Viral Genome Sequences'. *The Journal of Infectious Diseases* 214, no. suppl\_3 (15 October 2016): S333–41. doi:10.1093/infdis/jiw177.



Willet, Mallory, Drishya Kurup, Amy Papaneri, Christoph Wirblich, Jay W. Hooper, Steve A.

Kwilas, Rohan Keshwara, et al. "Preclinical Development of Inactivated Rabies Virus–Based Polyvalent Vaccine Against Rabies and Filoviruses." *The Journal of Infectious Diseases* 212, no. suppl\_2 (October 1, 2015): S414–24. doi:10.1093/infdis/jiv251.

Willet, Mallory, Drishya Kurup, Amy Papaneri, Christoph Wirblich, Jay W. Hooper, Steve A.

Kwilas, Rohan Keshwara, et al. 'Preclinical Development of Inactivated Rabies Virus–Based Polyvalent Vaccine Against Rabies and Filoviruses'. *The Journal of Infectious Diseases* 212, no. suppl\_2 (1 October 2015): S414–24. doi:10.1093/infdis/jiv251.

World Health Organization, 2015a. Ebola Vaccines, Therapies, and Diagnostics.

[http://www.who.int/medicines/emp\\_ebola\\_q\\_as/en/](http://www.who.int/medicines/emp_ebola_q_as/en/).

World Health Organization, 2015b. Categorization and prioritization of drugs for consideration for testing or use in patients infected with Ebola. [http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/2015\\_0703TablesOfEbolaDrugs.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/2015_0703TablesOfEbolaDrugs.pdf?ua=1)

Zheng, Xuexing, Gary Wong, Yongkun Zhao, Hualei Wang, Shihua He, Yuhai Bi, Weijin Chen, et al. 'Treatment with Hyperimmune Equine Immunoglobulin or Immunoglobulin Fragments Completely Protects Rodents from Ebola Virus Infection'. *Scientific Reports* 6 (12 April 2016). doi:10.1038/srep24179.

Zhu, Feng-Cai, Li-Hua Hou, Jing-Xin Li, Shi-Po Wu, Pei Liu, Gui-Rong Zhang, Yue-Mei Hu, et al. 'Safety and Immunogenicity of a Novel Recombinant Adenovirus Type-5 Vector-Based Ebola Vaccine in Healthy Adults in China: Preliminary Report of a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 Trial'. *The Lancet* 385, no. 9984 (12 June 2015): 2272–79. doi:10.1016/S0140-6736(15)60553-0.