

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992602** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.03.31**

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2013.05.16**

---

(54) **ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВПГ-2**

---

(31) **61/647,764; 61/679,387; 61/714,158**

(32) **2012.05.16; 2012.08.03; 2012.10.15**

(33) **US**

(62) **201492110; 2013.05.16**

(71) Заявитель:  
**ИММЬЮН ДИЗАЙН КОРП. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Дубенски Томас У., м.л., Хоскен  
Нэнси А., Роббинс Скотт Х., Мур  
Маргарет Д. (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предложены составы, содержащие рекомбинантные белки ВПГ-2 и агонист врожденной иммунной системы, такой как адъювант, в качестве вакцины. Белки включают оболочечный гликопротеин и структурный белок, отличный от оболочечного гликопротеина, например белок капсида или тегумента. Вакцина предназначена как для серопозитивных, так и для серонегативных к ВПГ-2 субъектов.

**201992602**

**A2**

**A2**

**201992602**

## ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВПГ-2

### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) относительно предварительных заявок на патент США № 61/647,764, поданной 16 мая 2012 г., 61/679,387, поданной 3 августа 2012 г., и 61/714,158, поданной 15 октября 2012 г., которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** Перечень последовательностей настоящей патентной заявки подан отдельно в виде файла под названием "47733\_SeqListing.txt". Содержание указанного файла, созданного 16 мая 2013 г., размер которого составляет 45,969 байт, включено в полном объеме.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** Вакцины против инфекций, вызванных вирусом простого герпеса 2 типа, и связанные с ними способы и составы.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0004]** ВПГ-2 (вирус простого герпеса 2 типа) является представителем семейства Herpesviridae – группы ДНК-содержащих вирусов, которые часто приводят к кожным повреждениям (например, появлению пузырьков ветряной оспы и лихорадки), и для которых характерны случаи латентного и повторного инфицирования. ВПГ-2 является основной причиной генитальных язв, которые могут проявляться в виде скопления небольших заполненных жидкостью пузырьков, которые лопаются и образуют болезненные ранки, для лечения которых необходимо несколько недель. Дополнительные симптомы могут включать лихорадку, общую слабость, боли в мышцах, болезненное мочеиспускание, выделения из влагалища, а также увеличение и болезненность лимфоузлов в паховой области. Существует большая вероятность повторного приступа заболевания. Вирус может существовать в нервных клетках на протяжении всего времени жизни инфицированного субъекта и повторно активироваться через нерегулярные интервалы времени, приводя к образованию язв на коже. Даже в отсутствие язв вирус может вырабатываться и распространяться от человека к человеку. В настоящее время это

заболевание неизлечимо.

**[0005]** Генитальный герпес является наиболее распространенным заболеванием, передающимся половым путем. В Соединенных Штатах более 16% населения, что приблизительно соответствует одному человеку из шести, инфицировано ВПГ-2, при этом большая часть случаев приходится на женщин – приблизительно 20% женщин и 12% мужчин – и на афроамериканцев – приблизительно 40% населения и около 50% афроамериканских женщин. (Morbidity and Mortality Weekly Report, 59: 456-459, April 23, 2010). Всего в США инфицировано около 50 миллионов людей, из которых 80% не знают о своей инфекции, но при этом могут быть заразными. В других странах мира ВПГ-2 также приобретает масштабы эпидемии. Специалисты ВОЗ определили, что в 2003 г. по всему миру было инфицировано 536 миллионов людей, а новые случаи инфицирования составляют около 23 миллионов в год (Looker et al., Bull World Health Organ. 86: 805-812, 2008). Хотя распространенность заболевания зависит от региона, в общем случае распространенность увеличивается с возрастом и является более высокой среди женщин, чем среди мужчин. Вдобавок, распространенность ВПГ-2 является более высокой в развивающихся странах, чем в развитых странах, за исключением Северной Америки, в которой распространенность ВПГ-2 является высокой, и южной Азии, в которой распространенность ВПГ-2 является относительно низкой. Наиболее высокая распространенность наблюдается в Суб-Сахарной Африке, где около 80% женщин и 45% мужчин инфицировано ВПГ-2. Другие регионы, в частности, восточная Азия и юго-восточная Азия, приближаются к указанному уровню. Вдобавок к передаче половым путем, ВПГ-2 может передаваться от женщины к ребенку, как правило, во время родов. Наряду с эпидемией ВПГ-2 среди взрослого населения США также резко возросло количество случаев неонатального инфицирования. Ежегодно в США происходит около 1800 случаев неонатального инфицирования ВПГ, что превышает количество случаев неонатального инфицирования ВИЧ.

**[0006]** Осложнения, причиняемые инфекцией ВПГ-2, колоссальны. Хотя у подавляющего большинства инфицированных людей не обнаруживаются симптомов заболевания, они могут переносить вирус. Те субъекты, у которых обнаруживаются симптомы заболевания, страдают от болезненных ранок на гениталиях и в анальной области, и часто – от гриппоподобных симптомов, таких как повышение температуры и воспаление гланд. К сожалению, существует большая вероятность того, что после первого приступа ВПГ-2 на протяжении только первого года случится несколько дополнительных приступов (как правило, четыре или пять). Вне зависимости от тяжести симптомов осознание наличия инфекции часто становится причиной стресса и может негативно

влиять на качество жизни (Rosenthal, et al., Sex Transm Infect. 82: 154, 2006; Crosby et al Sex Health, 5:279-283, 2008). У новорожденных, инфицированных ВПГ-2 летальность вследствие энцефалита, причиненного инфекцией ВПГ, составляет >15% даже в случае лечения, а неврологическая заболеваемость среди инфицированных ВПГ-2 детей дополнительно проявляется у 30-50% выживших. Вместе с высокой распространенностью ВПГ-2 существует четкое понимание того, что инфекция ВПГ-2 существенно увеличивает риск приобретения и передачи ВИЧ-1. Данные по странам Африки показывают, что инфекция ВПГ-2 может увеличить риск передачи ВИЧ вплоть до семи раз, и что до половины случаев новоприобретенного ВИЧ прямо связаны с инфекцией ВПГ-2. В целом относительный риск приобретения ВИЧ возрастает более чем двукратно у людей, инфицированных ВПГ-2. Усиливающее действие в отношении риска приобретения ВИЧ в случае ВПГ-2 является большим, чем в случае любой другой инфекции, передающейся половым путем, подчеркивая необходимость разработки эффективной стратегии здравоохранения, которая была бы способна минимизировать последствия эпидемии ВПГ-2 в настоящее время.

**[0007]** Рост распространенности ВПГ-2 среди взрослого и детского населения продолжается, несмотря на широкое применение фармакологического воздействия. Антивирусные лекарственные средства, такие как ацикловир, применяемые в высоких дозировках на ранних стадиях инфицирования, могут снизить передачу ВПГ, но это не предотвращает возникновения латентной инфекции нервных ганглиев. Антивирусная терапия имеет множество недостатков, включая такие побочные эффекты как тошнота, рвота, высыпания и нарушение функции почек, и должна применяться осторожно, так как она может являться тератогенной, а также токсичной для развивающегося плода. Более того, продолжительное подавляющее применение валацикловира снижало передачу ВПГ менее, чем на 50%, несмотря на лечение на ранних стадиях. Даже если бы такой уровень воздействия был достижим, данный подход непрактичен, принимая во внимание высокую себестоимость и то, что 80% инфицированных не знают о своем статусе. Эффективность средств, альтернативных антивирусным лекарственным препаратам, например, местных бактерицидных средств, не подтверждена клинически, а физические барьеры (например, презервативы) обладают минимальной эффективностью в условиях “реального мира”. По этим причинам вакцинация является существенным фактором в противодействии и снижении влияния инфекции ВПГ-2 на здоровье.

**[0008]** Первую вакцину против ВПГ разработали в 1920-х, и с тех пор было предпринято множество попыток по созданию вакцины, и все безуспешные. Традиционные, проверенные временем типы вакцин, содержащие целый

инактивированный вирус, ослабленный живой вирус, модифицированный живой вирус и полученные из клеточных культур субъединицы вируса, были либо полностью неудачными, либо малоэффективными (Stanberry, Herpes 11 (Suppl 3) 161A-169A, 2004). С развитием методов на основании рекомбинантных ДНК были разработаны вакцины, содержащие рекомбинантные вирусные субъединицы. Эти вакцины содержали один или два оболочечных гликопротеина в комбинации с адьювантами. Гликопротеины считали перспективными кандидатами, главным образом, потому что они представляют собой мишени для нейтрализующих антител и являются высококонсервативными среди штаммов ВПГ-2. В последнее десятилетие из-за недостаточной эффективности были прекращены крупные клинические испытания двух кандидатных вакцин, одна из которых разработана Chiron, а другая – GlaxoSmithKline. Вакцина от Chiron содержала усеченные формы двух гликопротеинов ВПГ-2 – gD2 и gB2 в комбинации с адьювантом MF59. В лучшем случае данная вакцина обеспечивала временную защиту от ВПГ-2, хотя при этом наблюдались высокие титры антител к ВПГ-2 (Stanberry, там же). GlaxoSmithKline (GSK) была разработана и исследована сходная вакцина; при этом она содержала только один гликопротеин gD2, а также квасцы и MPL в качестве адьювантов. После восьми лет исследований и клинических испытаний в октябре 2010 г. GSK объявила об их безуспешности. Вакцина оказалась неэффективной для предотвращения инфицирования среди серонегативных женщин – единственной группы, для которой на ранних стадиях клинических испытаний наблюдался положительный эффект.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте реализации изобретения предложен иммуногенный фрагмент полипептида ВПГ-2, выбранный из группы, состоящей из: (а) иммуногенного фрагмента полипептида UL19, в котором отсутствует по меньшей мере 75% аминокислот 1-450 из SEQ ID NO: 4 и по меньшей мере 75% аминокислот 1055-1374 из SEQ ID NO: 4; (b) последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12; (c) иммуногенного варианта (а) или (b), который сохраняет по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности на участке из по меньшей мере 15 последовательных аминокислот; (d) иммуногенного фрагмента (а) или (b); и (e) химерного продукта слияния (а), (b), (c) или (d). В другом варианте реализации изобретения предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий вышеуказанный полипептид.

**[0009]** Также в настоящем изобретении предложены фармацевтические составы. В одном варианте реализации изобретения предложен иммуногенный фармацевтический состав, содержащий: (i) иммуногенный фрагмент полипептида ВПГ-2, выбранный из

группы, состоящей из: (a) иммуногенного фрагмента полипептида UL19, в котором отсутствует по меньшей мере 75% аминокислот 1-450 из SEQ ID NO: 4 и по меньшей мере 75% аминокислот 1055-1374 из SEQ ID NO: 4; (b) последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12; (c) иммуногенного варианта (a) или (b), который сохраняет по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности на участке из по меньшей мере 15 последовательных аминокислот; (d) иммуногенного фрагмента (a) или (b); и (e) химерного продукта слияния (a), (b), (c) или (d); (ii) необязательно, вещество, которое активирует врожденный иммунитет; и (iii) фармацевтически приемлемый носитель.

**[0010]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеуказанный состав, дополнительно содержащий UL25 или его иммуногенный фрагмент. В другом варианте реализации изобретения указанный состав дополнительно содержит gD2 или его иммуногенный фрагмент.

**[0011]** В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен вышеуказанный состав, в котором указанное вещество является адъювантом. В одном варианте реализации изобретения адъювант представляет собой GLA. В другом варианте реализации изобретения GLA находится в форме эмульсии типа “масло в воде” либо в водной форме. В определенных вариантах реализации изобретения эмульсия типа “масло в воде” содержит сквален.

**[0012]** В другом варианте реализации изобретения предложен способ лечения инфекции ВПГ-2 у субъекта, включающий введение субъекту вышеуказанного состава. В другом варианте реализации изобретения предложен способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вышеуказанного состава. В другом варианте реализации изобретения предложен способ иммунизации субъекта против ВПГ-2, включающий введение субъекту вышеуказанного состава. Согласно разным вариантам реализации изобретения предложен вышеуказанный способ, в котором введение осуществляется внутрикожным, мукозальным, внутримышечным, подкожным, подъязычным, ректальным или вагинальным способом. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеуказанный способ, дополнительно включающий введение субъекту второго, третьего или четвертого состава по любому из пунктов 3-8.

**[0013]** Заявляемое изобретение относится к составам и способам, применяемым для предотвращения или лечения инфекций, вызываемых ВПГ-2 (вирусом простого герпеса 2 типа), у субъектов, предпочтительно людей, при этом в одном варианте реализации изобретения человек является женщиной, в то время как в другом варианте реализации изобретения человек является мужчиной. Составы содержат (i) оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или иммуногенный фрагмент оболочечного гликопротеина ВПГ-2,

(ii) структурный белок ВПГ-2 или иммуногенный фрагмент структурного белка ВПГ-2, при этом структурный белок не является одним из оболочечных гликопротеинов, (iii) вещество, которое активирует врожденный иммунитет субъекта, и (iv) фармацевтически приемлемый носитель. В определенных вариантах реализации изобретения оболочечный белок является gD2, а состав содержит либо gD2, либо, в другом варианте реализации изобретения, иммуногенный фрагмент, полученный из gD2. В некоторых вариантах реализации изобретения структурный белок представляет собой один или более элементов из UL47, ICP0, ICP4, ICP47, UL5, UL8, UL15, UL19, UL25, UL30, UL32, UL46, UL39 (ICP10), UL7, UL40, UL54 и UL26 и, в случае наличия иммуногенных фрагментов, последние получены из UL47, ICP0, ICP4, ICP47, UL5, UL8, UL15, UL19, UL25, UL30, UL32, UL46, UL39 (ICP10), UL7, UL40, UL54 и/или UL26. Понятно, что точная белковая последовательность может варьироваться от одного вируса герпеса к другому, и, таким образом, все ссылки на белок ВПГ-2 включают любой подобный белок, который может быть получен из любого ВПГ-2 природного происхождения. В других вариантах реализации изобретения присутствуют оба элемента – UL19 и UL25, либо фрагменты UL19 (например, SEQ ID NO. 12, тип фрагмента верхнего домена) и UL25, либо смесь из целого белка и фрагментов, например, смесь из полноразмерного UL25 и фрагмента UL19, например, SEQ ID NO. 12, в некоторых случаях с содержанием UL47 или его фрагмента. В некоторых случаях вещество, которое активирует врожденный иммунитет, является адьювантом. В частности, адьювант может представлять собой GLA или другой MALA-адьювант. В одном варианте реализации изобретения иммуногенный фармацевтический состав содержит gD2, GLA или другой MALA-адьювант и два или три антигена, выбранные из полноразмерных элементов или фрагментов UL25, UL19 и UL47, и фармацевтически приемлемый носитель. В схожих вариантах реализации изобретения иммуногенный фармацевтический состав содержит MALA-адьювант, предпочтительно GLA, имеющий структурную формулу согласно Фигуре 1, gD2, UL25, фрагмент верхнего домена UL19 и фармацевтически приемлемый носитель; в некоторых случаях такой состав дополнительно содержит один или более дополнительных структурных белков ВПГ-2 или их фрагменты.

**[0014]** В некоторых вариантах реализации изобретения составы содержат антигенный фрагмент оболочечного гликопротеина ВПГ-2 и фармацевтически приемлемый носитель. Термины “иммуногенный фрагмент”, “иммунологический фрагмент” и “антигенный фрагмент” взаимозаменяемо употребляются в данном документе для обозначения фрагментов или частей белков, которые вызывают антителигенез или клеточную цитотоксичность, которые сохраняют специфичность к

(перекрестную реактивность с) полноразмерному белку. В определенных вариантах реализации изобретения антигенный фрагмент связывается с нейтрализующими антителами. В определенных вариантах реализации изобретения антигенный фрагмент получен из gD2 или gB2, а в других вариантах реализации изобретения антигенный фрагмент, полученный из gD2, gB2 или другого оболочечного гликопротеина, содержит по меньшей мере часть и, в некоторых случаях, всю лидерную последовательность. В любом из вариантов реализации изобретения антигенный фрагмент содержит два или более линейных эпитопов или содержит два или более прерывистых эпитопов оболочечного гликопротеина. В любом из вариантов реализации изобретения состав дополнительно содержит вещество, которое активирует врожденный иммунитет. Такое вещество может являться адъювантом, таким как GLA, как раскрыто, например, в публикации США № 2009/0181078.

**[0015]** Указанные способы можно применять для лечения вызванной ВПГ-2 инфекции или для генерации иммунного ответа, который может предотвратить или облегчить вызванную ВПГ-2 инфекцию. Субъекты, для которых применимы указанные способы, включают тех, которые являются серопозитивными к ВПГ-2, а также тех, которые являются серонегативными к ВПГ-2. В указанных способах субъекту вводят один из описанных в данном документе составов.

**[0016]** Некоторые типичные утверждения настоящего изобретения приведены следующим образом: используется обозначение (ху), где каждый элемент х и у указывает на букву – обозначение, указывающее на вариант реализации изобретения или группу вариантов реализации изобретения в случае, если в пределах варианта реализации изобретения определено более одного элемента (ху). (AA) Иммуногенный фармацевтический состав, (i) содержащий оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или его иммуногенный фрагмент; (ii) структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или его иммуногенный фрагмент; (iii) вещество, которое активирует врожденный иммунитет; и (iv) фармацевтически приемлемый носитель. (AB) Состав (AA), отличающийся тем, что оболочечный белок ВПГ-2 является gD2, а указанный состав содержит gD2. (AC) Состав (AA), отличающийся тем, что указанный состав содержит иммунологический фрагмент gD2. (AD) Состав согласно любому из или нескольким из (AA), (AB) и (AC), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 представляет собой один или более белков, выбранных из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26. (AE) Состав (AA), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является UL19. (AF) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является UL19. (AG) Состав (AA), отличающийся тем, что

структурный белок ВПГ-2 является иммунологическим фрагментом UL19, например, SEQ ID NO. 12. (AH) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является иммунологическим фрагментом UL47. (AI) Состав (AA), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является UL25. (AJ) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является UL25. (AK) Состав (AA), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является иммунологическим фрагментом UL25. (AL) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является ICP0. (AM) Состав (AA), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является UL47. (AN) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 является фрагментом UL47. (AO) Состав (AA), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, является UL47 и его иммунологическим фрагментом. (AP) Состав (AB), отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, является UL47 и его иммунологическим фрагментом. (AQ) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), дополнительно содержащий второй структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или его иммунологический фрагмент. (AR) Состав (AQ), отличающийся тем, что второй структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, выбран из группы, состоящей из UL19, UL25 и UL47, при этом второй структурный белок не идентичен структурному белку. (AS) Состав (AR), содержащий второй структурный белок. (AT) Состав (AR), содержащий иммунологический фрагмент второго структурного белка. (AU) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AE), (AF), (AG) и/или (AH), дополнительно содержащий UL25. (AV) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AE), (AF), (AG) и/или (AH), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL25. (AW) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AE), (AF), (AG) и/или (AH), дополнительно содержащий UL47. (AX) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AE), (AF), (AG) и/или (AH), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47. (AY) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AI), (AJ), (AK) и/или (AL), дополнительно содержащий UL19. (AZ) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AI), (AJ), (AK) и/или (AL), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL19, например, SEQ ID NO 12. (BA) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AI), (AJ), (AK) и/или (AL), дополнительно содержащий UL47. (BB) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AI), (AJ), (AK) и/или (AL), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47. (BC) Состав согласно любому из или

нескольким из вариантов (AM), (AN), (AO) и/или (AP), дополнительно содержащий UL19. (BD) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AM), (AN), (AO) и/или (AP), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL19. (BE) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AM), (AN), (AO) и/или (AP), дополнительно содержащий UL25. (BF) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AM), (AN), (AO) и/или (AP), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL25. (BG) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE) и (BF), отличающийся тем, что указанное вещество является адъювантом. (BH) Состав, выбранный из (BG), отличающийся тем, что адъювант представляет собой GLA или другой MALA-адъювант, а каждый из вариантов (BG) независимо выбран как отдельный вариант реализации настоящего изобретения. (BI) Состав (AA), содержащий gD2; UL25; UL19; GLA или другой MALA-адъювант; и фармацевтически приемлемый носитель. (BJ) Состав (AA), содержащий gD2, UL25 и иммунологический фрагмент UL19. (BK) Состав (AA), содержащий gD2, UL19 и иммунологический фрагмент UL25. (BL) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (BI), (BJ) и (BK), дополнительно содержащий UL47. (BM) Состав согласно любому из или нескольким из вариантов (BI), (BJ) и (BK), дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47. (BN) Способ лечения вызванной ВПГ-2 инфекции у субъекта, включающий введение субъекту состава согласно любому из или нескольким из вариантов (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE), (BF), (BG), (BH), (BI), (BJ), (BK), (BL) и (BM). (BO) Способ генерации иммунного ответа на ВПГ-2 у субъекта, включающий введение субъекту состава согласно любому из или нескольким из вариантов (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE), (BF), (BG), (BH), (BI), (BJ), (BK), (BL), (BM) и (BN). (BQ) Способ (BO), отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1. (BR) Способ (BO), отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1.

**[0017]** В одном варианте реализации изобретения предложен состав, содержащий оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; два структурных белка ВПГ-2, отличных от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или их иммунологический фрагмент; вещество, которое активирует врожденный иммунитет; и фармацевтически

приемлемый носитель. Примером может служить состав, который содержит gD2, UL25 и SEQ ID NO. 12 (фрагмент UL19) и адъювант на основе монофосфорил липида А (MALA), например, GLA. Дополнительно к gD2-специфическому антителогенезу вакцинация при помощи указанного состава может вызывать устойчивый ответ ВПГ-2 антиген-специфических эффекторных Т-клеток и клеток памяти CD4 и CD8 на последующее инфицирование живым вирусом. В частности, профилактическая иммунизация при помощи данного состава может в значительной степени или полностью обеспечить защиту от летальной внутривагинальной инфекции, вызванной ВПГ-2, у мышей штамма C57BL/6 с выработкой стерильного иммунитета в слизистых оболочках гениталий и дорсальных корешковых ганглиях. Данный состав может привести к увеличению количества CD4 и CD8 Т-клеток, вызванного предшествующим инфицированием ослабленным штаммом ВПГ-2. Соответственно, при применении в качестве терапии при повторном поражении ВПГ-2 морских свинок данный состав может снизить частоту повторных поражений.

**[0018]** Также предложены наборы. В некоторых наборах находится ампула, содержащая фармацевтический состав, содержащий антигенный фрагмент оболочечного гликопротеина ВПГ-2, и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0019]** Эти и другие аспекты и варианты реализации настоящего изобретения станут понятны на примерах нижеприведенного подробного описания и прилагаемых фигур.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

**[0020]** На Фигурах 1А-В приведено изображение GLA (адъюванта, применяемого в Примерах) и схематическое примерное изображение капли масла с поверхностно-активными веществами фосфатидилхолином и плуроником F68.

**[0021]** Фигура 2 иллюстрирует gD2-специфические ответы CD4 Т-клеток. Данные были получены после того, как мыши штамма Balb/c (4/группу) были дважды в/м иммунизированы с 28-дневным интервалом бивалентной вакциной, содержащей, как указано, разные уровни рекомбинантного белка и GLA. Графики отображают результаты цитометрического анализа внутриклеточной выработки IL-2, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ .

**[0022]** Фигура 3 иллюстрирует ответы CD8 Т-клеток селезенки на пептид OVA257, анализ которых проводили на 25 день после первичной инъекции (на 4 день после вторичной инъекции); рекомбинантный OVA = 5 мкг; SE = 2%; лентивирус вводили п/к; рекомбинантный OVA вводили в/м.

**[0023]** На Фигуре 4 приведен график, показывающий процентное содержание

цитокин-позитивных CD8 Т-клеток, определяемое через 4 дня после вторичной инъекции. Первичную инъекцию осуществляли на 0 день, а вторичную – на 21 день. Колонка HA1, день 0 HBSS, день 21, ФСБ; HA2, день 0, LV-OVA, день 21, ФСБ; HA3, день 0 LV-OVA, день 21 LV-OVA; HA4, день 0 LV-OVA, день 21 20 мкг GLA-SE; HA5, день 0 LV-OVA, день 21 OVA + SE; HA6, день 0 LV-OVA, день 21 OVA + 20 мкг GLA-SE; HA7, день 0 LV-OVA, день 21, 4 мкг OVA + GLA-SE; HA8, день 0 LV-OVA, день 21 OVA + 0,8 мкг GLA-SE.

**[0024]** На Фигурах 5 А-В приведены данные, полученные после иммунизации групп мышей штамма C57BL/6 по схеме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 5 мкг рекомбинантного белка gD, UL19 или UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE. Ответы CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 4 день после вторичной инъекции при помощи внутриклеточного окрашивания IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 после *ex vivo* повторной стимуляции 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 для соответствующего рекомбинантного белкового иммуногена. А) Типичная точечная диаграмма ВОЦ, характеризующая ответ CD4 Т-клеток на каждый 15-мерный пептид, полученная для мышей, иммунизированных соответствующим рекомбинантным белковым иммуногеном. В) Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток.

**[0025]** На Фигурах 6 А-В приведены данные, полученные после иммунизации группы из пяти мышей штамма C57BL/6 по схеме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) рекомбинантными белками gD, UL19 или UL25, вводимыми в комбинации и смешанными в эквимольном соотношении (0,8, 3,3 и 1,4 мкг белка, соответственно) в комбинации с 5,5 мкг GLA-SE. Ответы CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 4 день после вторичной инъекции при помощи внутриклеточного окрашивания IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 после *ex vivo* повторной стимуляции 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток для каждого рекомбинантного белкового иммуногена. В качестве отрицательного контроля использовали отдельный белок, в котором отсутствует эпитоп CD4 Т-клетки, из каждой белковой библиотеки. А) Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток. В) Предельные сывороточные титры (определяемые как величина, обратная наибольшей степени разведения сыворотки, которая  $>2$  раза превышает фоновую) для антиген-специфических антител подкласса IgG1 для каждого рекомбинантного белкового иммуногена в трехвалентной вакцине.

**[0026]** На Фигурах 7 А-В приведены данные, полученные после иммунизации групп мышей штамма C57BL/6 (5/группу) по схеме первичная (день 0) или первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 5 мкг рекомбинантного белка UL19, вводимого в комбинации с 5 мкг GLA-SE. Ответы CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 4 день или на 10 день после последней иммунизации при помощи ВОЦ IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 после *ex vivo* повторной стимуляции 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток для UL19. А) Типичные точечные диаграммы ВОЦ, характеризующие ответ CD4 Т-клеток на 15-мерный пептид UL19 297, полученные для мышей, иммунизированных соответствующим рекомбинантным белковым иммуногеном. Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток. В) Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на 15-мер UL19 250 или 297.

**[0027]** На Фигурах 8 А-В приведены данные, полученные после иммунизации групп мышей штамма C57BL/6 (5/группу) по схеме первичная (день 0) или первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 5 мкг рекомбинантного белка UL19, вводимого отдельно либо в комбинации с 5 мкг SE или GLA-SE. Ответы CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 5 день или на 10 день после последней иммунизации при помощи ВОЦ IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 после *ex vivo* повторной стимуляции 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток для UL19. А) Типичные точечные диаграммы ВОЦ, характеризующие ответ CD4 Т-клеток на 15-мерный пептид UL19 297, полученные для мышей, иммунизированных соответствующим рекомбинантным белковым иммуногеном. Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток. В) Для каждой группы приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на 15-мер UL19 250 или 297.

**[0028]** На Фигурах 9 А-С приведены данные, полученные после иммунизации групп мышей штамма C57BL/6 (5/группу) по схеме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) рекомбинантными белками, смешанными в эквимольном или эквимассовом соотношении. Общее количество введенного белка составляло 5 мкг или 15 мкг. Ответы CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 5 день после последней иммунизации при помощи внутриклеточного окрашивания IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 после *ex vivo* повторной стимуляции 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток. А) Приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на

пептиды gD. В) Приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на пептиды UL19. С) Приведено процентное содержание цитокин-позитивных CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на пептиды UL25.

**[0029]** На Фигуре 10 приведены данные, полученные после иммунизации групп мышей штамма BALB/c (5/группу) по схеме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 4 мкг рекомбинантного белка gD в комбинации с 4 мкг GLA-SE, только SE или наполнителем ФСБ, вводимого внутримышечно в объеме 100 мкл (50 мкл на лапу). Наличие gD2-специфических антител к ВПГ-2, принадлежащих к изотипам IgG, IgG1 и IgG2a, определяли при помощи ELISA.

**[0030]** На Фигуре 11 приведены данные, полученные после одной внутримышечной иммунизации 5 мышей штамма C57BL/6 трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или контрольными образцами вакцины. Ответы антиген-специфических CD4 и CD8 Т-клеток селезенки фиксировали на 6 день после иммунизации при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов (БОЦ) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 после ex vivo повторной стимуляции культур спленоцитов на протяжении 5 часов при помощи пептидов gD2, UL19 или UL25. А) Частота ответов и фенотип цитокинов CD4 Т-клеток, демонстрирующих ответ на пептиды gD2, UL19ud или UL25. В) Частота ответов и фенотип цитокинов CD8 Т-клеток, демонстрирующих ответ на пептиды UL19. С) Частота ответов CD8 Т-клеток на пептиды UL19 у мышей, которые 4 неделями раньше были иммунизированы трехвалентной вакциной, содержащей GLA-SE и вводимой подкожно вместе с ослабленным вирусом ВПГ-2 с дефицитом тимидинкиназы (ТК).

**[0031]** На Фигуре 12 приведены данные, полученные после двух внутримышечных иммунизаций, интервал между которыми составлял 28 дней, десяти мышей штамма C57BL/6 бивалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2 и UL19ud в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Мыши, иммунизированные при помощи 5 мкг одного GLA-SE, служили отрицательным контролем. Через 22 дня после второй иммунизации мышей обрабатывали депомедроксипрогестерона ацетатом, а затем, шестью днями позже, внутривагинально вводили дозу 50xLD<sub>50</sub> ВПГ-2 дикого типа. Ежедневно отслеживали появление поражений гениталий и выживаемость мышей. На 1, 3 и 5 дни после инфицирования брали влагалищные мазки для количественной оценки ДНК ВПГ-2 при помощи ПЦР. Приблизительно через 2 месяца после инфицирования у выживших мышей брали дорсальные корешковые ганглии и при помощи ПЦР количественно оценивали ДНК латентного ВПГ-2. Как показано на Фигуре 12, панель А, у мышей, иммунизированных

gD2 и UL19ud с GLA-SE наблюдали резкое снижение образования поражений и повышенную выживаемость по сравнению с мышами, иммунизированными gD2 и одним UL19ud или одним GLA-SE. Аналогично, как показано на Фигуре 12, панель В, 9 из 10 мышей, иммунизированных gD2 и UL19ud с GLA-SE не обнаруживали детектируемой ДНК ВПГ-2 на 5 день, в то время как мыши из контрольной группы демонстрировали устойчивые уровни ВПГ-2 во влагалище через 5 дней. Как показано на Фигуре 12, панель С, хотя в группе, обработанной одним GLA-SE, выжило трое животных, 2 из 3 этих мышей обнаруживали существенные уровни латентного ВПГ-2 в дорсальных корешковых ганглиях, мыши, иммунизированные gD2 и UL19ud с GLA-SE обнаруживали низкое содержание или не обнаруживали детектируемого ВПГ-2 в ганглиях.

**[0032]** На Фигуре 13 приведены данные, полученные после подкожного инфицирования мышей штамма C57BL/6 (5/группу) сублетальной дозой ослабленного вируса ВПГ-2 с дефицитом тимидинкиназы (ТК), последующей иммунизации через 28 дней трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Контрольные группы включали инфицированных мышей, обработанных одним GLA-SE или одним наполнителем, а также, мышей, ранее не участвовавших в экспериментах, обработанных одним наполнителем. Через шесть дней после иммунизации при помощи ВОЦ фиксировали ответы UL19-специфических CD8 (верхняя панель) и CD4 (нижняя панель) Т-клеток после стимуляции пептидами UL19.

**[0033]** На Фигуре 14 приведены данные, полученные после внутривагинального инфицирования морских свинок (7/группу) сублетальной дозой вируса ВПГ-2 штамма 333 и последующей обработки на 13 и 27 дни после инфицирования трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE. Инфицированные морские свинки, обработанные одним GLA-SE, служили в качестве отрицательного контроля. Ежедневно отслеживали появление у животных вагинальных поражений и каждому дню приписывали оценку 0-4. Ежедневную оценку появления поражений для каждой группы усредняли и строили временную зависимость.

**[0034]** На Фигуре 15 приведены данные, полученные после двух внутримышечных иммунизаций, интервал между которыми составлял 28 дней, десяти мышей штамма C57BL/6 трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud (смотрите SEQ ID NO:12) и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Мыши, иммунизированные при помощи 5 мкг одного GLA-SE, служили отрицательным контролем. Дополнительная контрольная группа

состояла из мышей, иммунизированных 5 мкг GLA-SE и 1 миллиграммом на мл ацикловира (АЦВ) в питьевой воде, начиная с 24 часов после введения. Через двадцать два дня после второй иммунизации мышей обрабатывали депо-медроксипрогестерона ацетатом, а затем, шестью днями позже, внутривагинально вводили дозу  $50 \times LD_{50}$  ВПГ-2 дикого типа. Ежедневно отслеживали появление поражений гениталий (панель А) и выживаемость (панель В) мышей.

**[0035]** На Фигуре 16 показаны вагинальные уровни ДНК ВПГ-2 у мышей, иммунизированных трехвалентной вакциной, содержащей gD2, UL19ud (смотрите SEQ ID NO:12) и UL25 (смотрите Фигуру 15, где приведены описания групп мышей). Влагалищные мазки брали на 1, 3 и 5 дни после инфицирования для количественной оценки ДНК ВПГ-2 при помощи ПЦР.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0036]** В настоящем изобретении предложены иммуногенные фармацевтические составы и способы лечения или предотвращения инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса, включая инфекции, вызываемые ВПГ-1 и ВПГ-2. Составы содержат иммуногенные вирусные белки ВПГ-2 или иммуногенные части вирусных белков, такие как фрагменты или пептиды, и по меньшей мере одно вещество, которое активирует врожденный иммунитет, предпочтительно это агонист TLR4, например, описанный в данном документе MALA-адьювант. Вирусные белки (а также фрагменты и пептиды) содержат по меньшей мере один оболочечный гликопротеин и по меньшей мере один, два, три или четыре структурных белка, отличных от оболочечного гликопротеина. В другом варианте вирусные белки (а также фрагменты и пептиды) содержат по меньшей мере один антигенный эпитоп и могут содержать часть или весь лидерный пептид оболочечного белка. Также могут использоваться иммуногенные фрагменты. Некоторые специфические вещества, применяемые в составах, включают адьюванты, вещества, которые усиливают иммунный ответ на антиген. Белки и их фрагменты обычно получают при помощи рекомбинантной технологии, согласно которой белок(белки) или фрагмент(ы) вырабатываются в культивируемых клетках. Пептиды также могут быть синтезированы химическим способом.

А. Белок ВПГ-2 как компонент вакцины

**[0037]** ВПГ-2 (вирус простого герпеса 2 типа) является оболочечным вирусом. Его геном экспрессирует более 75 различных белков. Многие белки являются структурными и используются при формировании капсида и тегумента, в то время как другие являются

частью оболочки. Основные капсидные белки включают те, которые экспрессируются из открытых рамок считывания (названия белков взяты в скобки в случае, если общеупотребительное название отличается от названия ОРС) UL6, UL18 (VP23), UL19 (VP5), UL35 (VP26) и UL38; основные белки тегумента включают UL7, UL11, UL13, UL14, UL16, UL17, UL21, UL25, UL36, UL37, UL41, UL46 (VP11/12), UL47 (VP13/14), UL48 (VP16), UL49, UL51 и US11; основные оболочечные белки включают UL1 (гликопротеин L (gL)), UL10 (gM), UL20, UL22 (gH), UL27 (gB), UL43, UL44 (gC), UL49A (gN), UL53 (gK), US4 (gG), US5, (gJ), US6 (gD), US7 (gI) и US8 (gE). (В литературе могут использоваться другие названия белков.) Пример геномной последовательности ВПГ-2 можно найти в GenBank, номер доступа NC 001798.1 (дата обновления – 23 апреля 2010 г., 2: 16 пополудни, по состоянию на 10 января 2011 г.; включен в полном объеме). Понятно, что общеупотребительные названия белков могут отличаться от названий генов, например, UL19 кодирует VP5, но в данном документе ссылка на названия гена обозначает то же самое, что и ссылка на кодируемый белок. Также понятно, что конкретная последовательность белка может варьироваться от одного вируса герпеса к другому, и, следовательно, все ссылки на белок ВПГ-2 (структурный, или оболочечный, или необолочечный) подразумевают любой подобный белок, получаемый из любого ВПГ-2 природного происхождения. На данное время известно большое количество последовательностей, которые находятся в базах данных. Нуклеиновые кислоты, кодирующие белок ВПГ-2 с альтернативной последовательностью, можно легко выделить или амплифицировать из одного или более ВПГ-2 (например, ВПГ-2 из базы данных или клинический изолят) при помощи подходящих олигонуклеотидных зондов или праймеров (например, тех, которые специфически гибридизируются с контрольной последовательностью в жестких условиях). В пределах такой группы нуклеиновых кислот, которые кодируют белок ВПГ-2, например, белок UL, одна нуклеиновая кислота из группы будет гибридизироваться с комплементом другой нуклеиновой кислоты в пределах группы в жестких условиях.

**[0038]** Термин “жесткие условия” относится к условиям, в которых зонд будет гибридизироваться предпочтительно со своей целевой последовательностью и в меньшей мере или вообще не гибридизироваться с другими последовательностями. “Жесткая гибридизация” и “жесткие условия отмывки при гибридизации” в контексте экспериментов по гибридизации нуклеиновых кислот, таких как сазерн- и нозерн-гибридизации, зависят от последовательностей и являются различными при различных параметрах условий окружающей среды. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and

Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 in “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier (New York, 1993). В определенных вариантах реализации изобретения условия высокой жесткости для гибридизации и отмывки осуществляются при температуре на  $5^{\circ}\text{C}$  ниже, чем температура плавления ( $T_m$ ) для определенной последовательности при определенном значении ионной силы и pH.  $T_m$  является температурой (при определенном значении ионной силы и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с идеально подходящим зондом. В определенных вариантах реализации изобретения условия высокой жесткости совпадают с  $T_m$  для конкретного зонда.

**[0039]** Примером жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые содержат более 100 комплементарных остатков, на фильтре в сазерн- или нозерн-блоттинге является 50% раствор формалина с 1 мг гепарина при  $42^{\circ}\text{C}$ , с гибридизацией, осуществляемой на протяжении ночи. Примером условий отмывки высокой жесткости является 0,15 M NaCl при  $72^{\circ}\text{C}$  на протяжении около 15 минут. Примером жестких условий отмывки является отмывка 0,2xSSC при  $65^{\circ}\text{C}$  на протяжении 15 минут (описание SSC буфера смотрите в Sambrook, et al.). Отмывке в условиях высокой жесткости может предшествовать отмывка в условиях низкой жесткости для удаления фонового сигнала зонда. Примером условий отмывки средней жесткости для дуплекса, например, из более чем 100 нуклеотидов, является 1xSSC при  $45^{\circ}\text{C}$  на протяжении 15 минут. Примером условий отмывки низкой жесткости для дуплекса, например, из более чем 100 нуклеотидов, является 4-6xSSC при  $40^{\circ}\text{C}$  на протяжении 15 минут. Как правило, отношение сигнала к шуму, в 2x (или более) превышающее то, которое наблюдают для несвязанного зонда, в конкретном анализе гибридизации указывает на детекцию специфической гибридизации.

**[0040]** Так как один или более из оболочечных белков принимают участие во внедрении вируса в клетку-хозяина, антитела к оболочечным белкам могут нейтрализовать вирус, то есть, предотвратить инфицирование либо повторное инфицирование вирусом. Не привязываясь к какой-либо механистической теории, можно сказать, что применение вызывающих иммунный ответ антител к одному или более из указанных оболочечных белков, необходимых для клеточного внедрения, является одним из способов получения нейтрализующих антител. Вакцины, содержащие целый вирус, как правило, инактивированный вирус, природным способом вносят оболочечные белки в иммунные клетки. Для вакцины, содержащей отдельные вирусные белки, одним из способов получения ответа на нейтрализующее антитело является включение в состав вакцины одного или более оболочечных белков, или иммуногенных белковых

фрагментов, или иммуногенных пептидов, или комбинаций из этих составляющих.

**[0041]** ВПГ-2 кодирует 14 или более ассоциированных с оболочкой белков, по меньшей мере некоторые из которых вовлечены в процесс клеточного внедрения, включая, но не ограничиваясь этим, gB, gD, gH и gL. gD специфически связывается с рецептором ВПГ-2 на клетке, а gB совместно с гетеродимером gH/gL опосредует мембранное слияние. Таким образом, эти четыре оболочечных гликопротеина представляют собой прекрасный выбор для применения их в качестве иммуногенов для включения в состав вакцины, так как антитела, вырабатываемые в ответ на эти оболочечные гликопротеины, могут включать нейтрализующие антитела. В другом варианте или в качестве дополнительного варианта кандидатами на роль иммуногенов для включения в состав вакцины также являются оболочечные белки, вовлеченные в вирусовыделение.

**[0042]** Большинство структурных белков ВПГ-2, отличных от оболочечных белков, обнаруживаются в капсиде и тегументе. Тегумент занимает пространство между капсидом и оболочкой. В тегументе обнаруживаются приблизительно 20 вирусных белков. Белки тегумента играют важную роль во многих вирусных функциях, включая иммуномодуляцию, сборку вируса и конечный выход. Капсидные белки образуют структуру, которая окружает нуклеотидный геном вириона. Основным капсидным белком является VP5 – продукт UL19. Клеточный ответ часто вызывается структурными белками и множеством белков ВПГ (Hosken et al., J Virol 80:5509-5515, 2006). В общем случае в клеточном ответе участвуют как CD4, так и CD8 Т-клетки, - те типы клеток, которые играют роль в борьбе с вызванными ВПГ инфекциями.

**[0043]** Раскрытый в данном документе иммуногенный фармацевтический состав (например, вакцина) содержит в качестве иммуногенов два или более структурных белков, один из которых является оболочечным гликопротеином, а другой - отличным от оболочечного гликопротеина белком. Хотя можно использовать любые структурные белки, выбор может быть обусловлен простотой получения, возможностью включения в фармацевтический состав, информацией о белковой структуре и высокими уровнями экспрессии. Так как ответы Т-клеток обычно являются ГКГ-рестриктированными, в общем случае вакцина содержит белки или пептиды, которые отвечают наибольшему количеству типов ГКГ, и также может содержать множественные белки или пептиды с целью увеличить количество демонстрирующих ответ особей.

**[0044]** Иммуногенные фармацевтические составы предпочтительно являются стерильными и не содержат или практически не содержат других вирусных компонентов, и не содержат или практически не содержат пирогенных веществ, таких как ЛПС. Такие

составы применимы в качестве вакцин.

**[0045]** Оболочечные и необолочечные структурные белки для применения в вакцинах в качестве иммуногенов, как правило, являются полноразмерными, но также могут представлять собой белок-предшественник, фрагмент или часть слитого белка. Под полноразмерным белком подразумевается зрелый белок; например, в случае оболочечного белка зрелый белок находится в форме, обнаруживаемой в оболочке (например, не содержащей лидерный пептид). Белок-предшественник (пре-белок) представляет собой растущий, транслируемый белок до того момента, когда начинается процессинг, или частично процессированный белок. Как часть слитого белка белок ВПГ-2 может присутствовать в виде белка-предшественника, или полноразмерного белка, или белкового фрагмента. Белковый фрагмент должен быть иммуногенным и содержать один или более эпитопов, которые вызывают иммунный ответ.

**[0046]** В некоторых вариантах реализации изобретения описанный в данном документе иммуногенный фармацевтический состав (например, вакцина) содержит в качестве иммуногенов (i) генный продукт  $\alpha$ -группы ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или (ii) генный продукт  $\beta 1$ -группы ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или (iii) генный продукт  $\beta 2$ -группы ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или (iv) генный продукт  $\gamma 1$ -группы ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или (v) генный продукт  $\gamma 2$ -группы ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент. Гены  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  и  $\gamma 2$  хорошо известны в данной области техники. Смотрите, например, *Herpesviruses and Their Replication* in FUNDAMENTAL VIROLOGY, Chapter 29, 1986.

**[0047]** Следовательно, любое употребление в данном документе термина “иммуноген” относится к целой группе полипептидов, которые представляют собой: (1) полноразмерный антиген, (2) иммуногенные фрагменты антигена, (3) иммуногенные варианты полноразмерного антигена или варианты иммуногенного фрагмента, (4) химерные продукты их слияния, содержащие части различных полипептидов, и (5) их конъюгаты. В разных вариантах реализации изобретения оболочечные и необолочечные структурные белки для применения в вакцинах содержат полипептид, содержащий любой их иммуногенный фрагмент либо вариант, способный вызывать иммунный ответ, специфический в отношении данного белка.

**[0048]** Например, иммуногенные варианты сохраняют по меньшей мере 90% аминокислотной идентичности в отношении по меньшей мере 10 последовательных аминокислот антигена, или по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности в отношении по меньшей мере 15 последовательных аминокислот антигена (например,

оболочечного белка или необолочечного структурного белка). Другие примеры включают сохранение по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в отношении по меньшей мере 50 последовательных аминокислот антигена или в отношении по меньшей мере 100 последовательных аминокислот антигена. В одном варианте реализации изобретения иммуногенные варианты характеризуются по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в отношении полной длины конкретного антигена. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант является вариантом природного происхождения.

**[0049]** В другом примере иммуногенные фрагменты и их варианты содержат по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 48 или 50 последовательных аминокислот антигена. Иммуногенный фрагмент может содержать любое количество последовательных аминокислот из вышеуказанного так, что иммуногенный фрагмент составляет, к примеру, около 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 или более последовательных аминокислот иммуногенного полипептида.

**[0050]** Короткие фрагменты, часто называемые пептидами, выбирают таким образом, чтобы они образовывали комплекс с молекулами ГКГ для связывания рецепторов Т-клеток, и, в общем случае, имеют длину до около 30 аминокислот, или до около 25 аминокислот, или до около 20 аминокислот, или до около 15 аминокислот, до около 12 аминокислот, до около 9 аминокислот, до около 8 аминокислот. В общем случае более короткие пептиды связываются или ассоциируют с молекулами ГКГ класса I, а более длинные пептиды связываются или ассоциируют с молекулами ГКГ класса II. Подходящие пептиды можно выбрать, используя любые биоинформатические программы, и исследовать, используя хорошо известные методы. Короткие фрагменты, также называемые в данном документе “пептидами”, обычно имеют длину в 15-100 аминокислот; более длинные фрагменты обычно содержат от 100 аминокислот до полной длины, хотя диапазоны длин для пептидов (коротких фрагментов) и более длинных фрагментов строго не ограничены.

**[0051]** Согласно данному документу подходящие белки включают белки-предшественники, зрелые белки, фрагменты, слитые белки и пептиды. Белки могут находиться в составах в такой же самой форме или представлять смесь из этих форм. Например, оболочечный гликопротеин может находиться в виде зрелого белка, а структурный белок в виде фрагмента, либо и оболочечный гликопротеин и структурный

белок могут находиться в виде фрагментов. Для клеточной выработки гликопротеинов частью белка-предшественника может являться сигнальный пептид. Сигнальные пептиды включают нативную последовательность гликопротеина D или другие известные в данной области техники последовательности. Также целесообразным может являться использование белка без трансмембранного или внутриклеточного участка, либо их обоих.

**[0052]** Согласно обсуждению, приведенному в данном документе, были выбраны одна или более частей оболочечного гликопротеина, также называемых фрагментами, по причине того, что они содержат один или более эпитопов, которые связывают нейтрализующие антитела. Части, содержащие эпитопы, можно определить при помощи аналитических методов, таких как подавление нейтрализующих антител при вирусном инфицировании клеток. Вкратце, перекрывающиеся части оболочечного гликопротеина ВПГ-2 смешивают с нейтрализующими антителами (например, сывороткой, полученной от инфицированного животного или человека) и добавляют эту смесь в ВПГ-2 и перmissive клеточную линию. Если часть белка содержит эпитоп, который связывается с антителами, клеточная линия будет инфицирована ВПГ-2. Если часть белка не содержит эпитоп, клеточная линия не будет инфицирована.

**[0053]** Составы, которые содержат по меньшей мере один иммуногенный фрагмент иммуногенного полипептида ВПГ-2, можно использовать в качестве иммуногенов. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенный фрагмент кодируется рекомбинантными экспрессионными векторами, описанными в данном документе. Иммуногенный фрагмент может состоять из по меньшей мере 6, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более последовательных аминокислот иммуногенного полипептида. Иммуногенный фрагмент может содержать любое количество последовательных аминокислот в вышеуказанных пределах, так что иммуногенный фрагмент может состоять, к примеру, из около 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 или более последовательных аминокислот иммуногенного полипептида. Иммуногенные фрагменты могут содержать достаточное количество последовательных аминокислот, которые образуют линейный эпитоп, и/или могут содержать достаточное количество последовательных аминокислот, которое позволяет фрагменту принимать такую же (или достаточно схожую) трехмерную конформацию, что и полноразмерный полипептид, из которого был получен данный фрагмент, чтобы представлять собой нелинейный эпитоп или эпитопы (также называемые в данной области техники конформационными эпитопами). Методы для определения того, принимает ли иммуногенный фрагмент конформацию, сравнимую с полноразмерным полипептидом,

включают, например, способность белка вступать в реакцию с моно- или поликлональными антителами, которые являются специфическими для нативных или неструктурированных эпитопов, сохранение других лиганд-связывающих функций и чувствительность или устойчивость фрагмента полипептида к расщеплению протеазами (смотрите, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)). Соответственно, в качестве примера можно привести утверждение, что трехмерная конформация фрагмента полипептида является достаточно схожей с полноразмерным полипептидом, если способность связывать и степень связывания антитела, которое специфически связывается с полноразмерным полипептидом, является практически одинаковой как для фрагмента, так и для полноразмерного полипептида (т.е., степень связывания сохраняется на статистически, клинически и/или биологически достаточном уровне по отношению к иммуногенности типичного антигена или полноразмерного антигена дикого типа).

**[0054]** Фрагменты, для которых проводят скрининг в ходе анализа, такие как те, что описаны выше, в общем случае являются короткими. В общем случае длина кандидатного фрагмента составляет до около 40 аминокислот, или до около 25 аминокислот, или до около 20 аминокислот, или до около 15 аминокислот, или до около 12 аминокислот, или до около 9 аминокислот, или до около 8 аминокислот. Фрагменты, которые используют для скрининга, обычно являются перекрывающимися. Например, группа фрагментов может содержать фрагменты длиной в 20 аминокислот, которые перекрываются в 16 аминокислотах (т.е., содержат ступеньку из 4 аминокислот). Обычно перекрывающиеся группы начинаются в N-конце непротессированного гликопротеина, т.е., содержат лидерную последовательность, а заканчиваются C-концевой аминокислотой внеклеточного домена.

**[0055]** Были отобраны фрагменты, которые связываются с нейтрализующим антителом и могут быть использованы в фармацевтическом составе согласно описанию, приведенному в данном документе. Фрагменты можно использовать в том виде, в котором они существуют, либо дополнительно сконструированными или в комбинации с другими фрагментами. Фрагменты, которые являются достаточно крупными и сложными для того, чтобы быть иммуногенными, можно использовать в фармацевтических составах. Для фрагментов с ММ около 1000 вероятность иммуногенности является низкой, хотя сложность тоже может играть роль в том, является ли фрагмент иммуногенным. Например, гомополимеры, состоящие из повторяющихся единиц из одиночных аминокислот являются слабыми иммуногенами, несмотря на свой размер, при этом кополимеры из 2 или 3 аминокислот могут быть хорошими иммуногенами. Для того,

чтобы кополимер глутаминовой кислоты и лизина был иммуногенным, его ММ должна составлять по меньшей мере 30-40000. Аминокислоты с ароматическими боковыми цепями увеличивают иммуногенность так, что, к примеру, фрагмент, имеющий ММ всего около 4000, который содержит тирозин и фенилаланин, может быть иммуногенным. Фрагменты, которые являются слишком короткими или недостаточно сложными для того, чтобы быть иммуногенными, можно конъюгировать с белком-носителем, таким как KLH (гемоцианин лимфы улитки), овальбумин, бычий сывороточный альбумин или другой белок, являющийся чужеродным для особи, которой вводят фармацевтический состав, либо фрагменты можно спаривать между собой для получения иммуногенного белка. Является ли фрагмент иммуногенным или нет, можно определить после введения его животному. Например, фрагмент можно ввести животному по схеме первичная-вторичная инъекция, и проанализировать антитела к фрагменту при помощи, например, ELISA, используя сыворотку, собранную через 7-10 дней после вторичной инъекции. Наличие детектируемого сигнала указывает на то, что фрагмент является иммуногенным. Более сильные сигналы являются предпочтительными. Другие методы анализа иммуногенности хорошо известны специалисту в данной области техники.

**[0056]** В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты, которые используются в составах, представляют собой синтетические длинные пептиды. “Синтетический длинный пептид” (SLP – от англ. “synthetic long peptide”) является белковой последовательностью, полученной *ex vivo* и имеющей приблизительную длину не менее 25 аминокислот и не более 100 аминокислот. SLP должен быть достаточно длинным для того, чтобы он мог поглощаться и процессироваться дендритными клетками для презентирования на их поверхности с молекулами ГКГ класса I или класса II. SLP представляют собой пептиды, полученные из белков, на которые необходимо получить иммунный ответ. В одном варианте реализации изобретения иммунный ответ является Т-клеточным ответом. Белки могут являться известными антигенами или, в случае некоторых белков, они могут быть кандидатными антигенами.

**[0057]** SLP содержит по меньшей мере один эпитоп CD4 или по меньшей мере один эпитоп CD8, или по меньшей мере один эпитоп CD4 и по меньшей мере один эпитоп CD8. Эпитоп CD4 соответствует аминокислотной последовательности, которая связывается с ГКГ класса II, а эпитоп CD8 соответствует аминокислотной последовательности, которая связывается с ГКГ класса I. Последовательности эпитопов получены из аминокислотной последовательности иммуногена; *in vivo*, вкратце, иммуноген поглощается или синтезируется антиген-процессирующими клетками (например, дендритными клетками) и распадается на пептиды, которые ассоциируют с

молекулами ГКГ и презентуются на поверхности клетки в виде ГКГ-пептидного комплекса. Пептиды, комплексированные с молекулами ГКГ класса I, взаимодействуют с антигенным рецептором Т-клетки и CD8 на CD8<sup>+</sup> Т-клетках, эти пептиды называются эпитопами CD8; пептиды, комплексированные с молекулами ГКГ класса II, взаимодействуют с антигенным рецептором Т-клетки и CD4 на CD4<sup>+</sup> Т-клетках, эти пептиды называются эпитопами CD4. Активированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки становятся цитотоксическими Т-клетками, которые распознают и уничтожают клетки-мишени, обнаруживающие эпитопы CD8 ГКГ класса I. Часто клетки-мишени являются инфицированными или опухолевыми клетками. Активированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки становятся хелперными Т-клетками и, в зависимости от своего подтипа, помогают В-клеткам вырабатывать антитела или активировать натуральные клетки-киллеры, фагоциты и CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток является частью полноценного клеточного иммунного ответа.

**[0058]** Как раскрыто выше, SLP должен быть достаточно длинным для того, чтобы он мог поглощаться и процессироваться дендритными клетками и презентироваться на их поверхности с молекулами ГКГ. Пептиды, комплексированные с молекулами ГКГ класса I, в общем случае имеют длину в 8-11 аминокислот, а пептиды, комплексированные с молекулами ГКГ класса II, в общем случае имеют длину в 13-17 аминокислот, хотя более длинные или короткие пептиды не являются исключениями. Таким образом, длина SLP обычно составляет по меньшей мере 25 аминокислот и до 100 аминокислот (например, по меньшей мере 30 ак, по меньшей мере 35 ак, по меньшей мере 40 ак, по меньшей мере 45 ак, по меньшей мере 50 ак, по меньшей мере 55 ак, по меньшей мере 60 ак, по меньшей мере 65 ак, по меньшей мере 70 ак, по меньшей мере 75 ак, по меньшей мере 80 ак, по меньшей мере 85 ак, по меньшей мере 90 ак, по меньшей мере 95 ак). В общем случае длина SLP составляет около 45 ак или около 50 ак.

**[0059]** Последовательности эпитопов могут быть известными или неизвестными. Большое количество белков было картировано в отношении содержания эпитопов CD4 или CD8. Длина SLP, содержащих один или более из этих эпитопов, обычно составляет около 45 ак. К тому же, эпитоп может фланкироваться приблизительно 15 ак с N-концевой и C-концевой стороны. Фланкирующими последовательностями обычно являются последовательности, которые фланкируют последовательность эпитопа в нативном белке. Как обсуждалось выше, SLP может содержать более одного эпитопа, множественные эпитопы могут все являться эпитопами CD4 или CD8 или смешанными эпитопами CD4 и CD8. Кроме того, эпитопы в последовательности могут перекрываться (смотрите Пример 1, в котором описаны некоторые примеры SLP, содержащих перекрывающиеся эпитопы).

Общее количество используемых SLP может быть таким, чтобы были представлены все известные эпитопы CD4 и CD8.

**[0060]** SLP можно синтезировать любым из множества способов (смотрите Corradin et al., *Sci Translational Med* 2: 1, 2010, где приведено общее обсуждение способов синтеза). Автоматизированные синтезаторы пептидов являются коммерчески доступными, а многие компании предоставляют услуги синтеза (например, Abbiotec, American Peptide Company, AnaSpec, Bachem, Covance Research Products, Invitrogen). После синтеза пептиды очищают, обычно при помощи ВЭЖХ, хотя можно использовать альтернативные методы очистки, такие как ионообменную хроматографию и гель-фильтрационную хроматографию. Приемлемая степень очистки составляет по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98% при определении при помощи ВЭЖХ.

**[0061]** Если белок не был картирован в отношении содержания эпитопов CD4 или эпитопов CD8, можно синтезировать группу SLP, содержащих полную белковую последовательность. Каждый SLP обычно будет состоять из около 50 ак, а следующие друг за другом SLP могут перекрываться по последовательностям приблизительно в 25 ак. В альтернативном или в дополнительном варианте можно использовать алгоритмы и компьютерные программы для прогнозирования последовательностей, которые будут связываться с молекулами ГКГ класса I и класса II. Такие программы являются общедоступными, например, это RANKPEP (Reche et al., *Human Immunol* 63: 701, 2002), EpiPredict (Jung et al., *Biologicals* 29: 179, 2001) и MHCpred (Guan et al. *Nucl Acids Res* 31: 3621, 2003 и Guan et al., *Appl Bioinformatics* 5: 55, 2006), EpiMatrix (Einax, Inc.).

**[0062]** При необходимости можно добиться оптимальной конфигурации последовательности SLP. Например, можно исключить одну или более аминокислот в концах пептида, полученного из нативной последовательности, чтобы улучшить растворимость или стабильность, либо увеличить или уменьшить общий заряд. В отдельном примере пептидная последовательность с высоким содержанием гидрофобных аминокислот может быть труднорастворимой. Как правило, содержание гидрофобных элементов в идеале должно составлять менее 50%. Пептиды, содержащие остатки цистеина, метионина или триптофана, в особенности множественные остатки Cys, Met или Trp, могут быть трудносинтезируемыми. Замещение другой аминокислотой, стандартной или нестандартной аминокислотой, такой как гидроксипролин, гамма-аминомасляная кислота, норлейцин, может улучшить эффективность синтеза или очистки. Другие факторы, которые необходимо учитывать при конструировании SLP, включают степень  $\beta$ -слоевого образования, N-концевую аминокислоту (например, N-концевой Gln может циклизироваться), минимизацию прилегающих остатков Ser и Pro.

**[0063]** Некоторые структурные белки, наиболее подходящие для включения в фармацевтический состав, включают UL19 (SEQ ID No. 4), фрагмент верхнего домена UL19 (SEQ ID No.12), UL 25 (SEQ ID No. 5) и UL47 (SEQ ID No. 6). Структуру вирусных белков можно найти в MMDB (базе данных по молекулярному моделированию) NCBI. Информация по молекулярной структуре доступна для UL25 (MMDB ID: 37706, Bowman et al. J. Virol. 80:2309, 2006, включена в полном объеме), VP5 (продукт UL19) (MMDB ID: 26005, Bowman et al., EMBO J. 22: 757-765, 2003, включена в полном объеме), VP13/14 (продукт UL47) (MMDB ID: 6022) и оболочечного белка gD2 (MMDB ID: 36244, Krummenacher et al. EMBO J 24:4144-4153, 2005, включена в полном объеме), ICP34.5, а также для многих других белков ВПГ-2. Дополнительно известны некоторые эпитопы Т-клеток вирусных белков (Koelle et al., J Virol 74:10930-10938, 2000; Muller et al., J Gen Virol 90:1153-1163, 2009; Koelle et al., J Immunol 166:4049-4058, 2001; BenMohamed et al., J Virol 77:9463-9473, 2003; патент США № 6,855,317; публикация согласно P.C.T. № WO 2004/009021, все ссылки включены в полном объеме).

**[0064]** В данном документе главным образом предполагается использование в фармацевтических составах иммуногенных фрагментов, вариантов и продуктов слияния любых из указанных белков, в частности, UL19, фрагмента верхнего домена UL19, UL25 и UL47. Таким образом, изобретение включает в себя фрагменты или варианты любого белка из SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 12, который сохраняет по меньшей мере 90% аминокислотной идентичности на участке из по меньшей мере 10 последовательных аминокислот или по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности на участке из по меньшей мере 15 последовательных аминокислот. В качестве другого примера изобретение включает в себя иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 48 или 50 последовательных аминокислот из последовательности, или около 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 или более последовательных аминокислот из последовательности. Также изобретение включает в себя варианты, обладающие по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности на участке из по меньшей мере 50 последовательных аминокислот из последовательности или на участке из по меньшей мере 100 последовательных аминокислот из последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант является вариантом природного происхождения, предпочтительно гибридизирующимся в жестких условиях с полинуклеотидом, кодирующим любой белок из SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 12.

**[0065]** Согласно данному -документу, могут быть использованы иммуногенные фрагменты, включая пептиды, необолочечного структурного белка (например, пептиды UL19, приведенные в SEQ ID Nos. 9 и 10, и пептиды UL25, приведенные в SEQ ID No. 11) и оболочечного белка (например, gD2 (SEQ ID Nos. 7 и 8)) либо они могут быть частью более длинной последовательности (т.е., фрагментом), полученным из белка. Пептиды, применяемые в данном изобретении, обычно относятся к коротким последовательностям аминокислот, в общем случае от по меньшей мере 15 остатков и до около 100 остатков, или от около 20 остатков до около 80 остатков, или от 30 остатков до около 70 остатков. Фрагменты, применяемые в данном изобретении, относятся к полипептиду произвольной длины, но меньшей чем полноразмерный белок, и в общем случае имеют длину в по меньшей мере 100 аминокислот, хотя диапазон размеров фрагментов может перекрываться с диапазоном размеров пептидов (например, фрагменты длиной от около 50 остатков). В частности, во фрагменте верхнего домена UL19 отсутствует по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или все остатки 1-450 и остатки 1055-1374 UL19. Таким образом, фрагмент верхнего домена может начинаться, например, в любом из остатков 337-451 и заканчиваться в любом из остатков 1055-1294 (при этом в нем отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 1-336 и 1295-1374 из SEQ ID NO: 4). Например, фрагмент UL19 могут составлять остатки от около 451 до около 1054 (SEQ ID NO: 12). Фрагмент верхнего домена UL19 может содержать около 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот или более из SEQ ID NO: 12.

**[0066]** Вдобавок, пептиды и фрагменты согласно изобретению могут быть сшиты с гетерологичными пептидами. Примеры гетерологичных пептидов включают последовательности, полученные из других белков (например, в случае UL19 фрагмент верхнего домена UL19 может быть сшит с последовательностью, полученной из другого белка, не являющегося UL19), или маркерные последовательности, такие как гексагистидин, который в общем случае может располагаться как в N-конце, так и в C-конце. Таким образом, описанные в данном документе иммуногенные фрагменты или варианты могут быть сшиты с другим пептидом, который усиливает иммуногенность, другим пептидом, который служит меткой или маркером, или другим пептидом, полученным из другого структурного белка ВПГ-2. Следовательно, иммуногенный полипептид может содержать фрагмент, состоящий из указанного фрагмента структурного белка ВПГ-2. В одном примере иммуногенный полипептид содержит фрагмент UL19, состоящий из SEQ ID NO: 12, фрагмент из SEQ ID NO: 12, в некоторых случаях слитый с отличным от UL19 пептидом. В другом примере иммуногенный полипептид содержит пептид, состоящий из аминокислотной последовательности,

которая является по меньшей мере на 80% или 90% идентичной SEQ ID NO: 12 на участке из более 50 последовательных аминокислот, в некоторых случаях сшитый с отличным от UL19 пептидом.

**[0067]** Приведенные в данном документе примеры неожиданно показали, что фрагмент верхнего домена UL19 обладает способностью вызывать выработку защитных антител к ВПГ-2 так, что остаток белка UL19 не нужен как иммуноген. Это неожиданное открытие является удачей, так как попытки экспрессировать полноразмерный UL19 сталкивались с определенными трудностями. Например, экспрессия полноразмерного UL19 в *E. coli* и других экспрессионных системах, и последующая очистка растворимого полноразмерного UL19 оказались затрудненными.

**[0068]** Обычно белки в фармацевтическом составе будут отличаться от белка-предшественника, так как экспрессия в эукариотической клетке обычно приводит к получению зрелого белка с отсутствующей лидерной последовательностью (также известной как сигнальный пептид). Лидерная последовательность gD включает в себя приблизительно остатки 1-25. Лидерная последовательность gB включает в себя приблизительно остатки 1-22. Гликопротеин D (SEQ ID No.2) представляет собой белок из 393 аминокислот и содержит внеклеточный участок, занимающий приблизительно остатки 26-340, трансмембранный участок, занимающий приблизительно остатки 341-361, и цитоплазматический участок, занимающий приблизительно остатки 362-393, а также определенное количество участков N-гликозилирования в остатках 119, 146, 287 (UniProtKB/Swiss-Prot номер доступа Q69467, версия 49 для входа и версия 1 для последовательности). Приведенный в качестве примера фрагмент gD (имеющий в данном документе другой вариант названия – gD2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID No. 3.

**[0069]** В некоторых вариантах реализации изобретения антигенные и иммуногенные фрагменты, полученные из оболочечных гликопротеинов, могут содержать часть или всю лидерную последовательность, которая иногда называется сигнальным пептидом. Длина лидерной последовательности обычно составляет приблизительно 15-20 аминокислот, и в случае нормальных клеточных процессов она может отщепляться клеточным аппаратом, однако некоторые гликопротеины в интактных вирионах могут содержать лидерную последовательность. Лидерные последовательности обычно содержат некоторое количество полярных аминокислот в N-конце, а внутренние аминокислоты в общем случае являются гидрофобными. Как обсуждалось выше, были определены лидерные последовательности для некоторых оболочечных гликопротеинов ВПГ-2. В случае других оболочечных гликопротеинов ВПГ-2 можно использовать

компьютерные программы для прогнозирования сигнального пептида. Некоторые из этих программ включают SIG-Pred ([bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)), PrediSi ([www.predisi.de](http://www.predisi.de)), OCTOPUS ([octopus.cbr.su.se](http://octopus.cbr.su.se)) и sigcleave ([emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/sigcleave.html](http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/sigcleave.html)).

**[0070]** Большое количество способов можно использовать для подавления отщепления сигнального пептида во время клеточной выработки антигенного и иммуногенного фрагмента, содержащего лидерную последовательность, для применения в описанных в данном документе составах. Например, одну или более из аминокислот, фланкирующих сайт расщепления, можно заменить другой аминокислотой, что приводит к получению последовательности, которая не распознается или не отщепляется клеточным аппаратом. В данном способе замены проводят на основании известных в данной области техники сайтов расщепления: глицин преимущественно не используется ни в одной из позиций, тирозин редко находится в первых нескольких позициях, следующих за сайтом расщепления, в то время как пролин часто находится во многих сайтах расщепления за исключением позиции +1, а глутамин обычно находится в +1 остатке (Zhang and Henzel, *Protein Sci.* 13: 219, 2004). Предложенную последовательность можно оценить при помощи программы прогнозирования, чтобы определить вероятность подавления отщепления. Если существует большая вероятность отщепления, то проводят дополнительные изменения и повторно оценивают заново предложенную последовательность. Другие способы подавления отщепления сигнального пептида включают добавление одной или более аминокислот в последовательность распознавания и отщепления, N-концевое добавление сигнального пептида и последовательности распознавания таким образом, что происходит преимущественное отщепление добавленного сигнального пептида, и выработка в клетке-хозяине, в которой отсутствуют механизмы отщепления сигнального пептида.

**[0071]** В определенных вариантах реализации изобретения фрагмент содержит гликопротеин ВПГ-2, включая лидерную последовательность. В других вариантах реализации изобретения фрагмент содержит часть гликопротеина ВПГ-2, начиная от лидерной последовательности и до начала трансмембранного домена. В других вариантах реализации изобретения фрагмент содержит часть гликопротеина ВПГ-2, начиная от лидерной последовательности и заканчивая внеклеточным доменом. В других вариантах реализации изобретения фрагмент содержит несмежные части гликопротеина ВПГ-2, при этом одна из частей содержит антигенный эпитоп в лидерной последовательности. В других вариантах реализации изобретения фрагмент содержит несмежные части гликопротеина ВПГ-2, при этом указанные части содержат эпитоп, или он содержит

части, полученные из разных гликопротеинов ВПГ-2, при этом указанные части содержат эпитоп.

**[0072]** Гликопротеин В (SEQ ID No. 1) содержит внеклеточный участок, занимающий приблизительно остатки 23-771, трансмембранный участок, занимающий приблизительно остатки 772-792, и цитоплазматический участок, занимающий приблизительно остатки 793-904, а также некоторое количество N-связанных участков гликозилирования в остатках 82, 136, 393, 425, 486, 671 (UniProtKB/Swiss-Prot accession number P08666, version 60 of entry and version 2 of sequence). Гликопротеин К представляет собой белок из 338 аминокислот с лидерной последовательностью из 30 аминокислот в N-конце (Ramaswamy and Holland, *Virology* 186:579-587, 1992). Гликопротеин С содержит спрогнозированную лидерную последовательность из 27 аминокислот, гликопротеин Е содержит спрогнозированную лидерную последовательность из 23 аминокислот, а гликопротеин L содержит спрогнозированную лидерную последовательность из 16 аминокислот (Signal Peptide Resource, [proline.bic.nus.edu.sg](http://proline.bic.nus.edu.sg), по состоянию на 06 октября 2011 г.).

**[0073]** Белки или белковые фрагменты предпочтительно являются иммуногенными. “Иммуноген” способен индуцировать иммунный ответ. Иммуногенные пептидные последовательности в общем случае распознаются Т-клетками (например, CD4 или CD8 Т-клетками) по меньшей мере у некоторых серопозитивных субъектов. Пептидные последовательности можно определить, проводя скрининг пептидов, полученных из полной последовательности, используя в общем случае группы перекрывающихся пептидов. Для определения того, имеют ли место распознавание Т-клетками и ответ на пептид, можно использовать большое количество аналитических методов. Например, среди подходящих методов можно назвать цитотоксический анализ с радиоактивным хромом (Kim et al., *J Immunol* 181:6604-6615, 2008, включенная вместе с протоколом анализа), метод анализа ELISPOT, метод внутриклеточного окрашивания цитокинов и окрашивания мультимеров ГКГ (Novak et al. *J Clin Invest* 104:R63-R67, 1999; Altman et al., *Science* 274:94-96, 1996). В некоторых случаях фрагмент(ы) содержат иммунодоминантные пептидные последовательности. Для гликопротеинов ВПГ-2 и структурных белков были определены некоторые иммунодоминантные эпитопы (например, Kim et al. *J Immunol* 181:6604-6615, 2008; Chentoufi et al., *J Virol* 82:11792-11802, 2008; Koelle et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12899-12904, 2003; все ссылки в полном объеме включены в данный документ). Иммуногенные пептиды можно также прогнозировать при помощи биоинформатического программного обеспечения (Flower, *Methods in Molecular Biology* vol. 409, 2007). Примеры некоторых программ и баз данных

включают FRED (Feldhahn et al. *Bioinformatics* 15:2758-9, 2009), SVMHC (Donnes and Kohlbacher, *Nucleic Acids Res* 34:W1940197, 2006), AntigenDB (Ansari et al., *Nucleic Acids Res* 38:D847-853, 2010), ТЕРИТОРЕ (Bian and Hammer *Methods* 34:468-475, 2004).

**[0074]** Любые белки ВПГ-2, включая белки-предшественники, зрелые белки и фрагменты, могут быть включены в качестве части слитого белка. Участником или участниками слияния могут быть любые белки ВПГ-2 или не принадлежащая ВПГ-2 белковая последовательность. Некоторые стандартные причины применения слитых белков включают улучшение экспрессии или облегчение очистки полученного в результате белка. Например, последовательность сигнального пептида, сконструированную для клетки-хозяина экспрессионной системы, можно связать с белком ВПГ-2, либо маркерную последовательность для использования в очистке белка можно связать и впоследствии отщепить в случае, если последовательность расщепления также включена. Можно сшить множественные эпитопы из одного или более белков либо можно сшить фрагменты из одного или более белков. Например, можно связать структурные белки или фрагменты структурных белков, такие как слитый белок VP13/14 (UL47) и основной капсидный белок (UL19), или UL25 и UL47, или UL25 и UL19. Сегменты слитого белка могут располагаться в любом порядке, например, в продукте слияния UL19 и UL47 любой из белков может находиться в N-конце. Аналогично, множественные пептидные эпитопы могут располагаться в любом порядке.

**[0075]** Получение белков ВПГ-2, включая белки-предшественники, фрагменты и слитые белки, в общем случае осуществляется путем экспрессии в культивируемых клетках или путем химического синтеза. (Выражение “белки ВПГ-2” употребляется в данном документе как включающее все эти формы.) Короткие фрагменты обычно синтезируют химически, используя оборудование (многое такое оборудование является коммерчески доступным) либо вручную. Для выработки в клетках хорошо известно и может быть применено большое количество подходящих экспрессионных систем, как прокариотических, так и эукариотических. Часто применяемые и подходящие для выработки белка клетки-хозяева включают клетки *E. coli*, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Экспрессионные векторы и клетки-хозяева являются коммерчески доступными (например, от Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния, США) либо могут быть сконструированы. Вектор, который можно привести в качестве примера, содержит промотор и сайт клонирования для последовательности, кодирующей представляющий интерес белок, таким образом, что промотор и последовательность функционально связаны между собой. Также могут присутствовать другие элементы, такие как секреторная сигнальная последовательность (иногда называемая лидерной

последовательностью), маркерная последовательность (например, hexa-His), сигнал терминации транскрипции, точка начала репликации, в особенности, если вектор реплицируется вне хромосомы, и последовательность, кодирующая селективируемый продукт. Также хорошо известны методы и процедуры трансфекции клеток-хозяев.

**[0076]** Экспрессированные белки собирают и используют в том виде, в котором они существуют, либо, в большинстве случаев, анализируют и дополнительно очищают. Стандартные процедуры для определения степени очистки или количественного определения включают гель-электрофорез, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрию и ELISA. Активность белков в общем случае оценивают при помощи биологических аналитических методов, таких как те, что описаны в Примерах. Если это необходимо или желательно, белки могут быть дополнительно очищены. Многие способы очистки хорошо известны и включают эксклюзионную хроматографию, анионо- или катионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, преципитацию и иммунную преципитацию. Предполагаемое применение белка обычно определяет степень очистки, при этом наивысшая степень очистки соответствует человеческим нуждам.

**В. Вещества, которые активируют врожденный иммунитет**

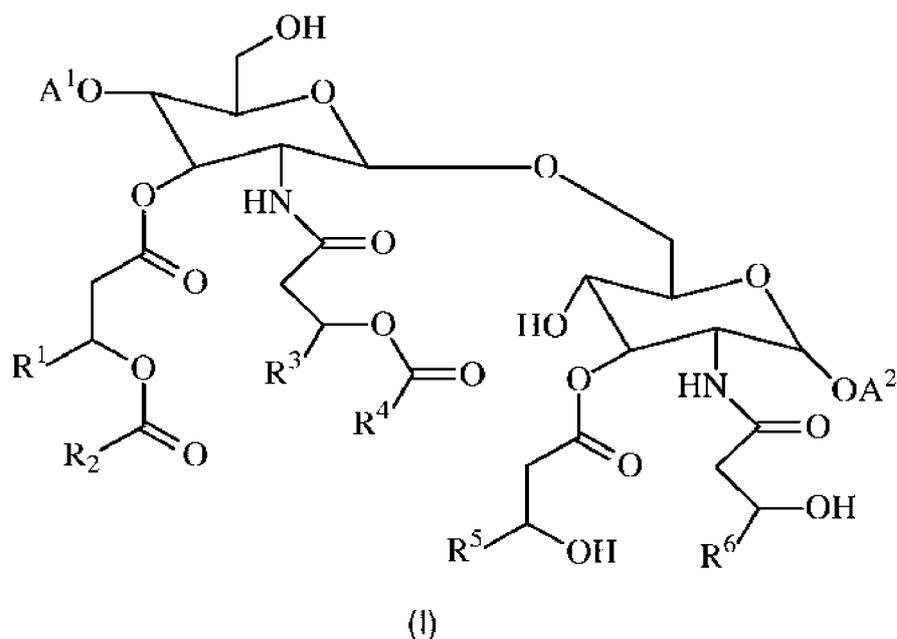
**[0077]** Врожденная иммунная система включает клетки, которые неспецифическим способом обеспечивают защиту при инфицировании другими организмами. Врожденный иммунитет обеспечивает немедленную защиту, но не является долгосрочным и не защищает от будущих угроз. Клетки иммунной системы, которые в общем случае участвуют в процессах врожденного иммунитета, являются фагоцитарными, такими как макрофаги и дендритные клетки. Врожденная иммунная система разными способами взаимодействует с адаптивной (также называемой приобретенной) иммунной системой. Клетки врожденной иммунной системы могут участвовать в презентации антигена клеткам адаптивной иммунной системы, включая экспрессию лимфокинов, которые активируют другие клетки, выделение хемотаксических молекул, которые притягивают клетки, которые могут быть специфическими к возбудителю, и секрецию цитокинов, которые задействуют и активируют клетки адаптивной иммунной системы. Раскрытые в данном документе иммуногенные фармацевтические составы содержат вещество, которое активирует врожденный иммунитет, с целью повысить эффективность состава.

**[0078]** Врожденный иммунитет может активироваться многими типами веществ. Организмы, такие как бактерии и вирусы, могут активировать врожденный иммунитет, так же, как и компоненты этих организмов, химические вещества, такие как 2'-5' олиго А, бактериальные эндотоксины, дуплексы РНК, одноцепочечные РНК и другие молекулы.

Действие многих веществ опосредовано семейством молекул – toll-подобных рецепторов (TLR). Привлечение TLR также может привести к выработке цитокинов и хемокинов, а также к активации и созреванию дендритных клеток – компонентов, участвующих в развитии приобретенного иммунитета. Семейство TLR может проявлять ответ на большое количество веществ, включая липопротеины, пептидогликаны, флагеллин, имидазохинолины, CpG-ДНК, липополисахариды и двухцепочечные РНК (Akira et al. *Biochemical Soc Transactions* 31: 637-642, 2003). Иногда эти типы веществ называют патоген(или микроб)-ассоциированными молекулярными паттернами.

**[0079]** В одном аспекте реализации в состав включены один или более адъювантов для того, чтобы обеспечить наличие веществ(а), которые активируют врожденный иммунитет. Адъювант представляет собой вещество, включенное в состав или вводимое одновременно с антигеном, что усиливает иммунный ответ. Было предложено множество вариантов для того чтобы объяснить механизм работы адъювантов (например, это депо антигенов, активаторы дендритных клеток, макрофаги). Не привязываясь к какой-либо теории, можно сказать, что один из механизмов включает активацию врожденной иммунной системы, которая приводит к выработке хемокинов и цитокинов, которые, в свою очередь, активируют адаптивный (приобретенный) иммунный ответ. В частности, некоторые адъюванты активируют дендритные клетки посредством TLR. Таким образом, адъювант представляет собой один из типов веществ, которые активируют врожденную иммунную систему, что может найти применение в вакцине против ВПГ-2. Действие адъюванта также может привести к усилению приобретенного иммунного ответа другими способами. Предпочтительно адъювант является агонистом TLR4.

**[0080]** Один из адъювантов, который можно применять в описанных в данном документе составах, - молекула типа кислого липида А (MALA). Примером MALA является MPL® – адъювант, описанный, например, в Ulrich J .T. and Myers, K.R., “Monophosphoryl Lipid A as an Adjuvant” Chapter 21 in *Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach*, Powell, M.F. and Newman, M.J., eds. Plenum Press, NY 1995. Другой пример MALA описывается химической формулой (I):



**[0081]** где компоненты  $A^1$  и  $A^2$  независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, фосфата, фосфатных солей, карбоксилата, карбоксилатных солей, сульфата, сульфатных солей, сульфита, сульфитных солей, аспартата, солей аспартата, сукцината, солей сукцината, карбоксиметилфосфата и солей карбоксиметилфосфата. Натрий и калий являются примерами противоионов для фосфатных и карбоксилатных солей. По меньшей мере один из  $A^1$  и  $A^2$  является водородом. Компоненты  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  и  $R^6$  независимо выбраны из группы гидрокарбила, содержащего от 3 до 23 углеродов, предпочтительно неразветвленного алкила, содержащего  $C_3$ - $C_{23}$ . Для дополнительной ясности нужно пояснить, что когда компонент “независимо выбран из” определенной группы, содержащей большое количество элементов, стоит понимать, что элемент, выбранный в качестве первого компонента, никоим образом не влияет или не ограничивает выбор элемента в качестве второго компонента. Атомы углерода, с которыми соединены  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  и  $R^6$ , асимметричны, и, таким образом, могут характеризоваться R или S стереохимией. В одном варианте реализации изобретения все указанные атомы углерода характеризуются R стереохимией, в то время как в другом варианте реализации изобретения все указанные атомы углерода характеризуются S стереохимией.

**[0082]** “Гидрокарбил” или “алкил” относится к химическому компоненту, состоящему исключительно из водорода и углерода, при этом конфигурация атомов углерода может быть неразветвленной или разветвленной, нециклической или циклической, а связи между соседними атомами углерода могут целиком быть представлены одинарными связями, что соответствует насыщенному гидрокарбилу, либо между соседними атомами углерода могут существовать двойные или тройные связи, что соответствует ненасыщенному гидрокарбилу, а количество атомов углерода в

гидрокарбильной группе составляет от 3 до 24 атомов углерода. Гидрокарбил может являться алкилом, при этом типичные неразветвленные алкилы включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.д., включая ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил, октадецил и т.д.; а разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, тертбутил, изопентил и т.д. Типичные насыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.л.; а ненасыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопентинил и циклогексенил и т.д. Ненасыщенные гидрокарбилы содержат по меньшей мере одну двойную или тройную связь между соседними атомами углерода (и называются, соответственно, “алкенил” или “алкинил” в случае нециклического гидрокарбила, и, соответственно, циклоалкенил и циклоалкинил в случае, если гидрокарбил хотя бы частично является циклическим). Типичные неразветвленные и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.д.; а типичные неразветвленные и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.д. Например, “С6-11 алкил” соответствует алкилу согласно приведенному выше определению, содержащему, соответственно, от 6-11 атомов углерода.

**[0083]** Адьювант, представленный формулой (I) можно получить известными в данной области техники синтетическими методами, например, используя методику синтеза, раскрытую в международной публикации согласно РСТ № WO 2009/035528, которая включена в данный документ посредством ссылки, а также в публикациях, упоминаемых в WO 2009/035528, при этом каждая из этих публикаций также включена в данный документ посредством ссылки. Определенные адьюванты также можно получить на коммерческой основе. Предпочтительным адьювантом является Product No. 699800 согласно каталогу Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, где R1, R3, R5 и R6 представляют собой ундецил, а R2 и R4 представляют собой тридецил.

**[0084]** В различных вариантах реализации изобретения адьювант характеризуется химической структурой согласно формуле (I), но компоненты A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 и R6 выбраны следующим образом: A1 является фосфатом или фосфатной солью, а A2 является водородом; R1, R3, R5 и R6 выбраны из C7-C15 алкила; R2 и R4 выбраны из C9-C17 гидрокарбила. В предпочтительном варианте реализации изобретения применяемый в описанных в документе примерах GLA характеризуется структурной формулой, приведенной на Фигуре 1, при этом R1, R3, R5 и R6 представляют собой ундецил, а R2 и R4 представляют собой тридецил.

**[0085]** Вышеописанные адъюванты MALA представляют собой предпочтительный класс адъювантов для применения в описанных в данном документе иммуногенных фармацевтических составах. При этом также можно применять любые из следующих адъювантов как отдельно, так и в комбинации с адъювантом MALA при приготовлении иммуногенного фармацевтического состава.

**[0086]** Адъювантом могут быть квасцы, при этом данный термин относится к солям алюминия, таким как фосфат алюминия ( $AlPO_4$ ) и гидроксид алюминия ( $Al(OH)_3$ ). В случае если квасцы используются в качестве адъювантов или ко-адъювантов, они могут содержаться в дозе иммуногенного фармацевтического состава в количестве от около 100 до 1000 мкг, или от 200 до 800 мкг, или от 300 до 700 мкг, или от 400 до 600 мкг. В случае если адъювант согласно формуле (1) присутствует в препарате вместе с квасцами, адъювант согласно формуле (1) обычно содержится в количестве, меньшем, чем количество квасцов, в различных аспектах реализации содержание адъюванта согласно формуле (1) в массовом эквиваленте составляет 0,1-1%, или 1-5%, или 1-10%, или 1-100% от массы квасцов. В одном аспекте реализации изобретения для состава исключается наличие в нем квасцов.

**[0087]** Адъювантом может быть эмульсия, обладающая свойствами адъюванта для вакцины. Такие эмульсии включают эмульсии типа “масло в воде”. Одним из таких адъювантов является неполный адъювант Фрейнда (IFA). Другой подходящей эмульсией типа “масло в воде” является адъювант MF-59<sup>TM</sup>, который содержит сквален, моноолеат сорбитана полиоксиэтилена (также известный как поверхностно-активное вещество Твин ТМ 80) и триолеат сорбитана. Сквален является природным органическим соединением, изначально получаемым из жира из печени акулы, хотя также доступен из растительных источников (преимущественно растительных жиров), включая семена амаранта, рисовые отруби, зародыши пшеницы и оливки. Другими подходящими эмульсионными адъювантами являются адъюванты Montanide<sup>TM</sup> (Seppic Inc., Fairfield NJ), включая Montanide<sup>TM</sup> ISA 50V, который является минеральным адъювантом на масляной основе, Montanide<sup>TM</sup> ISA 206 и Montanide<sup>TM</sup> MS 1312. Хотя в составе адъюванта могут присутствовать минеральные масла, в одном варианте реализации изобретения все масляные компоненты состава согласно настоящему изобретению представляют собой масла, преобразующиеся в ходе обмена веществ.

**[0088]** Адъювантом может быть адъювант AS02<sup>TM</sup> или адъювант AS04<sup>TM</sup>. Адъюванты AS02<sup>TM</sup> представляют собой эмульсию типа “масло в воде”, которая содержит адъювант MPL<sup>TM</sup> и адъювант QS-21<sup>TM</sup> (адъювант сапонин, который обсуждается в другом месте данного документа). Адъювант AS04<sup>TM</sup> содержит адъювант MPL<sup>TM</sup> и квасцы.

Адьювантом может быть адьювант Matrix-M™.

**[0089]** Адьювантом может быть сапонин, например, полученный из коры деревьев вида *Quillaja saponaria* или модифицированный сапонин, смотрите, например, патенты США № 5,057,540; 5,273,965; 5,352,449; 5,443,829; и 5,560,398. Продукт QS-21™ – адьювант, предоставляемый Antigenics, Inc., Лексингтон, Массачусетс, представляет собой пример сапонин-содержащего коадьюванта, который можно применять совместно с адьювантом согласно формуле (1). Родственное сапонинам семейство адьювантов ISCOM™ изначально было разработано Iscotec (Швеция) и обычно состоит из сапонинов, полученных из *Quillaja saponaria* или его синтетических аналогов, холестерина и фосфолипидов, которые упакованы в подобную сотам структуру.

**[0090]** Адьювантом может быть цитокин, который действует как адьювант, смотрите, например, Lin R. et al. *Clin. Infect. Dis.* 21(6): 1439-1449 (1995); Taylor, C.E., *Infect. Immun.* 63(9):3241-3244 (1995); и Egilmez, N.K., Chap. 14 в *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*, John Wiley & Sons, Inc. (2007). В различных вариантах реализации изобретения цитокином может являться, например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF); смотрите, например, Change D.Z. et al. *Hematology* 9(3):207-215 (2004), Dranoff, G. *Immunol. Rev.* 188: 147-154 (2002) и патент США 5,679,356; или интерферон, такой как интерферон типа I, например, интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) или интерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), или интерферон типа II, например, интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), смотрите, например, Boehm, U. et al. *Ann. Rev. Immunol.* 15:749-795 (1997); и Theofilopoulos, A.N. et al. *Ann. Rev. Immunol.* 23:307-336 (2005); интерлейкин, включая, в частности, интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), интерлейкин-2 (IL-2); смотрите, например, Nelson, B.H., *J. Immunol.* 172(7):3983-3988 (2004); интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-12 (IL-12); смотрите, например, Portielje, J.E., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 52(3): 133-144 (2003) и Trinchieri, G. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):133-146 (2003); интерлейкин-15 (IL-15), интерлейкин-18 (IL-18); лиганд тирозинкиназы-3 фетальной печени (Flt3L) или фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

**[0091]** Адьювантами могут быть неметилированные динуклеотиды CpG, в некоторых случаях конъюгированные с описанными в данном документе антигенами.

**[0092]** Примеры иммуностимуляторов, которые можно использовать в качестве коадьювантов для практического применения описанных в данном документе методов, включают: MPL™; MDP и производные; олигонуклеотиды; двухцепочечные РНК; альтернативные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМПы); сапонины; низкомолекулярные иммуностимуляторы (SMIP); цитокины и хемокины.

**[0093]** В различных вариантах реализации изобретения коадьювантом является

адъювант MPL™, которые коммерчески доступны от GlaxoSmithKline (изначально разработанный Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT). Смотрите, например, Ulrich and Myers, Chapter 21 из Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds. Plenum Press, New York (1995). Родственными адъюванту MPL™ и также подходящими в качестве коадъювантов для применения в описанных в данном документе составах и способах являются адъювант AS02™ и адъювант AS04™. Адъювант AS02™ является эмульсией типа “масло в воде”, которая содержит адъювант MPL™ и адъювант QS-21™ (сапонин-содержащий адъювант, описанный в другом месте данного документа). Адъювант AS04™ содержит адъювант MPL™ и квасцы. Адъювант MPL™ получен из липополисахарида (ЛПС) из Salmonella minnesota R595 при помощи обработки ЛПС слабой кислотой и основного гидролиза с последующей очисткой модифицированного ЛПС.

**[0094]** В случае если два адъюванта применяются в комбинации, относительные количества обоих адъювантов можно выбрать так, чтобы получить необходимые рабочие характеристики состава, который содержит эти адъюванты, по сравнению с одним антигеном. Например, комбинацию адъювантов можно выбрать так, чтобы усилить генерацию антител в ответ на антиген и/или усилить ответ врожденной иммунной системы субъекта. Активация врожденной иммунной системы приводит к выработке хемокинов и цитокинов, которые, в свою очередь, могут активировать адаптивный (приобретенный) иммунный ответ. Важным следствием активации адаптивного иммунного ответа является образование клеток иммунной памяти так, что когда в организм-хозяин снова попадает антиген, иммунный ответ возникает быстрее и, в общем случае, является более эффективным.

**[0095]** Адъювант(ы) можно предварительно изготовить перед тем, как комбинировать с белками ВПП-2. В одном варианте реализации изобретения адъювант можно получить в виде стабильной водной суспензии частиц размера менее, чем 0,2 мкм, при этом он дополнительно может содержать по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из фосфолипидов, жирных кислот, поверхностно-активных веществ, детергентов, сапонинов, фторированных липидов и т.д. Адъювант(ы) можно получить в форме эмульсии типа “масло в воде”, в которую адъювант включен в масляной фазе. Для применения на людях масло предпочтительно является таким, которое преобразуется в ходе обмена веществ. Масло может быть любым растительным жиром, рыбьим жиром, животным жиром или синтетическим жиром; масло не должно быть токсичным для субъекта и подлежать преобразованию в ходе обмена веществ. Типичными источниками растительных жиров являются орехи (например, ореховое масло), семена и

зерна. В особенности подходящие масла, которые преобразуются в ходе обмена веществ, включают сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексан), ненасыщенные жиры, обнаруживаемые во многих маслах и в больших количествах – в жире печени акулы. Сквален является посредником в процессе биосинтеза холестерина. Вдобавок, эмульсии типа “масло в воде” обычно содержат антиоксиданты, такие как альфа-токоферол (витамин Е, US 5,650,155, US 6,623,739). Можно добавлять стабилизаторы, такие как триглицерид, ингредиенты, которые обеспечивают изотоничность, а также другие ингредиенты. Один из примеров эмульсии типа “масло в воде” известен как “SE” и содержит сквален, глицерол, фосфатидилхолин или лецитин, или другой блок-сополимер в качестве поверхностно-активного вещества в аммониево-фосфатном буфере, рН 5,1, совместно с альфа-токоферолом.

**[0096]** Способ получения эмульсий типа “масло в воде” хорошо известен специалистам в данной области техники. Обычно указанный способ включает смешивание масляной фазы с поверхностно-активным веществом, таким как фосфатидилхолин, полксамер, блок-сополимер или раствор ТВИН80® с последующей гомогенизацией при помощи гомогенизатора. Например, способ, который включает прогон смеси один, два или большее количество раз через иглу шприца, подходит для гомогенизации небольших объемов жидкости. Аналогично, процесс эмульгации в микрофлюидизаторе (микрофлюидное устройство M110S, максимальное количество прогонов – 50 за период в 2 мин при максимальном давлении на входе в 6 бар (давление на выходе составляет около 850 бар)) можно приспособить для получения меньших или больших объемов эмульсии. Этого можно достичь путем проведения стандартных экспериментов, включающих оценку полученной в результате эмульсии, до тех пор, пока не будет получен препарат с капельками масла требуемого диаметра. Также можно использовать другое оборудование или другие параметры для получения эмульсии. Описание эмульсионных составов и способа их получения можно найти, например, в патентах США № 5,650,155; 5,667,784; 5,718,904; 5,961,970; 5,976,538; 6,572,861; и 6,630,161.

## С. Фармацевтические составы и их применение

### 1. Приготовление препарата

**[0097]** Заявленный фармацевтический состав содержит гликопротеин ВПГ-2 или его иммуногенный фрагмент, структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина, или его иммуногенный фрагмент, вещество, которое является агонистом для врожденной иммунной системы, и фармацевтически приемлемый носитель. Состав

может содержать более одного гликопротеина (или фрагмента), более одного структурного белка (или фрагмента) или более одного вещества.

**[0098]** В некоторых аспектах реализации фармацевтический состав содержит антигенную часть гликопротеина ВПГ, фармацевтически приемлемый носитель и, необязательно, вещество, которое является агонистом для врожденной иммунной системы. Состав может содержать более одной части гликопротеина и одно или более чем одно вещество-агонист. Носитель в некоторых случаях может обладать свойствами адьюванта, например, свойствами адьювантов обладают некоторые эмульсионные носители. Хотя в данном документе обсуждаются главным образом гликопротеины ВПГ, полученные из ВПГ-2, гликопротеины, полученные из ВПГ-1, также применимы.

**[0099]** В определенных вариантах реализации изобретения гликопротеин или структурный белок, либо они оба могут являться белком-предшественником, зрелым белком, фрагментом, слитым белком или пептидом. Элементы гликопротеина и структурного белка могут являться частью одного и того же или различных слитых белков. Аналогично, в случае наличия более одного гликопротеина или более одного структурного белка они могут являться частью одного слитого белка либо частями отдельных слитых белков. В случае наличия более одного гликопротеина или более одного структурного белка каждый из этих белков может являться белком-предшественником, зрелым белком, фрагментом и т.д., что означает, к примеру, то, что два гликопротеина могут содержать фрагмент и пептид, или, к примеру, два различных фрагмента одного гликопротеина, или, к примеру, два фрагмента различных гликопротеинов.

**[00100]** Количество каждого из белков или иммунологических фрагментов в каждой дозе вакцины обычно находится в диапазоне от около 0,5 мкг до около 50 мкг, или около 0,5 мкг, около 1,0 мкг, около 2 мкг, около 5 мкг, около 10 мкг, около 15 мкг, около 20 мкг, около 30 мкг, около 40 мкг, около 50 мкг, около 75 мкг, около 100 мкг или около 150 мкг, или около 200 мкг, или около 250 мкг, или составляет любое другое подходящее количество, которое определяется как такое, которое обеспечивает эффективность против ВПГ-2. Белки или иммунологические фрагменты могут находиться в разных соотношениях, включая эквимольное соотношение, которое обеспечивает одинаковое количество эпитопов, и эквимассовое соотношение, которое обеспечивает одинаковую массу каждого отдельного белка. Эвимольные и эквимассовые соотношения, которые находятся в пределах около 20% (например, 0,8:1,2), или в пределах около 10% (например, 0,9:1,1), или в пределах около 5% (например, 0,95:1,05) эквивалентности, считаются эквимольными или эквимассовыми. Дозировку обычно определяют согласно

фармакологической активности состава, предназначению (терапевтическому или профилактическому) и габаритам и состоянию субъекта.

**[00101]** Белки могут предоставляться в виде раствора, но также могут быть обезвожены (высушены), в последнем случае пользователь добавляет необходимую жидкость. Как правило, присутствуют также такие добавки как буферы, стабилизаторы, вещества, регулирующие тоничность, поверхностно-активные вещества, консерванты, носители и другие неактивные ингредиенты. Добавки, как правило, являются фармацевтически приемлемыми и биосовместимыми. Предпочтительно, чтобы добавки, иммуногены, вспомогательные вещества и т.д. были в значительной степени свободными от других эндотоксинов, токсичных соединений и загрязняющих примесей, которые могут вызвать нежелательные побочные эффекты. Состав препаратов может варьироваться в зависимости от способа применения. Например, препарат для применения путем в/м инъекции в общем случае будет изотоническим и на водной основе, в то время как препарат для перорального применения может быть инкапсулированным как представляющий собой форму с медленным высвобождением или содержать ароматизаторы. Препараты для аэрозольного применения в общем случае находятся под давлением и содержат пропеллент.

Вещество, которое может быть адьювантом, может предоставляться в виде раствора, обезвоженным или эмульгированным, в общем случае в виде стабильной эмульсии типа “масло в воде”. В одном варианте реализации изобретения указанное вещество может предоставляться в виде стабильной водной суспензии с частицами размером менее 0,2 мкм, и может дополнительно содержать по меньшей мере один компонент из группы, состоящей из фосфолипидов, жирных кислот, поверхностно-активных веществ, детергентов, сапонинов, фторированных липидов и т.д. Такой стабильный водный препарат может быть мицеллярным препаратом. В другом варианте реализации изобретения указанное вещество может быть приготовлено способом, который может соответствовать аэрозольному, а также порошковому или жидкому препарату.

**[00102]** Любые указанные препараты могут также содержать буферы, стабилизаторы, консерванты, носители или другие неактивные ингредиенты. Добавки, как правило, являются фармацевтически приемлемыми и биосовместимыми. В составе может присутствовать более одного вещества, при этом одно, несколько или все вещества также могут являться адьювантами или коадьювантами. Вдобавок, также может присутствовать адьювант или коадьювант, который не является одновременно вспомогательным веществом. Также могут присутствовать депо антигенов, такие как масла или по меньшей мере некоторые масляные эмульсии.

**[00103]** Количество адъюванта, такого как GLA или другой MALA-адъювант, обычно составляет около 0,5 мкг, около 1 мкг, около 2 мкг, около 2,5 мкг, около 5 мкг, около 7,5 мкг, около 10 мкг, около 15 мкг, около 20 мкг или около 25 мкг. Содержание эмульсии, такой как SE, может составлять около 0,1%, около 0,5%, около 1,0%, около 1,5%, около 2%, около 2,5%, около 3%, около 4%, около 5%, около 7,5% или около 10%.

**[00104]** Вещество и белки могут предоставляться в отдельных контейнерах и смешиваться на месте или предварительно смешиваться. Вдобавок, белки также могут находиться в отдельных контейнерах или вместе в одном контейнере. Вспомогательное вещество и белки могут предоставляться в концентрированной форме и дополняться разбавителем. Подходящие разбавители включают соляной раствор и ФСБ. Контейнер может представлять собой флакон, ампулу, пробирку, лунку или мультилуночную посуду, резервуар, шприц или любой другой вид контейнера. Контейнер или контейнеры могут предоставляться в виде набора. Если один или более контейнеров содержат обезвоженные ингредиенты, в наборе могут находиться жидкости для их восстановления, либо они могут обеспечиваться потребителем. Количество раствора в каждом контейнере или количество, которое добавляется в каждый контейнер, соответствует способу применения и тому, сколько доз содержится в каждом контейнере. К примеру, количество вакцины, вводимой при помощи инъекции, обычно составляет от около 0,1 мл до около 2,0 мл, в то время как количество вакцины, применяемой перорально, может иметь больший объем – от около 1 мл до около 10 мл. Подходящий объем также может варьироваться в зависимости от габаритов и возраста субъекта.

## 2. Применение

**[00105]** Состав можно использовать для лечения у субъектов инфекции, вызванной ВПГ-2. При употреблении в данном документе “лечение” обозначает клиническое вмешательство, которое может быть терапевтическим или профилактическим. При терапевтическом применении фармацевтические составы или медикаменты вводят субъекту, у которого подозревается наличие или имеется инфекция, вызванная ВПГ-2. Состав вводят в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать (индуцировать) иммунный ответ, который может устранить или по меньшей мере частично приостановить симптомы заболевания и его осложнения. При профилактическом применении фармацевтические составы или медикаменты вводят субъекту, восприимчивому к или находящемуся в зоне риска инфицирования ВПГ-2, в количестве, достаточном для того, чтобы индуцировать иммунный ответ, который будет подавлять инфекцию или снижать риск, или отсрочит начало заболевания, или ослабит одно или более проявлений

инфекции. Количество, достаточное для выполнения вышесказанного, определяют как терапевтически или фармацевтически эффективную дозу. Такое количество можно вводить в виде единичной дозы либо можно вводить согласно схеме лечения, в зависимости от того, что является более эффективным. Указанное количество может привести к излечению болезни, но, как правило, его вводят для того, чтобы облегчить симптомы заболевания, или для того, чтобы обеспечить профилактику развития болезни или нарушения.

**[00106]** Как при терапевтической, так и при профилактической схемах лечения вещества обычно вводят в количестве нескольких доз до достижения существенного иммунного ответа. Как правило, иммунный ответ отслеживают и повторяют дозирование, если иммунный ответ начинает снижаться. Лечение не должно полностью уничтожить болезнь, как и не должно полностью предотвратить возникновение у субъекта заболевания или нарушения. В некоторых вариантах реализации изобретения применяют только одно дозирование. Более часто применяют многоразовое дозирование. В общем случае первое дозирование называют “первичным” дозированием, а второе и последующие дозирования называют “вторичными” (“бустерными”) дозированиями. Многоразовое дозирование может состоять из двух введений, из трех введений, из четырех введений и, в некоторых случаях, из пяти или более введений. В идеальном варианте количество введений составляет одно или два. При применении множественных введений второе и последующие введения осуществляют в общем случае по меньшей мере через две недели после последнего введения, и могут осуществлять по меньшей мере через месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев или 1 год после последнего введения. В идеальном варианте иммунный ответ отслеживают для того, чтобы определить, будет ли множественное дозирование иметь преимущество. Множественные дозирования могут включать одинаковые количества иммуногенов и агониста или могут включать разные количества этих ингредиентов. Например, вторичное дозирование может включать более низкое количество иммуногенов. К тому же при разном дозировании могут варьироваться добавки.

**[00107]** В некоторых вариантах реализации изобретения первичный состав, который вводят субъекту, представляет собой живой ослабленный вирус ВПГ-2, а вторичный состав, который вводят субъекту, является любым заявленным или описанным в данном документе составом. В некоторых вариантах реализации изобретения первичный состав, который вводят субъекту, является любым заявленным или описанным в данном документе составом, а вторичный состав, который вводят субъекту, представляет собой живой ослабленный вирус ВПГ-2.

**[00108]** В независимости от того, является ли применения профилактическим или терапевтическим, введение предпочтительно повышает иммунный ответ на ВПГ-2. Иммунный ответ может быть гуморальным (антитело-опосредованным) или клеточным (обычно, но не исключительно, опосредованным Т-клетками) или и тем и другим. У иммунизированного субъекта также могут наблюдаться активированные моноциты, макрофаги, NK-клетки, дендритные клетки и другие типы клеток врожденной иммунной системы. Методы анализа иммунного ответа описаны в данном документе и хорошо известны специалисту в данной области техники.

**[00109]** Вакцину вводят в дозировке, достаточной для получения благоприятного терапевтического ответа (терапевтически эффективной дозировке), например, эффективного иммунного ответа для облегчения, ослабления, излечения или частичного облегчения симптомов заболевания или инфекции, или профилактического ответа, например, предотвращения инфекции или симптомов заболевания. Индикаторами благоприятного терапевтического ответа являются меньшее количество герпесных поражений при любом данном приступе заболевания, или меньшее количество поражений в среднем, или менее частые приступы. Другие индикаторы включают меньшее поражение, поражения, которые более быстро излечиваются, меньшую болезненность. Другими индикаторами являются выработка антител к компонентам вакцины против ВПГ-2, в частности, наличие антител к оболочечным гликопротеинам ВПГ-2, например, антител к gD2, и в особенности выработка нейтрализующих антител. Существует множество хорошо известных процедур для детекции и количественной оценки антител, включая методы анализа ELISA и подавления вирусной инфекции (нейтрализации). В одном варианте реализации изобретения анализ ELISA проводят путем покрытия лунок в мультилуночной планшете белком gD2, захвата gD2-специфического антитела из сыворотки на стенках планшетов, детекции gD2-специфического антитела при помощи меченого античеловеческого антитела с последующим считыванием метки. Метка может быть радиоактивной, но более часто она представляет собой фермент, такой как пероксидаза хрена, который преобразует субстрат на такой, который можно детектировать колориметрически. Один из примеров анализа нейтрализации ВПГ основан на анализе бляшкообразования, в котором нейтрализующее антитело детектируют по подавлению образования бляшек. Другие индикаторы включают повышенное количество или функционирование CD8 или CD4 Т-клеток в ответ на ВПГ-2, снижение вирусывыделения, снижение передачи вируса сексуальным партнерам и снижение размеров и частоты появления симптоматических поражений либо и то, и другое.

**[00110]** Методы анализа функционирования Т-клеток включают IFN- $\gamma$  ELISPOT и

ВОЦ (внутриклеточное окрашивание цитокинов). Анализ ELISPOT, позволяющий детектировать интерферон гамма, широко применяется для количественной оценки ответов CD4 или CD8 Т-клеток на кандидатные вакцины. Анализ ELISPOT основан на принципе ELISA, который позволяет детектировать индуцированную антигенами секрецию цитокинов, захваченных иммобилизованным антителом и визуализированных при помощи сопряженного с ферментом второго антитела. ВОЦ является общеприменимым методом для количественной оценки цитотоксичных Т-клеток, основанном на экспрессии цитокинов вследствие стимуляции агонистами, такими как антитела к поверхностным молекулам Т-клеток или пептиды, которые связывают молекулы класса ГКГ. Примеры процедур ВОЦ и ELISPOT описаны ниже.

**[00111]** Субъекты, которым нужно вводить вакцину, включают как тех, которые являются как серопозитивными к ВПГ-2, так и серонегативными к ВПГ-2. В случае серопозитивных особей вакцину применяют в терапевтических целях. В случае серонегативных особей вакцину применяют в защитных целях. В некоторых случаях субъекты являются серопозитивными к ВПГ-1, а в других случаях – серонегативными к ВПГ-1, вне зависимости от статуса в отношении ВПГ-2. Это означает, что субъекты включают тех, которые являются серопозитивными к ВПГ-1/серопозитивными к ВПГ-2, серонегативными к ВПГ-1/серопозитивными к ВПГ-2, серопозитивными к ВПГ-1/серонегативными к ВПГ-2, серонегативными к ВПГ-1/серонегативными к ВПГ-2. Кроме того, субъекты включают людей и других представителей млекопитающих, которые могут быть инфицированы ВПГ-2.

**[00112]** Вакцину можно вводить любым подходящим способом, например, внутрискожным, мукозальным (например, интраназальным, пероральным), внутримышечным, подкожным, подъязычным, ректальным или вагинальным. Другие способы введения хорошо известны в данной области техники.

**[00113]** Внутримышечный способ введения является одним из подходящих способов для указанного состава. Подходящие устройства для в/м введения включают иглу и шприц, безыгольное устройство для инъекций (например, Biojector, Bioject, Орегон, США) или шприц-ручку, так как они используются для самостоятельного проведения инъекций инсулина или адреналина на дому. Внутрискожный и подкожный способы введения являются другими подходящими способами. Подходящие устройства включают шприц и иглу, шприц с короткой иглой и устройства для впрыскивания.

**[00114]** Состав можно применять мукозальным способом, например, интраназально. В данной области техники хорошо известно и доступно большое количество устройств для интраназального введения. Устройства для впрыскивания являются одними из таких

устройств. Пероральное применение состоит просто в предоставлении раствора, который должен проглотить субъект.

**[00115]** Вакцину можно вводить в одно или несколько мест. Если вакцину вводят в несколько мест, способ применения может быть одинаковым для всех мест, например, это инъекция в разные мышцы, либо может отличаться, например, это внутримышечная инъекция и интраназальное впрыскивание. Кроме того, вакцину можно вводить однократно либо многократно в разное время. В общем случае при многократном введении время между дозированиями определяется так, чтобы улучшить иммунный ответ.

### **Рекомбинантные экспрессионные векторы, вирусные векторы и вирусоподобные частицы**

**[00116]** В одном варианте реализации изобретения предложены рекомбинантные экспрессионные векторы, которые содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один иммуноген ВПГ-2, который вызывает иммунный ответ на иммуноген и на соответствующий ему антиген. Для того чтобы получить эффективную транскрипцию и трансляцию иммуногена, кодирующие полинуклеотидные последовательности в каждом векторе содержат по меньшей мере одну регулируемую экспрессию последовательность (также называемую регуляторной последовательностью или элементом экспрессии) (например, промоторную, энхансерную, лидерную, которые более подробно описаны в данном документе), функционально связанную с кодирующей полинуклеотидной последовательностью(ями). Таким образом, указанные рекомбинантные экспрессионные векторы предназначены для управления экспрессией иммуногена или для управления коэкспрессией по меньшей мере двух иммуногенов в любой подходящей клетке-хозяине, которая была трансформирована, трансдуцирована или трансфицирована рекомбинантным экспрессионным вектором или векторной частицей, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор.

**[00117]** Описанные в данном документе рекомбинантные экспрессионные векторы могут кодировать один или более иммуногенов ВПГ-2 (т.е., по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три иммуногена и т.д.), при этом указанные иммуногены подробно описаны в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать по меньшей мере один, два или три или более иммуногенов из ВПГ-2. Примером может служить иммуноген, который может быть белком ВПГ-2, таким как UL19 (например, фрагментом верхнего домена UL19 или его иммуногенным фрагментом или вариантом), и/или gD (или

его иммуногенным фрагментом или вариантом), и/или UL47 (или его иммуногенным фрагментом или вариантом), или может быть другим иммуногенным фрагментом или участком белка ВПГ-2.

#### А. Рекомбинантное получение белка

**[00118]** Рекомбинантный экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген, можно использовать для получения иммуногена. Рекомбинантные экспрессионные векторы содержат по меньшей мере одну регулируемую экспрессию последовательность, такую как промотор или энхансер, которая функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим иммуноген. Каждый из экспрессионных векторов можно использоваться для того чтобы трансформировать, трансдуцировать или трансфицировать подходящую клетку-хозяина для рекомбинантного получения соответствующего иммуногена. Подходящие клетки-хозяева для получения иммуногена включают прокариотов, дрожжевые и высшие эукариотические клетки (например, CHO и COS). Каждый из иммуногенов может быть выделенным из соответствующей клетки-хозяина или культуры клеток-хозяев при помощи любого из множества способов выделения (например, фильтрация, диафильтрация, хроматография (включая аффинную хроматографию, жидкостную хроматографию высокого давления) и препаративный электрофорез), известных и широко применяемых в области белковой техники. В определенных вариантах реализации изобретения согласно приведенному в данном документе описанию выделенный иммуноген можно затем смешивать с фармацевтически подходящим вспомогательным веществом для получения иммуногенного состава.

**[00119]** Конкретные методы для получения полипептидов рекомбинантным способом в общем случае хорошо известны и широко применимы. Например, методы молекулярной биологии описаны Sambrook et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; смотрите также Sambrook et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)). Секвенирование ДНК можно проводить согласно описанию в Sanger et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463 (1977)) и Amersham International plc sequencing handbook, учитывая усовершенствование этих методов.

#### В. Рекомбинантные экспрессионные векторы для доставки белка субъектам

**[00120]** Рекомбинантные экспрессионные векторы можно использовать для экспрессии любого или любых описанных в данном документе иммуногенов. В

конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор доставляют в подходящую клетку (например, антиген-презентирующую клетку, т.е., клетку, которая на своей поверхности содержит комплекс пептид/ГКГ, например дендритную клетку) или ткань (например, лимфоидную ткань), которая индуцирует требуемый иммунный ответ (т.е., специфический гуморальный ответ (т.е., ответ В-клеток) и/или индукцию специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа, который может включать ответ иммуноген-специфических CD4 и/или CD8 Т-клеток, при этом ответ CD8 Т-клеток может включать ответ цитотоксических Т-клеток (CTL)). Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы могут также содержать, к примеру, специфические к лимфоидной ткани транскрипционные регуляторные элементы (ТРЭ), такие как ТРЭ, специфические к В-лимфоцитам, Т-лимфоцитам или дендритным клеткам. ТРЭ, специфические к лимфоидной ткани, известны в данной области техники (смотрите, например, Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12, 1043-53 (1992); Todd et al., J. Exp. Med. 177, 1663-74 (1993); Penix et al., J. Exp. Med. 178:1483-96 (1993)).

**[00121]** В конкретном варианте реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор является плазмидной ДНК или космидной ДНК. Плазмидную ДНК или космидную ДНК, содержащую один или более полинуклеотидов, кодирующих иммуноген, как описано в данном документе, легко сконструировать при помощи стандартных методик, хорошо известных в данной области техники. Векторный геном, как правило, можно сконструировать в форме плазмиды, которой затем можно трансфицировать пакующую или продуцирующую клеточную линию. Плазида обычно содержит последовательности, необходимые для репликации плазмиды в бактерии. Такие плазмиды хорошо известны в данной области техники. Вдобавок, вектор, который содержит точку начала репликации прокариотического происхождения, также может содержать ген, экспрессия которого приводит к появлению детектируемого или селектируемого маркера, такого как устойчивость к лекарственным препаратам. Типичными бактериальными продуктами устойчивости к лекарственным препаратам являются те, которые вызывают устойчивость к ампициллину или тетрациклину. Чтобы получить подтверждение того, что в плазмиды были внесены правильные нуклеотидные последовательности, плазмиду можно реплицировать в *E. coli*, очистить и проанализировать при помощи расщепления рестрикционными эндонуклеазами и/или по ее нуклеотидной последовательности при помощи стандартных методов.

### С. Вирусные векторы

**[00122]** В других конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный

экспрессионный вектор является вирусным вектором. Примеры рекомбинантных экспрессионных вирусных векторов включают геном лентивирусного вектора, геном поксвирусного вектора, геном вектора вируса осповакцины, геном аденовирусного вектора, геном аденовирус-ассоциированного вирусного вектора, геном вектора вируса герпеса и геном вектора альфа-вируса. Вирусные векторы могут быть живыми, ослабленными, зависимыми от условий репликации или дефективными по репликации и, как правило, являются непатогенными (дефективными) компетентными по репликации вирусными векторами.

**[00123]** В качестве примера в отдельном варианте реализации изобретения, в котором вирусный вектор представляет собой геном вектора вируса осповакцины, полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес иммуноген, можно вставить в один из неосновных участков вектора вируса осповакцины. Такие неосновные участки описаны, например, в Perkus et al., *Virology* 152:285 (1986); Hruby et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3411 (1983); Weir et al., *J. Virol.* 46:530 (1983). Подходящие промоторы для применения с вирусами осповакцины включают, но не ограничиваются этим, P7,5 (смотрите, например, Cochran et al., *J. Virol.* 54:30 (1985); P11 (смотрите, например, Bertholet, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2096 (1985)); и CAE-1 (смотрите, например, Patel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9431 (1988)). Сильно ослабленные штаммы осповакцины являются более приемлемыми для применения на людях и включают Lister, NYVAC, который содержит определенные геномные делеции (смотрите, например, Guerra et al., *J. Virol.* 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., *AIDS Research and Human Retroviruses* 8: 1445-47 (1992)), или MVA (смотрите, например, Gheradi et al., *J. Gen. Virol.* 86:2925-36 (2005); Mayr et al., *Infection* 3:6-14 (1975)). Также смотрите Hu et al. (*J. Virol.* 75:10300-308 (2001), где описывается применение вируса заболевания, подобного болезни Ябы, в качестве вектора для терапии рака); патенты США № 5,698,530 и 6,998,252. Смотрите также, например, патент США № 5,443,964. Смотрите также патенты США № 7,247,615 и 7,368,116.

**[00124]** В определенных вариантах реализации изобретения для экспрессии представляющего интерес иммуногена можно использовать аденовирусный вектор или аденовирус-ассоциированный вирусный вектор. Были описаны некоторые аденовирусные векторные системы и способы применения векторов (смотрите, например, Molin et al., *J. Virol.* 72:8358-61 (1998); Narumi et al., *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:936-41 (1998); Mercier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6188-93 (2004); патенты США № 6,143,290; 6,596,535; 6,855,317; 6,936,257; 7,125,717; 7,378,087; 7,550,296).

**[00125]** Геномы ретровирусных векторов могут включать геномы на основе вируса

лейкемии мышей (ВЛМ), вируса лейкоза гиббонов (ВЛГ), экотропных ретровирусов, вируса иммунодефицита обезьян (ВИО), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и их комбинации (смотрите, например, Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-39 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66:1635-40 (1992); Sommerfelt et al., *Virology* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-78 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-24 (1991); Miller et al., *Mol. Cell Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg, *NIH Res.* 4:43 1992; Cometta et al., *Hum. Gene Ther.* 2:215 (1991)).

#### D. Lentivirальные векторы

**[00126]** В более определенных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вирусный вектор представляет собой геном лентивирусного вектора. Указанный геном можно получить из любого из большого количества подходящих, доступных векторов на основе лентивирусного генома, включая те, которые применяются в генной терапии человека (смотрите, например, Pfeifer et al., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 177-211 (2001)). Подходящие лентивирусные векторные геномы включают геномы на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вируса иммунодефицита кошек (ВИК), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) и вируса меди-висна. Необходимой характеристикой лентивируса является возможность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, хотя нет необходимости в том, чтобы клетки-мишени были делящимися клетками, или в том, чтобы стимулировать клетки к делению. В общем случае геномные и оболочечные гликопротеины основаны на разных вирусах, так, что результирующая вирусная частица является псевдотипированной. Желательно, чтобы были включены элементы безопасности векторного генома. Элементы безопасности включают самоинактивирующиеся ДКП и неинтегрирующийся геном. Примером может служить вектор, содержащий сигнал упаковки ( $\psi$ ), Rev-чувствительный элемент (RRE), донор сплайсинга, акцептор сплайсинга, центральный полипуриновый тракт (сРРТ) и элемент WPRE. В определенных приведенных в качестве примеров вариантах реализации изобретения геном вирусного вектора содержит последовательности из лентивирусного генома, такого как геном ВИЧ-1 или геном ВИО. Конструкция вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3' ДКП лентивируса и, в частности, может содержать последовательности R и U5 из 5' ДКП лентивируса и инактивированный или самоинактивирующийся 3' ДКП из лентивируса. Последовательности ДКП могут представлять собой последовательности ДКП, полученные из любого лентивируса любого вида. Например, это могут быть последовательности ДКП из ВИЧ, ВИО, ВИК или БВИ. Обычно последовательности ДКП являются последовательностями ДКП ВИЧ.

**[00127]** Векторный геном может содержать инактивированный или самоинактивирующийся 3' ДКП (смотрите, например, Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150, 1998; которые обе включены в полном объеме). Самоинактивирующийся вектор, как правило, содержит делецию энхансерной и промоторной последовательностей на участке 3' длинного концевого повтора (ДКП), которая копируется в 5' ДКП при интеграции вектора. В одном случае элемент U3 3' ДКП содержит делецию энхансерной последовательности, ТАТА-бокса, участков Sp1 и NF-каппа В. В результате самоинактивации 3' ДКП провирус, который генерируется после внедрения и обратной транскрипции, будет содержать инактивированный 5' ДКП. Рационально повысить безопасность путем снижения риска мобилизации векторного генома и влияния ДКП на близлежащие клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3' ДКП можно сконструировать при помощи любого известного в данной области техники способа.

**[00128]** В некоторых случаях последовательность U3 из лентивирусного 5' ДКП можно заменить в вирусной конструкции промоторной последовательностью, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, восстановленного из пакующей клеточной линии. Также можно включить энхансерную последовательность. Можно применять любую комбинацию энхансер/промотор, которая повышает экспрессию вирусного РНК-генома в пакующей клеточной линии. В одном примере используют последовательность энхансер/промотор ЦМВ (смотрите, например, патенты США № 5,385,839 и 5,168,062).

**[00129]** В определенных вариантах реализации изобретения риск инсерционного мутагенеза минимизируют путем конструирования дефективного по интеграции лентивирусного векторного генома. Для получения неинтегрирующегося векторного генома можно применять различные подходы. Эти подходы включают введение мутации(й) в компонент фермента интегразы гена *pol* таким образом, что он кодирует белок с неактивной интегразой. Сам по себе векторный геном можно модифицировать, чтобы предотвратить интеграцию при помощи, к примеру, мутации или удаления одного или обоих участков присоединения, или сделав 3' ДКП-проксимальный полипуриновый тракт (РРТ) нефункциональным путем проведения делеции или модификации. Вдобавок, доступны также негенетические подходы; они включают фармакологические вещества, которые подавляют одну или более функций интегразы. Подходы не являются взаимоисключающими, что означает, что в одно и то же время можно применять более одного подхода. Например, участки как интегразы, так и присоединения могут быть нефункциональными, или участок интегразы или РРТ может быть нефункциональным,

или участки присоединения и участок РРТ могут быть нефункциональными, или все они могут быть нефункциональными.

**[00130]** Интеграза принимает участие в расщеплении вирусной двухцепочечной ДНК с тупыми концами и присоединении концов к 5'-фосфатам двух цепей хромосомного участка-мишени. Интеграза содержит три функциональных домена: N-концевой домен, который содержит цинк-связывающий мотив (ННСС); ядро центрального домена, которое содержит каталитическое ядро и консервативный мотив DD35E (D64, D116, E152 в ВИЧ-1); и С-концевой домен, который обладает ДНК-связывающими свойствами. Точечных мутаций, которые вводят в интегразу, достаточно, чтобы нарушить нормальное функционирование. Было осуществлено и охарактеризовано большое количество мутаций интегразы (смотрите, например, Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Apolonia, Thesis submitted to University College London, April 2009, pp, 82-97; Engelman et al., *J. Virol.* 69: 2729, 1995; Nightingale et al., *Mol. Therapy*, 13: 1121, 2006). Последовательность, кодирующую белок интегразы, можно удалить или ввести в нее мутацию для того, чтобы сделать белок неактивным, предпочтительно, без существенного влияния на активность обратной транскриптазы или ядерное нацеливание, тем самым предотвращая только интеграцию провируса в геном клетки-мишени. Допустимые мутации могут снизить катализ интегразы, перенос цепи, связывание с att-участками, связывание с хромосомной ДНК хозяина и другие функции. Например, замена одной аспарагиновой кислоты на аспарагин в остатке 35 ВИЧ или ВЮ интегразы полностью прекращает интеграцию вирусной ДНК. Делеции интегразы в общем случае ограничиваются С-концевым доменом. Делеции кодирующей последовательности для остатков 235-288 приводят к получению применимой нефункциональной интегразы (смотрите, например, Engelman et al., *J. Virol.* 69:2729, 1995). В качестве дополнительных примеров можно привести введение мутации, например, Asp64 (номера остатков приведены для ВИЧ-1, а специалист в данной области техники может легко определить соответствующие номера остатков для интегразы из других лентивирусов или ретровирусов) (например, D64E, D64V), Asp116 (например, D116N), Asn120 (например, N120K), Glu152, Gln148 (например, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (например, W235E), Lys264 (например, K264R), Lys266 (например, K266R), Lys273 (например, K273R). Можно осуществить другие мутации и исследовать их на предмет интеграции, трансгенной экспрессии и любых других необходимых параметров. Методы анализа этих функций хорошо известны. Мутации можно осуществлять при помощи любых методов, включая сайт-направленный мутагенез и химический синтез нуклеотидной последовательности. В интегразу можно вводить одну мутацию либо может иметь место большее количество

мутаций. Например, интегразы может содержать мутации в двух аминокислотах, трех аминокислотах, четырех аминокислотах и т.д.

**[00131]** В альтернативном варианте или в комбинации с использованием мутантной интегразы также можно проводить мутацию участков присоединения (att) в U3 и U5. Интегразы связывается с этими участками и отщепляет 3'-концевой динуклеотид с обоих концов векторного генома. Динуклеотид CA расположен в углубленной части 3' конца; CA нужен для процессинга, а мутация нуклеотидов блокирует интеграцию в хромосому организма-хозяина. В динуклеотиде CA наиболее важным для интеграции нуклеотидом является А, а мутации, введенные в оба конца генома, приведут к наилучшему результату (смотрите, например, Brown et al., *J. Virol.* 73:9011 (1999)). В одном примере в каждом конце проводят замену CA на TG. В других примерах в одном конце проводят замену CA на TG, а в другом конце – на GT. В других примерах проводят удаление CA в каждом конце; в других примерах проводят удаление А из CA в каждом конце.

**[00132]** Интеграцию также можно подавлять путем проведения мутации или делеции полипуринового тракта (PPT) (смотрите, например, WO 2009/076524), расположенного проксимально к 3' ДКП. PPT представляет собой полипуриновую последовательность длиной около 15 нуклеотидов, которая служит первичным связывающим сайтом для “плюс-цепь” ДНК синтеза. В этом случае мутации или делеции PPT нацелены на процесс обратной транскрипции. Не привязываясь к конкретному механизму, можно сказать, что при проведении мутации или делеции PPT резко снижается выработка линейной ДНК и вырабатываются, главным образом, кольца ДНК с 1 ДКП. Для интеграции нужен векторный геном, содержащий линейную двухцепочечную ДНК, а без него интеграция практически прекращается. Как утверждается в данном документе, PPT можно сделать нефункциональным путем проведения мутации или делеции. Как правило, проводится удаление всех 15 нуклеотидов PPT, хотя в некоторых вариантах реализации изобретения можно проводить более короткие делеции, составляющие 14 нуклеотидов, 13, нуклеотидов, 12 нуклеотидов, 11 нуклеотидов, 10 нуклеотидов, 9 нуклеотидов, 8 нуклеотидов, 7 нуклеотидов, 6 нуклеотидов, 5 нуклеотидов, 4 нуклеотида, 3 нуклеотида и 2 нуклеотида. При проведении мутаций, как правило, проводят множественные мутации, в особенности в 5' половине PPT (смотрите, например, McWilliams et al., *J. Virol.* 77:11150, 2003), хотя одиночные и двойные мутации в первых четырех основаниях также снижают транскрипцию. Мутации, введенные в 3' конец PPT, обычно имеют более сильный эффект (смотрите, например, Powell et al., *J. Virol.* 70:5288, 1996).

**[00133]** Участок U3 содержит последовательность PPT (полипуринового тракта),

расположенную непосредственно выше. В определенных вариантах реализации изобретения в лентивирусный вектор можно включать любой из по меньшей мере трех различных участков U3 (в 3' конце) (смотрите SEQ ID NOS: 13-15). Данные конструкции содержат делеции в участках U3. Конструкция SIN содержит делецию длиной около 130 нуклеотидов в U3 (смотрите, например, Miyoshi, et al. J. Virol. 72: 8150, 1998; Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3194, 1986), которая приводит к удалению ТАТА-бокса, тем самым прекращая активность промотора ДКП. Делеции в конструкциях 703 и 704 повышают экспрессию из лентивирусных векторов (смотрите, например, Bayer et al., Mol. Therapy 16: 1968, 2008). Вдобавок, конструкция 704 содержит делецию 3' PPT, которая снижает интеграцию вектора (смотрите, например, WO 2009/076524). Также смотрите патентную заявку США № 12/842,609 и международную заявку на патентную публикацию № WO 2011/011584 (международную патентную заявку № PCT/US10/042870), каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

**[00134]** Указанные различные подходы, направленные на то, чтобы сделать векторный геном неинтегрирующимся, можно применять отдельно или в комбинации. Использование более одного подхода можно применять для создания безопасного вектора при помощи дублирующего механизма. Например, мутации или делеции PPT можно комбинировать с мутациями или делециями участка att или с мутациями интегразы, либо мутации или делеции PPT можно комбинировать как с мутациями или делециями участка att, так и с мутациями интегразы. Аналогично, мутации или делеции участка att и мутации интегразы можно комбинировать друг с другом или с мутациями или делециями PPT.

**[00135]** Согласно данному документу лентивирусные векторные конструкции также могут содержать промотор для экспрессии в клетках млекопитающих. Промоторы, которые подробно обсуждаются в данном документе, включают, например, промотор человеческого убиквитина С (UbiC), предранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ) и промотор вирус саркомы Рауса (VSP).

#### Е. Вирусоподобные частицы

**[00136]** В различных вариантах реализации изобретения предложены вирусоподобные частицы (ВПЧ), которые содержат по меньшей мере один иммуноген ВПГ-2, который вызывает иммунный ответ на иммуноген и соответствующий ему определенный антиген.

**[00137]** Вирусоподобные частицы ВПГ-1 или ВПГ-2 можно получить, путем *in vitro* самосборки VP5, VP19, VP23, VP22a и протеазы созревания (продукта гена UL26). Смотрите, например, Newcomb et al., J. Virol, Sept. 1994, 6059-6063.; Newcomb et al., J.

Mol. Biol., 263; 432-446 (1996); Thomsen et al., J Viral, April 1994, 2442-2457; все из которых включены в полном объеме посредством ссылки. Описанные в данном документе вирусоподобные частицы могут содержать один или более иммуногенов ВПГ-2 (т.е., по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три и т.д.), которые подробно описаны в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере один, два, или три, или более иммуногенов, полученных из ВПГ-2, могут быть включены или ассоциированы с вирусоподобной частицей. В качестве примера можно привести иммуноген, который может быть белком ВПГ-2, таким как UL19 (например, фрагментом верхнего домена UL19 или его иммуногенным фрагментом или вариантом), и/или gD, (или его иммуногенным фрагментом или вариантом), и/или UL47 (или его иммуногенным фрагментом или вариантом), либо может являться другим иммуногенным фрагментом или участком белка ВПГ-2.

#### *Последовательности регуляции экспрессии*

**[00138]** Согласно данному документу рекомбинантный экспрессионный вектор содержит по меньшей мере одну последовательность регуляции экспрессии. В определенных вариантах реализации изобретения в случае, если рекомбинантный экспрессионный вектор содержит геном вирусного вектора, желательной является экспрессия по меньшей мере одного иммуногена в конкретных клетках-мишенях. Как правило, например, в лентивирусном векторе, полинуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген, расположена между последовательностями 5' ДКП и 3' ДКП. Кроме того, кодирующая нуклеотидная последовательность(и) предпочтительно функционально связана с другими генетическими или регуляторными последовательностями или элементами, например, последовательностями регуляции транскрипции, включая промоторы и энхансеры, которые определенным способом регулируют экспрессию иммуногена. В некоторых случаях полезными последовательностями регуляции транскрипции являются те, которые являются высокорегулируемыми в отношении активности, как временно, так и пространственно. Элементы, управляющие экспрессией, которые можно использовать для регуляции экспрессии кодируемых полипептидов, известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, индуцибельные промоторы, конститутивные промоторы, секреторные сигналы, энхансеры и другие регуляторные последовательности.

**[00139]** Полинуклеотид, кодирующий иммуноген, и любая другая экспрессируемая последовательность, обычно находятся в функциональной связи с внутренними промоторными/энхансерными регуляторными последовательностями. В отношении лентивирусных векторных конструкций “внутренним” промотором/энхансером является

такой, который расположен между последовательностями 5' ДКП и 3' ДКП в вирусном векторе и функционально связан с представляющей интерес кодирующей полинуклеотидной последовательностью. Внутренним промотором/энхансером может быть любой промотор, энхансер или комбинация промотор/энхансер, для которого известно, что он повышает экспрессию гена, с которым находится в функциональной связи. “Функциональная связь” и “функционально связанный” означает, без ограничений, что последовательность имеет правильное расположение и ориентацию по отношению к промотору и/или энхансеру так, что представляющая интерес последовательность экспрессируется, когда промотор и/или энхансер контактирует с соответствующими молекулами.

**[00140]** Выбор внутреннего промотора/энхансера основан на необходимом профиле экспрессии иммуногена и специфических свойствах известных промоторов/энхансеров. Таким образом, внутренний промотор может быть конститутивно активным. Неограничивающие примеры конститутивных промоторов, которые можно использовать, включают промотор убиквитина (смотрите, например, патент США № 5510474; WO 98/32869); ЦМВ (смотрите, например, Thomsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:659, 1984; патент США № 5168062); бета-актин (Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835); и ФГК (смотрите, например, Adra et al. 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417; и Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637).

**[00141]** В другом варианте промотор может являться тканеспецифическим промотором. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор является промотором, специфическим к клетке-мишени. Нацеливание на дендритные клетки может усилить иммунный ответ, в частности, клеточный цитотоксический ответ, который необходим для иммунитета против ВПГ-2. Например, промотор может быть получен из любого продукта, экспрессируемого дендритными клетками, включая CD11c, CD103, TLR, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, рецептор маннозы, Dectin-1, Clec9A, ГКГ класса II. Вдобавок, промоторы могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить индуцибельную экспрессию иммуногена. В данной области техники известно большое количество систем для индуцибельной экспрессии, включая тетрациклин-зависимую систему, систему lac-оператор-репрессор, а также промоторы, зависимые от различных внешних или физиологических изменений, включая тепловой шок, ионы металлов, например, промотор металлотионеина, интерфероны, гипоксию, стероиды, например, промоторы рецепторов прогестерона и глюкокортикоидов, излучение, например, промотор ФРЭС. Также можно использовать комбинацию из промоторов, чтобы получить необходимый уровень экспрессии каждой из кодирующих иммуногены

полинуклеотидных последовательностей. Специалиста в данной области техники не затруднит выбор промотора на основании необходимого профиля экспрессии полинуклеотидной последовательности в представляющем интерес организме или клетке-мишени.

**[00142]** Рекомбинантный экспрессионный вектор, включая геном вирусного вектора, может содержать по меньшей мере один промотор, зависимый от РНК полимеразы II или III. Этот промотор может быть функционально связан с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью и также может быть связан с последовательностью терминации. Вдобавок, можно включать более одного промотора РНК полимеразы II или III. Промоторы РНК полимеразы II или III хорошо известны специалистам в данной области техники. Подходящий выбор промоторов РНК полимеразы III можно найти, например в Paule and White, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 28, pp 1283-1298 (2000). Промоторы РНК полимеразы II или III также включают синтетические или сконструированные фрагменты ДНК, которые могут направлять РНК полимеразу II или III для транскрибирования нижележащих кодирующих последовательностей РНК. Кроме того, промотор или промоторы РНК полимеразы II или III (Pol II или III), применяемые в качестве части генома вирусного вектора, могут быть индуцибельными. Любой подходящий индуцибельный промотор Pol II или III можно применять в описанных в данном документе методах. Наиболее подходящие промоторы Pol II или III включают тетрациклин-зависимые промоторы, описанные в Ohkawa and Taira, *Human Gene Therapy*, 11:577-585 (2000) и в Meissner et al., *Nucleic Acids Res.*, 29: 1672-1682 (2001).

**[00143]** В рекомбинантном экспрессионном векторе, включая геном вирусного вектора, также может присутствовать внутренний энхансер для того, чтобы повысить экспрессию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Например, можно использовать ЦМВ-энхансер (смотрите, например, Boshart et al., *Cell* 41:521, 1985). Многие энхансеры из вирусных геномов, таких как ВИЧ, ЦМВ, и геномов млекопитающих были определены и охарактеризованы (смотрите, например, общедоступные базы данных, такие как GenBank). Энхансер можно использовать в комбинации с гетерологичным промотором. Специалиста в данной области техники не затруднит выбор подходящего энхансера на основании необходимого профиля экспрессии.

**[00144]** При нацеливании рекомбинантного экспрессионного вектора, включая геном вирусного вектора, на конкретную клетку-мишень векторный геном обычно содержит промотор, который распознается клеткой-мишенью и который функционально

связан с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью, вирусными компонентами (в случае, если вектор является вирусным вектором) и другими последовательностями, которые обсуждаются в данном документе. Промотор представляет собой элемент, управляющий экспрессией, образованный нуклеотидной последовательностью, которая делает возможным связывание РНК полимеразы и транскрипцию. Промоторы могут быть индуцибельными, конститутивными, временно-активными или тканеспецифическими. Активность индуцибельных промоторов вызывает присутствие или отсутствие биотических или абиотических факторов. Индуцибельные промоторы могут быть полезным инструментом генной инженерии, так как экспрессию генов, с которыми они функционально связаны, можно включать или выключать на определенных стадиях развития организма, его производства, или в конкретной ткани. Индуцибельные промоторы можно разделить на химически-регулируемые промоторы и физически-регулируемые промоторы. Типичные химически-регулируемые промоторы включают, но не ограничиваются этим, алкоголь-регулируемые промоторы (например, ген алкогольдегидрогеназы I (alcA)), тетрациклин-регулируемые промоторы (например, тетрациклин-зависимый промотор), стероид-регулируемые промоторы (например, промотор на основе глюкокортикоидного рецептора (ГР) крысы, промотор на основе эстрогенового рецептора (ЭР) человека, промотор на основе экдизонового рецептора моли и промоторы на основе суперсемейства стероидных/ретиноидных/тироидных рецепторов), металл-регулируемые промоторы (например, промоторы на основе гена металлотioneина) и патогенез-зависимые промоторы (например, патоген-зависимые (ПЗ) белковые промоторы арабидопсиса и кукурузы). Типичные физически-регулируемые промоторы включают, но не ограничиваются этим, терморегулируемые промоторы (например, промоторы теплового шока) и светорегулируемые промоторы (например, SSU-промотор соевых бобов). Примеры других промоторов описаны, например, в патентах и опубликованных патентных заявках, которые можно найти, проведя поиск по базам данных Ведомства США по патентам и торговым знакам.

**[00145]** Специалиста в данной области техники не затруднит выбор подходящего промотора на основании определенных условий. Существует много разных промоторов, хорошо известных в данной области техники, а также способов функционального связывания промотора и полинуклеотидной последовательности, предназначенной для экспрессии. Как нативные промоторные последовательности, так и многие гетерологичные промоторы можно использовать для управления экспрессией в пакующей клетке и клетке-мишени. Обычно используют гетерологичные промоторы, так как они, как правило, обеспечивают лучшую транскрипцию и более высокий выход необходимого

белка по сравнению с нативным промотором.

**[00146]** Промотор можно получить, к примеру, из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Промотор может также являться, к примеру, гетерологичным промотором млекопитающих, например, актиновым промотором или иммуноглобулиновым промотором, промотором теплового шока или промотором, обычно ассоциированным с нативной последовательностью, при условии, что такие промоторы являются совместимыми с клеткой-мишенью. В одном варианте реализации изобретения промотор является вирусным промотором природного происхождения из вирусной экспрессионной системы. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор является специфическим к дендритным клеткам промотором. Специфический к дендритным клеткам промотор может быть, например, промотором CD11c.

**[00147]** Транскрипцию можно повысить путем вставки энхансерной последовательности в вектор(ы). Энхансеры, как правило, представляют собой cis-действующие элементы ДНК с длиной от около 10 до 300 пар оснований, которые воздействуют на промотор таким образом, чтобы повысить его транскрипцию. Известно много энхансерных последовательностей, полученных из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина) и из эукариотических клеточных вирусов. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (пары оснований 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне точки начала репликации и энхансеры аденовирусов. Энхансер можно внести в вектор в позиции 5' или 3' к антиген-специфической полинуклеотидной последовательности, но предпочтительно, чтобы он располагался на участке 5' от промотора.

**[00148]** Экспрессионные векторы могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Эти последовательности часто обнаруживаются в 5' и, необязательно, 3' нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК и хорошо известны в данной области техники.

**[00149]** Рекомбинантная экспрессионная конструкция, включая геном вирусного вектора, также может содержать дополнительные генетические элементы. Типы элементов, которые могут быть включены в конструкцию, ничем не ограничены и могут быть выбраны для достижения конкретного результата. Например, можно включить сигнал, который способствует ядерному внедрению рекомбинантного экспрессионного

вектора или вирусного генома в клетку-мишень. Примером такого сигнала является флэп-сигнал ВИЧ-1. Можно включить дополнительные регуляторные последовательности, которые облегчают определение участка интеграции провируса в клетке-мишени. Например, в конструкцию можно включить последовательность амбер-супрессорной тРНК. Также в конструкцию вирусного генома можно включить изолирующую последовательность, например, полученную из цыплячьего  $\beta$ -глобина. Этот элемент снижает шанс того, что интегрированный провирус окажется “молчащим” в клетке-мишени вследствие эффектов метилирования и гетерохроматинизации. Вдобавок, изолятор может экранировать внутренний энхансер, промотор и экзогенные полинуклеотидные последовательности от положительного или отрицательного позиционного влияния окружающей ДНК на участке интеграции на хромосоме. Вдобавок, рекомбинантная конструкция, включая векторный геном, может содержать один или более генетических элементов, предназначенных для повышения экспрессии представляющего интерес гена. Например, в конструкцию можно внести элементы, демонстрирующие ответ на вирус гепатита сурков (WRE) (смотрите, например, Zufferey et al. 1999. *J. Virol.* 74:3668-81; Deglon et al., 2000. *Hum. Gene Ther.* 11:179-90).

**[00150]** В случае если рекомбинантный экспрессионный вектор является геномом вирусного вектора, геном вирусного вектора обычно сконструирован в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в пакующую или продуцирующую клеточную линию для выработки конструкции генома вирусного вектора. Плазида в общем случае содержит последовательности, необходимые для репликации плазмиды в бактерии. Такие плазмиды хорошо известны в данной области техники. Вдобавок, векторы, которые содержат прокариотическую точку начала репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого приводит к появлению детектируемого или селективируемого маркера, такого как устойчивость к лекарственным препаратам. Типичными бактериальными продуктами устойчивости к лекарственным препаратам являются те, которые вызывают устойчивость к ампициллину или тетрациклину.

**[00151]** В определенных конфигурациях рекомбинантные экспрессионные векторы содержат полинуклеотидные последовательности, которые кодируют факторы созревания/стимуляции дендритных клеток (ДК). Примеры стимулирующих молекул включают GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$ , B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганд CD40 (CD40L), индуцируемый лекарственным препаратом CD40 (iCD40), и т.д. Эти полинуклеотиды обычно управляются одним или несколькими регуляторными элементами, которые управляют экспрессией кодирующей последовательности в дендритных клетках. В других конкретных вариантах реализации изобретения в

рекомбинантном экспрессионном векторе исключена последовательность, которая управляет экспрессией, и включена нуклеотидная последовательность, которая кодирует иммуноген и GM-CSF. Созревание дендритных клеток играет роль в успешной вакцинации (смотрите, например, Banchereau et al., *Nat. Rev. Immunol.* 5:296-306 (2005); Schuler et al., *Curr. Opin. Immunol.* 15:138-147 (2003); Figdor et al., *Nat. Med.* 10:475-480 (2004)). Созревание может трансформировать ДК из клеток, активно участвующих в захвате антигена, в клетки, специализированные для примирования Т-клеток. Например, привлечение CD40, осуществляемое CD40L на CD4-хелперных Т-клетках, является важным сигналом для созревания ДК, что приводит к потенциальной активации CD8+ Т-клеток. Такие стимулирующие молекулы также называют факторами созревания или стимулирующими факторами созревания. Имунные контрольные точки представляют собой значительные барьеры для активации функционального клеточного иммунитета при раке, а антагонистические антитела, специфические к ингибиторным лигандам на Т-клетках, включая CTLA4 и лиганд запрограммированной смерти-1 (PD-1), являются примерами нацеленных веществ, исследованных в клиниках. Значительный механизм толерантности при хронических инфекциях и раке приводит к функциональному истощению антиген-специфических Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни PD-1. Так как было показано, что эффект от терапевтической иммунизации существенно усиливается при комбинировании с управлением имунными контрольными точками, в качестве неограничивающего примера специалистам в данной области техники понятно, что альтернативным подходом к подавлению имунных контрольных точек является подавление экспрессии лигандов запрограммированной смерти (PD) номер один и два (PD-L1/L2). Одним из способов осуществления подавления является экспрессия молекул РНК, таких как те, что описаны в данном документе, которые подавляют экспрессию PD-L1/L2 в ДК, трансдуцированных вирусным векторным геномом, таким как лентивирусный векторный геном, кодирующим одну или более релевантных молекул. Созревание ДК или экспрессию конкретных элементов, таких как имунные контрольные точки, например, лигандов PD-1, можно оценить при помощи проточной цитометрии, анализируя повышающую регуляцию поверхностного маркера, такого как ГКГ Ц, и при помощи анализа профиля экспрессируемых хемокинов и цитокинов, например, применяя описанные в данном документе способы и методы.

**[00152]** Последовательность, кодирующая детектируемый продукт, обычно белок, может быть включена для возможности определения клеток, экспрессирующих необходимый иммуноген. Например, флуоресцентный маркерный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), включен в рекомбинантную экспрессионную

конструкцию вместе с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью (т.е., кодирующей по меньшей мере один иммуноген). В других случаях белок может детектироваться антителом либо белок может являться ферментом, который воздействует на субстрат так, чтобы получить выход детектируемого продукта, либо может являться белковым продуктом, который делает возможной селекцию трансфицированной или трансдуцированной клетки-мишени, например, вызывает устойчивость к лекарственным препаратам, такую как устойчивость к гигромицину. Типичные селекционные гены кодируют белки, которые вызывают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, подходящим для применения в эукариотических клетках, например, неомицину, метотрексату, бластицидину, известных среди прочих в данной области техники, или сопутствуют ауксотрофному дефициту, или обеспечивают важные питательные вещества, содержащиеся в среде. Селектируемый маркер может в некоторых случаях присутствовать на отдельной плазмиде и вноситься путем котрансфекции.

**[00153]** В отношении описанных в данном документе векторных частиц можно использовать одну или более мультицистронных экспрессионных единиц, которые содержат две или более полинуклеотидные последовательности, кодирующие иммуноген, и последовательность, кодирующую оболочечную молекулу, как описано в документе, или один или более факторов созревания ДК, необходимых для выработки требуемой векторной частицы в пакующих клетках. Применение мультицистронных векторов снижает общее количество необходимых молекул нуклеиновой кислоты и, таким образом, можно избежать возможных трудностей, связанных с координацией экспрессии из множественных векторных геномов. В мультицистронном векторе разные экспрессируемые элементы функционально связаны с одним или более промоторами (и, при необходимости, с другими элементами управления экспрессией). В некоторых конфигурациях мультицистронный вектор содержит последовательность, кодирующую по меньшей мере один представляющий интерес иммуноген (т.е., один или больше), последовательность, кодирующую репортерный продукт, и последовательность, кодирующую один или более компонентов векторной частицы. В определенных вариантах реализации изобретения, в которых рекомбинантная конструкция содержит полинуклеотид, который кодирует иммуноген, указанная конструкция в некоторых случаях кодирует фактор созревания ДК. В других вариантах реализации изобретения мультицистронный вектор содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют каждый из иммуногенов, фактор созревания ДК и, необязательно, вирусные компоненты, если экспрессионный вектор является вирусным экспрессионным вектором. В других вариантах реализации изобретения мультицистронные векторы управляют

экспрессией и кодируют по меньшей мере два или более иммуногенов.

**[00154]** Каждый экспрессируемый компонент в мультицистронном экспрессионном векторе может быть отделен, например, элементом участка внутренней посадки рибосомы (IRES) или вирусным 2A элементом, чтобы создать возможность отдельной экспрессии разных белков из одного промотора. Элементы IRES и 2A элементы известны в данной области техники (смотрите, например, патент США № 4,937,190; de Felipe et al. 2004. *Traffic* 5: 616-626). В одном варианте реализации изобретения для того, чтобы разделить генетические элементы в мультицистронном векторе, используются олигонуклеотиды, такие как последовательности сайта расщепления фурином (RAKR) (смотрите, например, Fang et al. 2005 *Nat. Biotech.* 23: 584-590), связанные с 2A-подобными последовательностями, полученными из вируса ящура (FMDV); вируса ринита лошадей А (ERAV); и вируса *thosa asigna* (TaV) (смотрите, например, Szymczak et al. 2004 *Nat. Biotechnol.* 22: 589-594). Эффективность конкретного мультицистронного вектора легко можно исследовать, определяя экспрессию из каждого из генов при помощи стандартных протоколов.

**[00155]** В определенном примере геном вирусного вектора содержит: промоторную/энхансерную последовательность цитомегаловируса (ЦМВ); последовательности R и U5 из 5' ДКП ВИЧ; паковую последовательность ( $\psi$ ); флэп-сигнал ВИЧ-1; внутренний энхансер; внутренний промотор; представляющий интерес ген; элемент, демонстрирующий ответ на вирус гепатита сурков; последовательность амбер-супрессорной тРНК; элемент U3, содержащий делецию энхансерной последовательности; изолятор цыплячьего  $\beta$ -глобина; и последовательности R и U5 из 3' ДКП ВИЧ. В некоторых примерах векторный геном содержит интактный лентивирусный 5' ДКП и самоинактивирующийся 3' ДКП (смотрите, например, Iwakuma et al. *Virology* 15:120, 1999).

**[00156]** Конструирование векторного генома можно осуществить, используя любые известные в данной области техники методы генной инженерии, включая без ограничений стандартные методы расщепления рестрикционными эндонуклеазами, лигирование, трансформацию, очистку плазмид и секвенирование ДНК, описанные, например, в Sambrook et al. (издания 1989 г. и 2001 г.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Coffin et al. (*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. (1997)); и “RNA Viruses: A Practical Approach” (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

**[00157]** Также можно использовать векторы, сконструированные для временной

экспрессии в клетках млекопитающих. Временная экспрессия подразумевает использование экспрессионного вектора, который способен к эффективной репликации в клетке-хозяине так, что в клетке-хозяине накапливается много копий экспрессионного вектора и она, в свою очередь, синтезирует высокие уровни полипептида, кодируемого иммуноген-специфическим полинуклеотидом в экспрессионном векторе. Смотрите Sambrook et al., supra, pp. 16.17-16.22, 1989. Другие векторы и методы, подходящие для экспрессии полипептидов хорошо известны в данной области техники и легко адаптируются к определенным условиям.

**[00158]** Используя предложенные в изобретении идеи и известные в данной области техники факты, специалист в данной области придет к выводу, что эффективность конкретной экспрессионной системы можно исследовать путем трансфекции пакующих клеток вектором, содержащим полинуклеотидную последовательность, кодирующую репортерный белок, и определения уровня экспрессии при помощи подходящего метода, например, измеряя флуоресценцию конъюгата, содержащего зеленый флуоресцентный белок. Другие подходящие репортерные гены хорошо известны в данной области техники.

**[00159]** Примеры вариантов реализации изобретения

**[00160]** В дополнение к любому из вышеизложенных вариантов реализации изобретения, описанных в подробном описании изобретения, предусматриваются варианты реализации изобретения, включающие любой из следующих пунктов или любые их комбинации:

**[00161]** 1. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00162]** (i) оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент;

**[00163]** (ii) структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или его иммунологический фрагмент;

**[00164]** (iii) необязательно – вещество, которое активирует врожденный иммунитет;

и

**[00165]** (iv) фармацевтически приемлемый носитель.

**[00166]** 2. Состав по варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что оболочечным гликопротеином ВПГ-2 является gD2.

**[00167]** 3. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий иммунологический фрагмент оболочечного гликопротеина gD2.

**[00168]** 4. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-3, отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26.

**[00169]** 5. Состав по варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что

структурным белком ВПГ-2 является UL19.

**[00170]** 6. Состав по варианту реализации изобретения 2, отличающийся тем, что структурным белком ВПГ-2 является UL19.

**[00171]** 7. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий иммунологический фрагмент UL19.

**[00172]** 8. Состав по варианту реализации изобретения 2, содержащий иммунологический фрагмент UL19, например, SEQ ID NO 12.

**[00173]** 9. Состав по варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что структурным белком ВПГ-2 является UL25.

**[00174]** 10. Состав по варианту реализации изобретения 2, отличающийся тем, что структурным белком ВПГ-2 является UL25.

**[00175]** 11. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий иммунологический фрагмент UL25.

**[00176]** 12. Состав по варианту реализации изобретения 2, содержащий иммунологический фрагмент UL25.

**[00177]** 13. Состав по варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что структурным белком ВПГ-2 является UL47.

**[00178]** 14. Состав по варианту реализации изобретения 2, отличающийся тем, что структурным белком ВПГ-2 является UL47.

**[00179]** 15. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий иммунологический фрагмент UL47.

**[00180]** 16. Состав по варианту реализации изобретения 2, содержащий иммунологический фрагмент UL47.

**[00181]** 17. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-16, дополнительно содержащий второй структурный белок ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент.

**[00182]** 18. Состав по варианту реализации изобретения 17, отличающийся тем, что второй структурный белок ВПГ-2 выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26, при этом второй структурный белок не является идентичным первому структурному белку.

**[00183]** 19. Состав по варианту реализации изобретения 18, отличающийся тем, что второй структурный белок является полноразмерным белком.

**[00184]** 20. Состав по варианту реализации изобретения 18, отличающийся тем, что второй структурный белок является иммунологическим фрагментом второго структурного белка.

- [00185] 21. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 5-8, дополнительно содержащий UL25.
- [00186] 22. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 5-8, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL25.
- [00187] 23. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 5-8, дополнительно содержащий UL47.
- [00188] 24. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 5-8, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47.
- [00189] 25. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 9-12, дополнительно содержащий UL19.
- [00190] 26. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 9-12, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL19, например, SEQ ID NO. 12.
- [00191] 27. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 9-12, дополнительно содержащий UL47.
- [00192] 28. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 9-12, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47.
- [00193] 29. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 13-16, дополнительно содержащий UL19.
- [00194] 30. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 13-16, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL19, например, SEQ ID NO. 12.
- [00195] 31. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 13-16, дополнительно содержащий UL25.
- [00196] 32. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 13-16, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL25.
- [00197] 33. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-32, отличающийся тем, что указанное вещество является адъювантом.
- [00198] 34. Состав по варианту реализации изобретения 33, отличающийся тем, что адъювант является GLA.
- [00199] 35. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий gD2; UL25; UL19; адъювант GLA; и фармацевтически приемлемый носитель.
- [00200] 36. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий gD2, UL25 и иммунологический фрагмент UL19, например, SEQ ID NO. 12.
- [00201] 37. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий gD2, UL19 и

иммунологический фрагмент UL25.

**[00202]** 38. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 35-37, дополнительно содержащий UL47.

**[00203]** 39. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 35-37, дополнительно содержащий иммунологический фрагмент UL47.

**[00204]** 40. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий ICP0 или его иммунологический фрагмент и один или более элемент из UL47 или его иммунологического фрагмента, UL19 или его иммунологического фрагмента, UL25 или его иммунологического фрагмента, UL46 или его иммунологического фрагмента, UL39 или его иммунологического фрагмента, UL7 или его иммунологического фрагмента и UL26 или его иммунологического фрагмента.

**[00205]** 41. Состав по варианту реализации изобретения 2, содержащий ICP0 или его иммунологический фрагмент и один или более элемент из UL47 или его иммунологического фрагмента, UL19 или его иммунологического фрагмента, UL25 или его иммунологического фрагмента, UL46 или его иммунологического фрагмента, UL39 или его иммунологического фрагмента, UL7 или его иммунологического фрагмента и UL26 или его иммунологического фрагмента.

**[00206]** 42. Состав по вариантам реализации изобретения 40 или 41, содержащий ICP0 или его иммунологический фрагмент и два дополнительных структурных белка или их иммунологических фрагментов.

**[00207]** 43. Состав по варианту реализации изобретения 1, содержащий UL46 или его иммунологический фрагмент и один или более элемент из UL47 или его иммунологического фрагмента, UL19 или его иммунологического фрагмента, UL25 или его иммунологического фрагмента, ICP0 или его иммунологического фрагмента, UL39 или его иммунологического фрагмента, UL7 или его иммунологического фрагмента и UL26 или его иммунологического фрагмента.

**[00208]** 44. Состав по варианту реализации изобретения 2, содержащий UL46 или его иммунологический фрагмент и один или более элемент из UL47 или его иммунологического фрагмента, UL19 или его иммунологического фрагмента, UL25 или его иммунологического фрагмента, ICP0 или его иммунологического фрагмента, UL39 или его иммунологического фрагмента, UL7 или его иммунологического фрагмента и UL26 или его иммунологического фрагмента.

**[00209]** 45. Состав по вариантам реализации изобретения 43 или 44, содержащий UL46 или его иммунологический фрагмент и два дополнительных структурных белка или их иммунологических фрагментов.

- [00210] 46. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2, у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45.
- [00211] 47. Способ генерации иммунного ответа на ВПГ-2 у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45.
- [00212] 48. Способ по варианту реализации изобретения 47, отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серопозитивным к ВПГ-1.
- [00213] 49. Способ по варианту реализации изобретения 47, отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1.
- [00214] 50. Фармацевтический состав, содержащий
- [00215] антигенную часть оболочечного гликопротеина ВПГ-2 и фармацевтически приемлемый носитель, при этом антигенная часть содержит лидерную последовательность оболочечного гликопротеина ВПГ-2.
- [00216] 51. Состав по варианту реализации изобретения 50, отличающийся тем, что антигенная часть связывается с нейтрализующими антителами.
- [00217] 52. Состав по варианту реализации изобретения 50, отличающийся тем, что оболочечный гликопротеин ВПГ-2 является gD2 или gB2.
- [00218] 53. Состав по вариантам реализации изобретения 50-52, отличающийся тем, что антигенная часть содержит два или более линейных эпитопов из оболочечного гликопротеина.
- [00219] 54. Состав по вариантам реализации изобретения 50-52, отличающийся тем, что антигенная часть содержит два или более прерывистых эпитопов из оболочечного гликопротеина.
- [00220] 55. Состав по вариантам реализации изобретения 50-54, дополнительно содержащий вещество, которое активирует врожденный иммунитет.
- [00221] 56. Состав по варианту реализации изобретения 55, отличающийся тем, что указанное вещество является адъювантом.
- [00222] 57. Состав по варианту реализации изобретения 56, отличающийся тем, что адъювант является GLA.
- [00223] 58. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2 или ВПГ-1, у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 50-57.
- [00224] 59. Способ генерации иммунного ответа на ВПГ-2 или ВПГ-1 у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 50-57.
- [00225] 60. Способ по вариантам реализации изобретения 58-59, отличающийся тем,

что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1.

**[00226]** 61. Способ по вариантам реализации изобретения 58-59, отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1.

**[00227]** 62. Набор, содержащий емкость, содержащую состав по варианту реализации изобретения 50.

**[00228]** 63. Выделенный фрагмент UL19, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 1-336 и 1295-1374 из SEQ ID NO: 4.

**[00229]** 64. Выделенный полипептид, содержащий фрагмент UL19, состоящий из SEQ ID NO: 12, или его фрагмент.

**[00230]** 65. Полипептид по варианту реализации изобретения 64, дополнительно содержащий пептид, не являющийся UL19, сшитый с фрагментом UL19.

**[00231]** 66. Выделенный полипептид, содержащий пептид, который состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной на участке из более 50 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 12, в некоторых случаях сшитый с отличным от UL19 пептидом.

**[00232]** 67. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00233]** (i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12 или его иммунологический вариант или фрагмент либо фрагмент полипептида по любому из вариантов реализации изобретения 63-67;

**[00234]** (ii) адъювант; и

**[00235]** (iii) фармацевтически приемлемый носитель.

**[00236]** 68. Состав по варианту реализации изобретения 67, отличающийся тем, что адъювант является агонистом TLR4.

**[00237]** 69. Состав по варианту реализации изобретения 68, отличающийся тем, что адъювант является GLA (Фигура 1).

**[00238]** 70. Состав по варианту реализации изобретения 67, дополнительно содержащий любой элемент из (а) оболочечного белка ВПГ-2, (b) структурного белка ВПГ-2, отличного от оболочечного белка ВПГ-2, или (с) иммунологический фрагмент (а) или (b).

**[00239]** 71. Состав по варианту реализации изобретения 67, дополнительно содержащий структурный белок ВПГ-2.

**[00240]** 72. Состав по варианту реализации изобретения 71, отличающийся тем, что структурный белок выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26.

**[00241]** 73. Состав по варианту реализации изобретения 67, дополнительно

содержащий gD2 или его иммунологический фрагмент, UL25 или его иммунологический фрагмент и, необязательно, UL47 или его иммунологический фрагмент.

**[00242]** 74. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00243]** (i) оболочечный гликопротеин ВПП-2 или его иммунологический фрагмент;

**[00244]** (ii) GLA (Фигура 1); и

**[00245]** (iii) фармацевтически приемлемый носитель.

**[00246]** 75. Состав по варианту реализации изобретения 74, отличающийся тем, что оболочечный гликопротеин ВПП-2 или его иммунологический фрагмент является gD2 или его иммунологическим фрагментом.

**[00247]** 76. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00248]** (i) структурный белок ВПП-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПП-2, или его иммунологический фрагмент;

**[00249]** (ii) GLA; и

**[00250]** (iii) фармацевтически приемлемый носитель.

**[00251]** 77. Состав по варианту реализации изобретения 76, отличающийся тем, что структурный белок ВПП-2 или его иммунологический фрагмент выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26 либо иммунологических фрагментов любых из этих белков.

**[00252]** 78. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 33, 34, 56, 57, 66, 67 и 71-77, дополнительно содержащий второй адъювант.

**[00253]** 79. Состав по варианту реализации изобретения 78, отличающийся тем, что второй адъювант выбран из группы, состоящей из агониста TLR, например агониста TLR7 или агониста TLR9; квасцов; эмульсии; сапонина; цитокина; неметилированного динуклеотида CpG и модифицированного сапонина.

**[00254]** 80. Состав по варианту реализации изобретения 78, отличающийся тем, что второй адъювант выбран из группы, состоящей из неполного адъюванта Фрейнда, MF-59<sup>TM</sup>, Montanide<sup>TM</sup>, AS02<sup>TM</sup>, AS04<sup>TM</sup>, QS-21<sup>TM</sup> и ISCOM<sup>TM</sup>.

**[00255]** 81. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00256]** (i) ICP4 или его иммунологический фрагмент;

**[00257]** (ii) gD2 или его иммунологический фрагмент;

**[00258]** (iii) GLA (Фигура 1); и

**[00259]** (iv) фармацевтически приемлемый носитель.

**[00260]** 82. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00261]** (i) генный продукт  $\alpha$ -группы ВПП-2 или его иммунологический фрагмент;

и/или

- [00262] (ii)  $\beta$ 1-генный продукт ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или
- [00263] (iii)  $\beta$ 2-генный продукт ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или
- [00264] (iv)  $\gamma$ 1-генный продукт ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или
- [00265] (v)  $\gamma$ 2-генный продукт ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и/или
- [00266] (vi) адъювант, предпочтительно, GLA (Фигура 1); и
- [00267] (vii) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00268] 83. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-82, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество.
- [00269] 84. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2, или инфекции, вызванной ВПГ-1, у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 65-83.
- [00270] 85. Способ генерации иммунного ответа на инфекцию, вызванную ВПГ-2 или ВПГ-1, у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 65-83.
- [00271] 86. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 84-85, отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серопозитивным к ВПГ-1.
- [00272] 87. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 84-85, отличающийся тем, что субъект является серопозитивным к ВПГ-2 и серонегативным к ВПГ-1.
- [00273] 88. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 83-87, отличающийся тем, что введение осуществляется внутрикожным, мукозальным, внутримышечным, подкожным, подъязычным, ректальным или вагинальным путем.
- [00274] 89. Способ снижения передачи ВПГ-2 от субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-83.
- [00275] 90. Способ снижения выделения ВПГ-2 у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-83.
- [00276] 91. Способ снижения частоты появления поражений у субъекта, инфицированного ВПГ-2, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-83.
- [00277] 92. Способ снижения риска заражения ВИЧ у субъекта, инфицированного ВПГ-2, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-83.
- [00278] 93. Способ индукции стерильного иммунитета к ВПГ-2 у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения

1-45, 50-57 и 65-83.

**[00279]** 94. Набор, содержащий состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 65-83.

**[00280]** 95. Набор по варианту реализации изобретения 94, дополнительно содержащий ослабленный вирус ВПГ1 или ВПГ2.

**[00281]** 96. Набор по варианту реализации изобретения 94, дополнительно содержащий инактивированный вирус ВПГ1 или ВПГ2.

**[00282]** 97. Набор по варианту реализации изобретения 94, дополнительно содержащий вирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антиген ВПГ1 или ВПГ2.

**[00283]** 98. Набор по варианту реализации изобретения 94, дополнительно содержащий вирусоподобную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий антиген ВПГ1 или ВПГ2.

**[00284]** 99. Набор по варианту реализации изобретения 94, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий антиген ВПГ1 или ВПГ2.

**[00285]** 100. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, отличающийся тем, что оболочечный гликопротеин и/или структурный белок сшит с гетерологичным пептидом.

**[00286]** 101. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 58-61 и 84-93, дополнительно включающий введение полинуклеотида, кодирующего антиген ВПГ1 и/или ВПГ2.

**[00287]** 102. Способ по варианту реализации изобретения 101, отличающийся тем, что полинуклеотид является частью генома вирусного вектора.

**[00288]** 103. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 58-61 и 84-93, дополнительно включающий введение инактивированного или ослабленного вируса ВПГ1 или ВПГ2.

**[00289]** 104. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 58-61 и 84-93, дополнительно включающий введение вирусоподобной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий антиген ВПГ1 или ВПГ2.

**[00290]** 105. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00291]** (i) первый полинуклеотид, кодирующий оболочечный гликопротеин ВПГ-2, или его иммунологический фрагмент;

**[00292]** (ii) второй полинуклеотид, кодирующий структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или его иммунологический фрагмент;

**[00293]** (iii) необязательно – вещество, которое активирует врожденный иммунитет,

такое как адъювант; и

- [00294]** (iv) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00295]** 106. Состав по варианту реализации изобретения 105, отличающийся тем, что оболочечный гликопротеин ВПГ-2 является gD2.
- [00296]** 107. Состав по варианту реализации изобретения 105, содержащий иммунологический фрагмент оболочечного гликопротеина gD2.
- [00297]** 108. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26.
- [00298]** 109. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент является UL19 или его иммунологическим фрагментом.
- [00299]** 110. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что второй полинуклеотид кодирует UL19.
- [00300]** 111. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что второй полинуклеотид кодирует иммунологический фрагмент UL19, необязательно – фрагмент или полипептид по любому из вариантов реализации изобретения 63-66.
- [00301]** 112. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что второй полинуклеотид кодирует SEQ ID NO 12.
- [00302]** 113. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент является UL25 или его иммунологическим фрагментом.
- [00303]** 114. Состав по любому из вариантов реализации 105-107, отличающийся тем, что второй полинуклеотид кодирует UL25.
- [00304]** 115. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что второй полинуклеотид кодирует иммунологический фрагмент UL25.
- [00305]** 116. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-107, отличающийся тем, что структурный белок ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент является UL47 или его иммунологическим фрагментом.
- [00306]** 117. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-116, дополнительно содержащий третий полинуклеотид, кодирующий второй структурный белок ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент.
- [00307]** 118. Состав по варианту реализации изобретения 117, отличающийся тем,

что второй структурный белок ВПП-2 выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26, при этом второй структурный белок не идентичен первому структурному белку.

**[00308]** 119. Состав по варианту реализации изобретения 118, отличающийся тем, что второй структурный белок является полноразмерным белком или его иммунологическим фрагментом.

**[00309]** 120. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 100-112, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL25 или его иммунологический фрагмент.

**[00310]** 121. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 106-109, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL47 или его иммунологический фрагмент.

**[00311]** 122. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 113-115, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL19.

**[00312]** 123. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 113-115, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO. 12.

**[00313]** 124. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 113-115, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL47 или его иммунологический фрагмент.

**[00314]** 125. Состав по варианту реализации изобретения 116, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL19.

**[00315]** 126. Состав по варианту реализации изобретения 116, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO. 12.

**[00316]** 127. Состав по варианту реализации изобретения 116, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL25 или его иммунологический фрагмент.

**[00317]** 128. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-127, отличающийся тем, что указанное вещество является адъювантом, необязательно – агонистом TLR4.

**[00318]** 129. Состав по варианту реализации изобретения 128, отличающийся тем, что адъювант является GLA.

**[00319]** 130. Состав по варианту реализации изобретения 105, отличающийся тем, что первый полинуклеотид кодирует gD2; второй полинуклеотид кодирует UL25; а состав дополнительно содержит третий полинуклеотид, кодирующий UL19; адъювант GLA; и фармацевтически приемлемый носитель.

**[00320]** 131. Состав по варианту реализации изобретения 105, отличающийся тем,

что первый полинуклеотид кодирует gD2; второй полинуклеотид кодирует UL25; а состав дополнительно содержит третий полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO. 12.

**[00321]** 132. Состав по варианту реализации изобретения 105, отличающийся тем, что первый полинуклеотид кодирует gD2; второй полинуклеотид кодирует UL19; а состав дополнительно содержит третий полинуклеотид, кодирующий иммунологический фрагмент UL25.

**[00322]** 133. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 130-132, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий UL47 или его иммунологический фрагмент.

**[00323]** 134. Состав по варианту реализации изобретения 105 или 106, содержащий полинуклеотид, кодирующий ICP0 или его иммунологический фрагмент, и один или более элементов из полинуклеотида, кодирующего UL47 или его иммунологический фрагмент, UL19 или его иммунологический фрагмент, UL25 или его иммунологический фрагмент, UL46 или его иммунологический фрагмент, UL39 или его иммунологический фрагмент, UL7 или его иммунологический фрагмент и UL26 или его иммунологический фрагмент.

**[00324]** 135. Состав по варианту реализации изобретения 134, содержащий полинуклеотид, кодирующий ICP0 или его иммунологический фрагмент, и два дополнительных структурных белка или их иммунологические фрагменты.

**[00325]** 136. Состав по варианту реализации изобретения 105 или 106, содержащий полинуклеотид, кодирующий UL46 или его иммунологический фрагмент, и один или более элементов из полинуклеотида, кодирующего UL47 или его иммунологический фрагмент, UL19 или его иммунологический фрагмент, UL25 или его иммунологический фрагмент, ICP0 или его иммунологический фрагмент, UL39 или его иммунологический фрагмент, UL7 или его иммунологический фрагмент и UL26 или его иммунологический фрагмент.

**[00326]** 138. Состав по варианту реализации изобретения 136, содержащий полинуклеотид, кодирующий UL46 или его иммунологический фрагмент, и полинуклеотиды, кодирующие два дополнительных структурных белка или их иммунологические фрагменты.

**[00327]** 139. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий

**[00328]** (i) первый полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, или его иммунологический вариант или фрагмент;

**[00329]** (ii) необязательно – вещество, которое активировывает врожденный иммунитет, такое как адъювант; и

- [00330] (iii) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00331] 140. Состав по варианту реализации изобретения 139, отличающийся тем, что указанное вещество является адъювантом.
- [00332] 141. Состав по варианту реализации изобретения 140, отличающийся тем, что адъювант является GLA.
- [00333] 142. Состав по варианту реализации изобретения 139, дополнительно содержащий второй полинуклеотид, кодирующий структурный белок ВПП-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПП-2, или его иммунологический фрагмент.
- [00334] 143. Состав по варианту реализации изобретения 139, дополнительно содержащий третий полинуклеотид, кодирующий структурный белок ВПП-2 дополнительно к UL19(ud).
- [00335] 144. Состав по варианту реализации изобретения 143, отличающийся тем, что структурный белок выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26.
- [00336] 145. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий
- [00337] (i) первый полинуклеотид, кодирующий оболочечный гликопротеин ВПП-2 или его иммунологический фрагмент;
- [00338] (ii) GLA; и
- [00339] (iii) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00340] 146. Состав по варианту реализации изобретения 145, отличающийся тем, что оболочечный гликопротеин ВПП-2 является gD2.
- [00341] 147. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий
- [00342] (i) первый полинуклеотид, кодирующий структурный белок ВПП-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПП-2, или его иммунологический фрагмент;
- [00343] (ii) GLA; и
- [00344] (iii) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00345] 148. Состав по варианту реализации изобретения 147, отличающийся тем, что структурный белок ВПП-2 выбран из группы, состоящей из UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 и UL26.
- [00346] 149. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-149, дополнительно содержащий второй адъювант.
- [00347] 150. Состав по варианту реализации изобретения 149, отличающийся тем, что второй адъювант выбран из группы, состоящей из агониста TLR, квасцов, эмульсии, сапонина, цитокина, метилированного динуклеотида CpG и модифицированного сапонина.

- [00348]** 151. Состав по варианту реализации изобретения 149, отличающийся тем, что второй адъювант выбран из группы, состоящей из неполного адъюванта Фрейнда, MF-59<sup>TM</sup>, Montanide<sup>TM</sup>, AS02<sup>TM</sup>, AS04<sup>TM</sup>, QS-21<sup>TM</sup> и ISCOM<sup>TM</sup>.
- [00349]** 152. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий
- [00350]** (i) первый полинуклеотид, кодирующий ICP4 или его иммунологический фрагмент;
- [00351]** (ii) второй полинуклеотид, кодирующий gD2 или его иммунологический фрагмент;
- [00352]** (iii) GLA; и
- [00353]** (iv) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00354]** 153. Иммуногенный фармацевтический состав, содержащий
- [00355]** (i) первый полинуклеотид, кодирующий продукт немедленно-раннего гена ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент;
- [00356]** (ii) второй полинуклеотид, кодирующий продукт раннего гена ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент;
- [00357]** (iii) третий полинуклеотид, кодирующий продукт позднего гена ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент; и
- [00358]** (iv) фармацевтически приемлемый носитель.
- [00359]** 154. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-153, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество.
- [00360]** 155. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 105-154, отличающийся тем, что полинуклеотиды находятся в одном или более рекомбинантных экспрессионных векторах.
- [00361]** 156. Состав по варианту реализации изобретения 155, отличающийся тем, что рекомбинантный экспрессионный вектор является вирусным вектором или вирусоподобной частицей.
- [00362]** 157. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2 или ВПГ-1, у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 105-156 и дополнительное введение второго состава, содержащего адъювант.
- [00363]** 158. Способ по варианту реализации изобретения 157, отличающийся тем, что адъювант является агонистом TLR4.
- [00364]** 159. Способ по варианту реализации изобретения 158, отличающийся тем, что агонист TLR4 является GLA.
- [00365]** 160. Способ генерации иммунного ответа на ВПГ-2 или ВПГ-1 у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения

105-156 и дополнительное введение второго состава, содержащего адьювант.

**[00366]** 161. Способ по варианту реализации изобретения 160, отличающийся тем, что адьювант является агонистом TLR4.

**[00367]** 162. Способ по варианту реализации изобретения 161, отличающийся тем, что агонист TLR4 является GLA.

**[00368]** 163. Состав по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57 и 66-83, дополнительно содержащий вирусоподобную частицу, при этом вирусоподобная частица содержит оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент и структурный белок ВПГ-2, отличный от оболочечного гликопротеина ВПГ-2, или его иммунологический фрагмент по любому из вариантов реализации изобретения 1-45; антигенную часть оболочечного гликопротеина ВПГ-2 по любому из вариантов реализации изобретения 50-57; фрагмент UL19 по любому из вариантов реализации изобретения 63-65; полипептид по любому из вариантов реализации изобретения 66-73; оболочечный гликопротеин ВПГ-2 или его иммунологический фрагмент по любому из вариантов реализации изобретения 74-75; структурный белок по любому из вариантов реализации изобретения 76-77; или ICP4 или его иммунологический фрагмент и gD2 или его иммунологический фрагмент по варианту реализации изобретения 81.

**[00369]** 164. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2, или инфекции, вызванной ВПГ-1, у субъекта, включающий первый этап, включающий введение субъекту ослабленного живого вируса ВПГ, и второй этап, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57, 66-83 и 105-156.

**[00370]** 165. Способ генерации иммунного ответа на инфекцию, вызванную ВПГ-2 или ВПГ-1, у субъекта, включающий первый этап, включающий введение субъекту ослабленного живого вируса ВПГ, и второй этап, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57, 66-83 и 105-156.

**[00371]** 166. Способ лечения инфекции, вызванной ВПГ-2, или инфекции, вызванной ВПГ-1, у субъекта, включающий первый этап, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57, 66-83 и 105-156, и второй этап, включающий введение субъекту ослабленного живого вируса ВПГ.

**[00372]** 167. Способ генерации иммунного ответа на инфекцию, вызванную ВПГ-2 или ВПГ-1, у субъекта, включающий первый этап, включающий введение субъекту состава по любому из вариантов реализации изобретения 1-45, 50-57, 66-83 и 105-156, и второй этап, включающий введение субъекту ослабленного живого вируса ВПГ.

**[00373]**

**[00374]** Следующие примеры предложены в иллюстративных целях и не являются

ограничивающими.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

#### ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ НА ОСНОВЕ CD4 Т-КЛЕТОК ПРОТИВ БЕЛКА GD2 ВПГ-2 ПРИ СМЕШИВАНИИ С АДЬЮВАНТОМ GLA-SE ПОСЛЕ МНОГОРАЗОВОЙ ВАКЦИНАЦИИ МЫШЕЙ

**[00375]** В данном примере оценивали способность GLA-SE усиливать ответы CD4 Т-клеток после иммунизации мышей вакциной, содержащей рекомбинантный белок.

**[00376]** Группы из пяти мышей штамма Balb/c иммунизировали в режиме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 0,8, 4 или 20 мкг рекомбинантного белка gD в комбинации с 0,8, 4 или 20 мкг GLA-SE (процентное содержание SE в этом и последующих исследованиях составляет 2%), одним SE или ФСБ, вводимым внутримышечно в объеме 100 мкл (50 мкл в каждую лапу). Мыши, иммунизированные GLA-SE, одним SE или ФСБ в отсутствие рекомбинантного белка, служили отрицательным контролем. Ответы антиген-специфических CD4 Т-клеток селезенки фиксировали на 4 день после вторичной инъекции при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов (ВОЦ) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 после ex-vivo повторной стимуляции культур спленоцитов на протяжении 5 часов пептидом gD<sub>272-285</sub>, который ранее был определен как эпитоп CD4 Т-клетки в gD2, который присутствует у мышей с гаплотипом H-2d. Как показано на Фигуре 2, ответ CD4 Т-клеток на иммунизацию каждой из дозировок рекомбинантного белка gD2 наблюдали только в случае, если GLA-SE или SE были включены в качестве адьювантов. При каждой дозировке рекомбинантного антигена gD2 и каждой дозировке GLA-SE уровень ответа gD2-специфических CD4 Т-клеток превышал ответ, наблюдаемый для того же количества рекомбинантного антигена gD2, смешанного с одним SE. Кроме того, качество популяции демонстрирующих ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток согласно измеренной частоте появления IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> и IL-2<sup>+</sup> CD4 Т-клеток (тройных позитивных) среди популяции демонстрирующих ответ CD4 Т-клеток превышало при каждой дозировке рекомбинантного белка gD2 и каждой дозировке GLA то, которое наблюдали для gD2, смешанного с одним SE. Данные, полученные в этом исследовании, указывают на то, что смешивание адьюванта GLA-SE с рекомбинантным белковым антигеном ВПГ-2 существенно повышает эффективность вакцины по сравнению с той, которой можно

достичь при иммунизации одним рекомбинантным белком или рекомбинантным белком, смешанным с одним SE согласно определению уровня и качества клеточного иммунного ответа.

## ПРИМЕР 2

### GLA УСИЛИВАЕТ ОТВЕТЫ CD8 Т-КЛЕТОК МЫШЕЙ

**[00377]** В данном примере оценивали способность GLA-SE усиливать ответы CD8 Т-клеток после иммунизации мышей вакциной, содержащей рекомбинантный белок.

**[00378]** В качестве модельного белка использовали овальбумин. Самкам мышей штамма C57Bl/6 проводили п/к инъекцию лентивирус-кодируемого овальбумина (“LV-OVA” на Фигурах 3 и 4) и, на 21 день, вторичную в/м инъекцию рекомбинантного овальбумина с добавлением в качестве адъюванта разных дозировок GLA-SE (“OVA+GLA/SE” на Фигурах 3 и 4). Через четыре дня при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов (ВОЦ) фиксировали ответы Т-клеток селезенки на следующие *in vitro* стимулирующие вещества: пептиды OVA 55-62 и 257-264 ГКГ класса I и пептид 323-339 ГКГ класса II или антитела к CD3 и к CD28. CD8 Т-клетки определяли как те, которые секретируют любые из цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ .

**[00379]** Как показано на Фигуре 3, процентное содержание CD8 Т-клеток было выше для мышей, которым проводили вторичную инъекцию антигена, при этом более высокое процентное содержание наблюдали для мышей, которые во время вторичной инъекции вместе с антигеном получали GLA-SE. На Фигуре 4 приведены экспериментальные данные по соотношению между четырьмя подгруппами CD8 Т-клеток. Следовательно, вторичная в/м инъекция вакцины, содержащей рекомбинантный белок OVA + GLA-SE, стимулировала предсуществующие CD8 Т-клетки, которые были сгенерированы во время предыдущей вакцинации LV. Средняя (4 мкг) и низкая (0,8 мкг) дозировки GLA обеспечили наибольшее увеличение количества CD8 Т-клеток в этих экспериментальных условиях. Следовательно, эти данные показывают, что белок с добавлением адъюванта GLA можно использовать для стимуляции специфического к белку ответа предсуществующих CD8 Т-клеток памяти. Активация CD8 Т-клеток памяти считается необходимым свойством терапевтической вакцины против ВПГ-2 для лечения инфицированных особей, подчеркивая полезные свойства, которые белок с добавлением адъюванта GLA может принести в вакцину против ВПГ-2.

## ПРИМЕР 3

## ИММУНОГЕННОСТЬ НА ОСНОВЕ CD4 Т-КЛЕТОК ПРОТИВ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ GD2, UL19 И UL25 ВПГ-2 ПОСЛЕ МНОГОРАЗОВОЙ ВАКЦИНАЦИИ МЫШЕЙ

**[00380]** Целью данного комплекса исследований было определение одного штамма мышей, в котором можно оценить иммуногенность на основе CD4 Т-клеток против каждой белковой субъединицы в вакцине. До сих пор на мышах проводили серии экспериментов для того, чтобы определить отдельные эпитопы CD4 Т-клеток в пределах каждого антигена ВПГ-2 (т.е., gD2, UL19 и UL25) в контексте разных гаплотипов ГКГ (т.е., BALB/c (H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) и CB6F1 (H-2<sup>d</sup> + 2<sup>b</sup>)). Экспериментальная стратегия включала внутримышечную иммунизацию мышей, не принимавших до этого участие в экспериментах, 5 мкг каждого из рекомбинантных белковых антигенов в виде моновалентного иммуногена, смешанного с 5 мкг GLA-SE, в объеме 100 мкл (50 мкл в каждую лапу) в режиме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная). Ответы антиген-специфических CD4 Т-клеток анализировали на 4 день после вторичной иммунизации при помощи библиотек 15-мерных пептидов (с перекрытием между пептидами в 11 ак), чьи последовательности были получены из соответствующих аминокислотных последовательностей моновалентного иммуногена. Во время первичных исследований CD4 клетки селезенки анализировали на предмет выработки IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 в ответ на *ex vivo* стимуляцию культур спленоцитов пулами отдельных 15-мерных пептидов из библиотеки пептидов, которые соответствовали отдельному кодируемому ВПГ-2 антигену. Наблюдаемые ответы CD4 клеток в пулах пептидов считали положительными, а вторичные (и в некоторых случаях третичные) исследования проводили впоследствии с применением таких же методов иммунизации и анализа, используя в качестве *ex vivo* стимуляторов отдельные пептиды в пределах положительных пулов из предыдущего исследования или пептиды в пределах положительных пулов из предыдущего исследования, перегруппированные в других комбинациях. Как показано на Фигурах 5А-В, эти исследования позволили определить отдельные 15-мерные пептиды, против которых можно было наблюдать ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток, для каждого из отдельных рекомбинантных белков ВПГ-2 в составе вакцины (т.е., gD2, UL19 и UL25) в контексте гаплотипа ГКГ H-2<sup>b</sup> (C57BL/6).

### ПРИМЕР 4

## ИММУНОГЕННОСТЬ НА ОСНОВЕ CD4 Т-КЛЕТОК И В-КЛЕТОК ПРОТИВ КАЖДОЙ ОТДЕЛЬНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ БЕЛКА ВПГ-2 ПОСЛЕ МНОГОРАЗОВЫХ ВАКЦИНАЦИЙ МЫШЕЙ ТРЕХВАЛЕНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ

**[00381]** В данном примере рассматривается иммуногенность на основе CD4 Т-клеток и В-клеток против каждой из отдельных единиц рекомбинантного белка в составе вакцины, в случае, когда их вводят совместно в виде трехвалентного препарата с GLA-SE мышам штамма C57BL/6. Экспериментальная стратегия включала изучение двух групп из пяти мышей штамма C57BL/6. Одну группу иммунизировали в режиме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) рекомбинантными белками ВПГ-2 gD2, UL19 и UL25, доставляемыми в комбинации и смешанными в эквимольном соотношении (0,8, 3,3 и 1,4 мкг белка, соответственно) в комбинации с 5,5 мкг GLA-SE, которые вводили внутримышечно в объеме 100 мкл (50 мкл в каждую лапу). Во второй группе проводили ложную иммунизацию носителем (ФСБ). На 4 день после вторичной инъекции животных умерщвляли для того, чтобы собрать образцы селезенки и периферической крови (путем пункции сердца). Ответы антиген-специфических CD4 Т-клеток селезенки фиксировали при помощи ВОЦ IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 после *ex vivo* повторной стимуляции культур спленоцитов 15-мерными пептидами, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток для каждого рекомбинантного белкового иммуногена в составе трехвалентной вакцины (смотрите Пример 3). Сыворотку каждой вакцинированной и ложно вакцинированной мыши анализировали при помощи прямого ELISA-анализа на присутствие антиген-специфических антител иммуноглобулинов подкласса IgG1 к каждому из рекомбинантных белковых иммуногенов в составе трехвалентной вакцины. Как показано на Фигурах 6А-В ответы антиген-специфических CD4 Т-клеток и антител на каждый из рекомбинантных белковых антигенов ВПГ-2 наблюдали в случае, когда их доставляли совместно в виде трехвалентного препарата с GLA-SE. Эти данные подтверждают высокую иммуногенность трехвалентной вакцины и ее способность вызывать сильный иммунный ответ (как гуморальный, так и клеточный) на белки ВПГ-2. Неожиданно уровень наблюдаемых иммунных ответов был наибольшим для антигена UL19. UL19 никогда не включали в качестве компонента ни в одну из предыдущих вакцин на основе рекомбинантных субъединиц, применяемых для лечения или предотвращения инфекции, вызванной ВПГ-2, у людей. Эти данные свидетельствуют о том, что заявляемые вакцины демонстрируют свойства, превосходящие вакцины предшествующего уровня техники.

#### ПРИМЕР 5

#### ОТВЕТЫ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ CD4 Т-КЛЕТОК ПОСЛЕ ОДНОРАЗОВЫХ И

## МНОГОРАЗОВЫХ ИММУНИЗАЦИЙ МЫШЕЙ UL19 ВПГ-2 С GLA-SE

**[00382]** В данном примере рассматривается иммуногенность на основе CD4 Т-клеток, возникающая после одноразовых и повторных иммунизаций мышей UL19 ВПГ-2, смешанным с GLA-SE. В этом исследовании проводили одну иммунизацию двух групп из пяти мышей штамма C57BL/6 и две иммунизации (с интервалом в 21 день) двух групп из пяти мышей штамма C57BL/6 5 мкг рекомбинантного белкового антигена UL19 в виде моновалентного иммуногена 5 мкг GLA-SE. На 4 или 10 день после последней иммунизации группы мышей умерщвляли для анализа ответов антиген-специфических CD4 Т-клеток. Иммунизации, которые проводили соответствующим анализируемым группам, были согласованы по времени таким образом, что все четыре группы умерщвляли в один день для анализа ответов антиген-специфических CD4 Т-клеток. Ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток на иммуноген определяли по выработке IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 в ответ на *ex vivo* стимуляцию спленоцитов отдельными 15-мерными пептидами UL19 номер 250 и 297, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток, специфические к UL19 (смотрите Пример 3). Как показано на Фигурах 7А-В, на четвертый день после последней иммунизации ответы UL19-специфических CD4 Т-клеток фиксировали только у животных, которым проводили две иммунизации, при этом на 10 день после последней иммунизации ответы UL19-специфических CD4 Т-клеток фиксировали для обеих экспериментальных групп, получавших первичную или первичную и вторичную инъекции. На 10 день после последней иммунизации уровень ответа заметно возрос (в ~2,5 раз) у животных, которым проводили две иммунизации, по сравнению с теми, которым проводили только одну иммунизацию. Этот факт показывает, что повторное введение вакцины, содержащей рекомбинантный белок ВПГ-2 + GLA-SE, является предпочтительным для повышения ответа и уровня последующего ответа антиген-специфических CD4 Т-клеток.

**[00383]** Чтобы исследовать зависимость повышения ответа CD4 Т-клеток после повторного введения вакцины от GLA-SE, проводили аналогичный эксперимент, в котором группы мышей иммунизировали одним белком UL19 или белком, смешанным только с SE или GLA-SE. Через 5 или 10 дней после последней иммунизации группы мышей умерщвляли для анализа ответов антиген-специфических CD4 Т-клеток. Ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток на иммуноген определяли по выработке IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-12 в ответ на *ex vivo* стимуляцию спленоцитов отдельными 15-мерными пептидами UL19 номер 250 и 297, которые согласно результатам предварительного анализа, содержат эпитопы CD4 Т-клеток, специфические к UL19 (смотрите Пример 3).

Как показано на Фигурах 8А-В, животные, которым проводили две иммунизации, по сравнению с теми, которым проводили только одну иммунизацию, демонстрировали существенное повышение ответа антиген-специфических CD4 Т-клеток, что подтверждает результаты предыдущего эксперимента. Важно то, что это повышение оказалось зависимым от адъюванта GLA-SE, так как мыши, которым проводили две иммунизации, не демонстрировали существенных ответов CD4 Т-клеток в случае, если иммуноген вводили один или совместно с SE в отсутствие GLA.

#### ПРИМЕР 6

##### ОТВЕТЫ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ CD4 Т-КЛЕТОК ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНОЙ, СМЕШАННОЙ С GLA-SE

**[00384]** В данном Примере показано, что ответы CD4 Т-клеток могут генерироваться против каждой субъединицы трехвалентной вакцины, содержащей антигены gD2, UL19 и UL25, смешанные с GLA-SE, если рекомбинантные белки смешаны в эквимольном или эквимассовом соотношении. Группы самок мышей штамма C57BL/6 (5 мышей/группу) иммунизировали трехвалентной вакциной, в которой общее содержание белка составляло 5 мкг или 15 мкг в эквимольном или эквимассовом соотношении. Мышам проводили вторую иммунизацию гомологичным препаратом на 21 день, а через пять дней после последней иммунизации при помощи ВОЦ определяли ответы Т-клеток после *ex vivo* повторной стимуляции соответствующим пептидом. Как показано на Фигуре 9, ответы эпитоп-специфических CD4 Т-клеток генерируются против каждого отдельного компонента трехвалентной вакцины, содержащей субъединицы ВПГ-2. Положительные ответы наблюдали вне зависимости от того, как смешаны компоненты рекомбинантного белка – в эквимольном или эквимассовом соотношении, что указывает на то, что относительный состав белка в вакцине существенно не влияет на ответы или не изменяет их.

#### ПРИМЕР 7

##### ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ БЕЛКА GD2 ВПГ-2 ПРИ СМЕШИВАНИИ С АДЬЮВАНТОМ GLA-SE ПОСЛЕ МНОГОРАЗОВЫХ ВАКЦИНАЦИЙ МЫШЕЙ

**[00385]** В данном Примере оценивали способность GLA-SE усиливать ответы CD4 Т-клеток после иммунизации мышей вакциной, содержащей рекомбинантный белок.

**[00386]** Группы мышей штамма Balb/c иммунизировали в режиме первичная/вторичная иммунизация (день 0 – первичная/день 21 – вторичная) 4 мкг рекомбинантного белка gD в комбинации с 4 мкг GLA-SE, одним SE или наполнителем ФСБ, который вводили внутримышечно в объеме 100 мкл (50 мкл на лапу). gD2-специфические антитела IgG к ВПГ-2 изотипов IgG1 и IgG2a определяли при помощи ELISA. Как показано на Фигуре 10, адъювант GLA-SE усиливал общий IgG ответ против gD2 ВПГ-2, снижал выработку антиген-специфического IgG1 и повышал выработку антиген-специфического IgG2a.

#### ПРИМЕР 8

##### ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ НА ОСНОВЕ CD8 Т-КЛЕТОК ПРОТИВ БЕЛКА UL19UD ВПГ-2 ПРИ СМЕШИВАНИИ С АДЬЮВАНТОМ GLA-SE

**[00387]** В данном Примере оценивали способность GLA-SE индуцировать функциональные ответы CD8 Т-клеток, специфических к UL19 ВПГ-2, после иммунизации мышей трехвалентной вакциной, содержащей рекомбинантный gD2 ВПГ-2, верхний домен UL19 (UL19ud; SEQ ID NO: 12) и UL25.

**[00388]** Группам из пяти мышей штамма C57BL/6 проводили внутримышечную иммунизацию трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных gD2, UL19ud и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Мыши, иммунизированные чистым наполнителем, служили отрицательным контролем. Ответы антиген-специфических CD4 и CD8 Т-клеток селезенки фиксировали на 6 день после иммунизации при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов (ВОЦ) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 после *ex vivo* повторной стимуляции культур спленоцитов на протяжении 5 часов при помощи пептидов gD2, UL19 или UL25. Как показано на Фигуре 11, панель А, ответ CD4 Т-клеток на каждый компонент трехвалентной вакцины (gD2, UL19ud и UL25) наблюдали в случае, когда GLA-SE был включен в качестве адъюванта. При этом, как показано на Фигуре 11, панель В, ответ CD8 Т-клеток на антиген UL19ud наблюдали в случае наличия GLA-SE. Для подтверждения, что эти CD8 Т-клетки являются функциональными, неиммунизированным мышам или мышам, иммунизированным 4 неделями раньше трехвалентной вакциной, содержащей GLA-SE, подкожно вводили ослабленный вирус ВПГ-2 с дефицитом тимидинкиназы (ТК) и при помощи ВОЦ фиксировали ответы UL19-специфических CD8 Т-клеток. Как показано на Фигуре 11, панель С, уровень ответа CD8 Т-клеток после введения вируса был выше для мышей, предварительно иммунизированных вакциной.

## ПРИМЕР 9

ПОВЫШЕНИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АНТИВИРУСНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ВПГ-2, ПРИ ЕЕ  
СМЕШИВАНИИ С АДЬЮВАНТОМ GLA-SE

**[00389]** В данном Примере оценивали способность GLA-SE повышать способность бивалентной вакцины, содержащей рекомбинантный белок ВПГ-2, защищать от летального заражения ВПГ-2.

**[00390]** Группам из десяти мышей штамма C57BL/6 проводили две внутримышечные иммунизации, интервал между которыми составлял 28 дней, бивалентной вакцины, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2 и UL19ud в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Мыши, иммунизированные при помощи 5 мкг одного GLA-SE, служили отрицательным контролем. Через 22 дня после второй иммунизации мышей обрабатывали депомедроксипрогестерона ацетатом, а затем, шестью днями позже, внутривагинально вводили дозу 50xLD<sub>50</sub> ВПГ-2 дикого типа. Ежедневно отслеживали появление поражений гениталий и выживаемость мышей. На 1, 3 и 5 дни после инфицирования брали влагалищные мазки для количественной оценки ДНК ВПГ-2 при помощи ПЦР. Приблизительно через 2 месяца после инфицирования у выживших мышей брали дорсальные корешковые ганглии и при помощи ПЦР количественно оценивали латентные ДНК ВПГ-2. Как показано на Фигуре 12, панель А, у мышей, иммунизированных gD2 и UL19ud с GLA-SE наблюдали резкое снижение образования поражений и повышенную выживаемость по сравнению с мышами, иммунизированными gD2 и одним UL19ud или одним GLA-SE. Аналогично, как показано на Фигуре 12, панель В, 9 из 10 мышей, иммунизированных gD2 и UL19ud с GLA-SE, не обнаруживали детектируемой ДНК ВПГ-2 на 5 день, в то время как мыши из контрольной группы демонстрировали устойчивые уровни ВПГ-2 во влагалище через 5 дней. Как показано на Фигуре 12, панель С, хотя в группе, обработанной одним GLA-SE, выжило трое животных, 2 из 3 этих мышей обнаруживали существенные уровни латентного ВПГ-2 в дорсальных корешковых ганглиях, мыши, иммунизированные gD2 и UL19ud с GLA-SE обнаруживали низкое содержание или не обнаруживали детектируемого ВПГ-2 в ганглиях.

## ПРИМЕР 10

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПАНСИИ ПРЕДСУЩЕСТВУЮЩИХ CD8 Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ  
ВСЛЕДСТВИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ  
БЕЛОК ВПГ-2, ПРИ СМЕШИВАНИИ С АДЬЮВАНТОМ GLA-SE

**[00391]** В данном примере оценивали способность GLA-SE повышать способность трехвалентной вакцины, содержащей рекомбинантный белок ВПГ-2, повышать экспансию CD8 Т-клеток памяти, предварительно индуцированных инфицированием ВПГ-2.

**[00392]** Группы из пяти мышей штамма C57BL/6 подкожно инфицировали сублетальной дозой ослабленного вируса ВПГ-2 с дефицитом тимидинкиназы (ТК). Через 28 дней инфицированных или неинфицированных мышей иммунизировали трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud (SEQ ID NO:12) и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Контрольные группы включали инфицированных мышей, обработанных одним GLA-SE или одним наполнителем, а также, мышей, ранее не участвовавших в экспериментах, обработанных одним наполнителем. Через шесть дней после иммунизации при помощи ВОЦ фиксировали ответы UL19-специфических CD4 и CD8 Т-клеток. Как показано на Фигуре 13, частота появления UL19-специфических CD4 и CD8 Т-клеток была большей после иммунизации предварительно инфицированных мышей, что указывает на то, что имел место вторичный ответ индуцированных инфицированием Т-клеток памяти. Важно, что для максимальной экспансии Т-клеток памяти при помощи вакцины, содержащей рекомбинантный белок, необходимо присутствие адъюванта GLA-SE.

ПРИМЕР 11

СПОСОБНОСТЬ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ВПГ-2,  
ИЗЛЕЧИВАТЬ ПОВТОРНУЮ ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ ВПГ-2, У МОРСКИХ  
СВИНОК

**[00393]** В данном примере оценивали способность вакцины, содержащей рекомбинантный белок ВПГ-2, снижать частоту повторного появления поражений, связанных с ВПГ-2.

**[00394]** Группы из семи морских свинок инфицировали внутривагинально сублетальной дозой вируса ВПГ-2 штамма 333. На 13 и 27 дни после инфицирования морских свинок иммунизировали трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud (смотрите SEQ ID NO:12) и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE. Инфицированные морские свинки, обработанные одним GLA-SE, служили

в качестве отрицательного контроля. Ежедневно отслеживали появление у животных вагинальных поражений и каждому дню приписывали оценку 0-4. Ежедневную оценку появления поражений для каждой группы усредняли и строили временную зависимость. Как показано на Фигуре 14, для животных, обработанных трехвалентной вакциной плюс GLA-SE, наблюдали приблизительно 50% снижение появления повторных поражений по сравнению с животными, обработанными одним GLA-SE.

#### ПРИМЕР 12

##### КОНСТРУКЦИЯ ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ОБОЛОЧЕЧНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА ВПГ-2 И СОДЕРЖАЩЕГО ЛИДЕРНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

**[00395]** В данном примере иммуногенный белок сконструирован из последовательности gD2 и содержит лидерную последовательность gD2.

**[00396]** Лидерная последовательность gD2 составляет в длину 40 аминокислот (остатки 1-40 в SEQ ID NO: 1). Нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент из 100 аминокислот (остатки 1-100) вставляли в экспрессионный вектор. Сайт-направленный мутагенез использовали для того, чтобы заменить остатки 38-42 из CysAlaLysTyr (SEQ ID NO: 16) на GlyLeuAlaVal (SEQ ID NO: 17) или другую последовательность, которая не отщепляется во время белкового синтеза. Клетки CHO трансформировали вектором, содержащим измененную последовательность, и выделяли белок gD2. В другом варианте нуклеотидную последовательность вставляли в бакуловирусный экспрессионный вектор, а белок выделяли из клеток Sf9. Подтверждение наличия лидерной последовательности получали при помощи ВЭЖХ-анализа.

#### ПРИМЕР 13

##### ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ТРЕХВАЛЕНТНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ВПГ-2 ПЛЮС GLA/SE, ПРОТИВ ЛЕТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУЛЕНТНЫМ ВПГ-2

**[00397]** В данном примере оценивали способность вакцины, содержащей трехвалентный рекомбинантный белок ВПГ-2 плюс адъювант GLA, защищать от летального ВПГ-2.

Группам из десяти мышей штамма C57BL/6 проводили две внутримышечные иммунизации, интервал между которыми составлял 28 дней, трехвалентной вакциной, содержащей по 5 мкг каждого из рекомбинантных белков gD2, UL19ud (смотрите SEQ ID

NO:12) и UL25 в комбинации с 5 мкг GLA-SE или 5% декстрозным наполнителем. Мыши, иммунизированные при помощи 5 мкг одного GLA-SE, служили отрицательным контролем. Дополнительная контрольная группа состояла из мышей, иммунизированных 5 мкг GLA-SE и 1 миллиграммом на мл ацикловира (АЦВ) в питьевой воде, начиная с 24 часов после заражения. Через двадцать два дня после второй иммунизации мышей обрабатывали депо-медроксипрогестерона ацетатом, а затем, шестью днями позже, внутривагинально вводили дозу 50xLD<sub>50</sub> ВПГ-2 дикого типа. Ежедневно отслеживали появление поражений гениталий и выживаемость мышей. Влагилищные мазки брали на 1, 3 и 5 дни после инфицирования для количественной оценки ДНК ВПГ-2 при помощи ПЦР.

Как показано на Фигуре 15, для мышей, иммунизированных трехвалентными рекомбинантными gD2, UL19ud и UL25 с GLA-SE, наблюдали резкое снижение появления поражений (панель А) и повышенную выживаемость (панель В) по сравнению с мышами, иммунизированными одной вакциной, содержащей трехвалентный белок, или одним GLA-SE. Аналогично, как показано на Фигуре 16, 7 из 10 мышей, иммунизированных gD2/UL19ud/UL25 с GLA-SE, не обнаруживали детектируемой вагинальной ДНК ВПГ-2 на 5 день, в то время как мыши из всех трех контрольных групп демонстрировали устойчивые уровни ВПГ-2 во влагалище через 5 дней. Животные, которые получали ацикловир, также демонстрировали высокую вирусную нагрузку ДНК ВПГ-2 на 1, 3 и 5 дни. Животные, которые получали активную вакцину, содержащую GLA/SE плюс gD2/UL19ud/UL25, демонстрировали намного более низкую вирусную нагрузку, при этом на 5 день многие животные были стерильными (т.е., не демонстрировали детектируемой вирусной нагрузки).

Таким образом, эти эксперименты демонстрируют *in vivo* защитную эффективность вакцины, содержащей GLA/SE и рекомбинантный трехвалентный белок gD2/UL19ud/UL25, против летального заражения вирулентным ВПГ-2.

#### ПРИМЕР 14

### БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

**[00398]** Безопасность и иммуногенность вышеописанных иммуногенов, смешанных с GLA-SE или одним SE, можно протестировать в рамках клинических исследований фазы 1A/1B на серонегативных к ВПГ-2 субъектах (объектах для профилактической вакцины) и серопозитивных к ВПГ-2 субъектах (объектах для иммунотерапевтической вакцины). Дизайном исследования можно выбрать тот, который был установлен HIV Vaccine Trials Network (HVTN) и за последние 10 лет применялся в 40 случаях исследований фазы 1A на

человеке в отношении вакцин против ВИЧ-1.

**[00399]** Дизайн исследований фазы 1А включает стандартизированный формат из 12 субъектов на группу (10 вакцинированных, 2 – плацебо) и основан на способности определения серьезных побочных эффектов при распространенности в 15%. Определение также проводят для вакцин, не являющихся иммуногенными ( $y < 2$  из 10 субъектов развивается иммунитет). В исследованиях фазы 1А, проводимых в отношении ВПГ-2, субъектам проводят 3 в/м иммунизации 1 мкг или 2,5 мкг GLA-SE с 4-недельными интервалами. Всего в исследованиях фазы 1А иммунизируют 48 серонегативных к ВПГ и серопозитивных к ВПГ-2 субъектов (серопозитивных к ВПГ-1 или серонегативных к ВПГ-1).

**[00400]** Серонегативных к ВПГ-2 субъектов определяют при помощи вестерн-блоттинга на 0 день. Дополнительно к оценке безопасности у субъектов во время исследований могут отслеживать возможный индуцированный вакциной специфический к ВПГ-2 гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также частоту появления генитальных язв (только для серопозитивных к ВПГ-2 субъектов). Для инфицированной ВПГ-2 популяции можно использовать две временные точки до вакцинации для установления антител к gD2. Клеточный иммунитет к рекомбинантным белкам ВПГ-2 можно оценить при помощи методов анализа IFN- $\gamma$  ELISPOT и ВОЦ, а gD2-специфический гуморальный иммунитет – при помощи ELISA и анализа нейтрализующих антител.

**[00401]** Из вышеизложенного понятно, что хотя в иллюстративных целях в данном документе были описаны определенные варианты реализации изобретения, в них можно вносить различные модификации, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, изобретение не ограничивается ничем за исключением прилагающейся формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Иммуногенный фрагмент полипептида ВПГ-2, выбранный из группы, состоящей из:

(а) иммуногенного фрагмента полипептида UL19, в котором отсутствует по меньшей мере 75% аминокислот 1-450 из SEQ ID NO: 4 и по меньшей мере 75% аминокислот 1055-1374 из SEQ ID NO: 4;

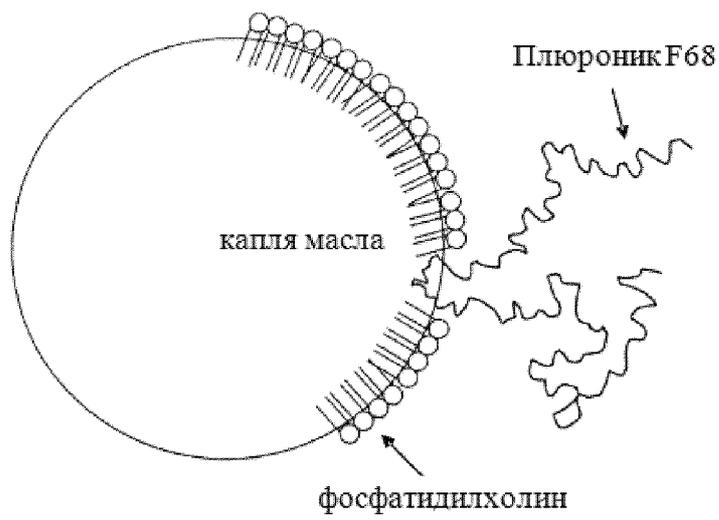
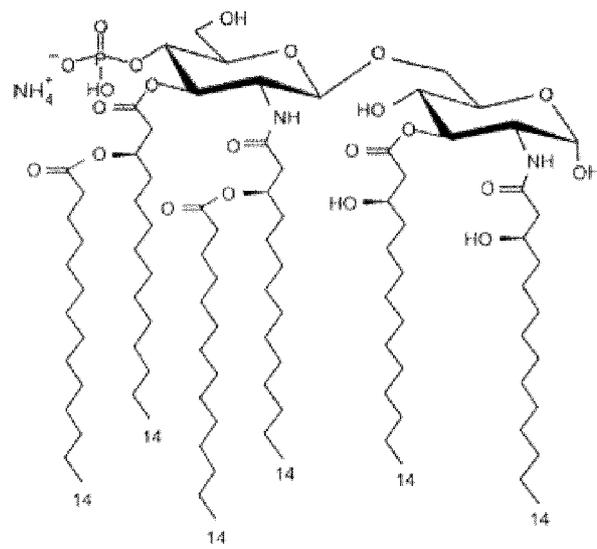
(b) последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12;

(с) иммуногенного варианта (а) или (b), который сохраняет по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности на участке из по меньшей мере 15 последовательных аминокислот;

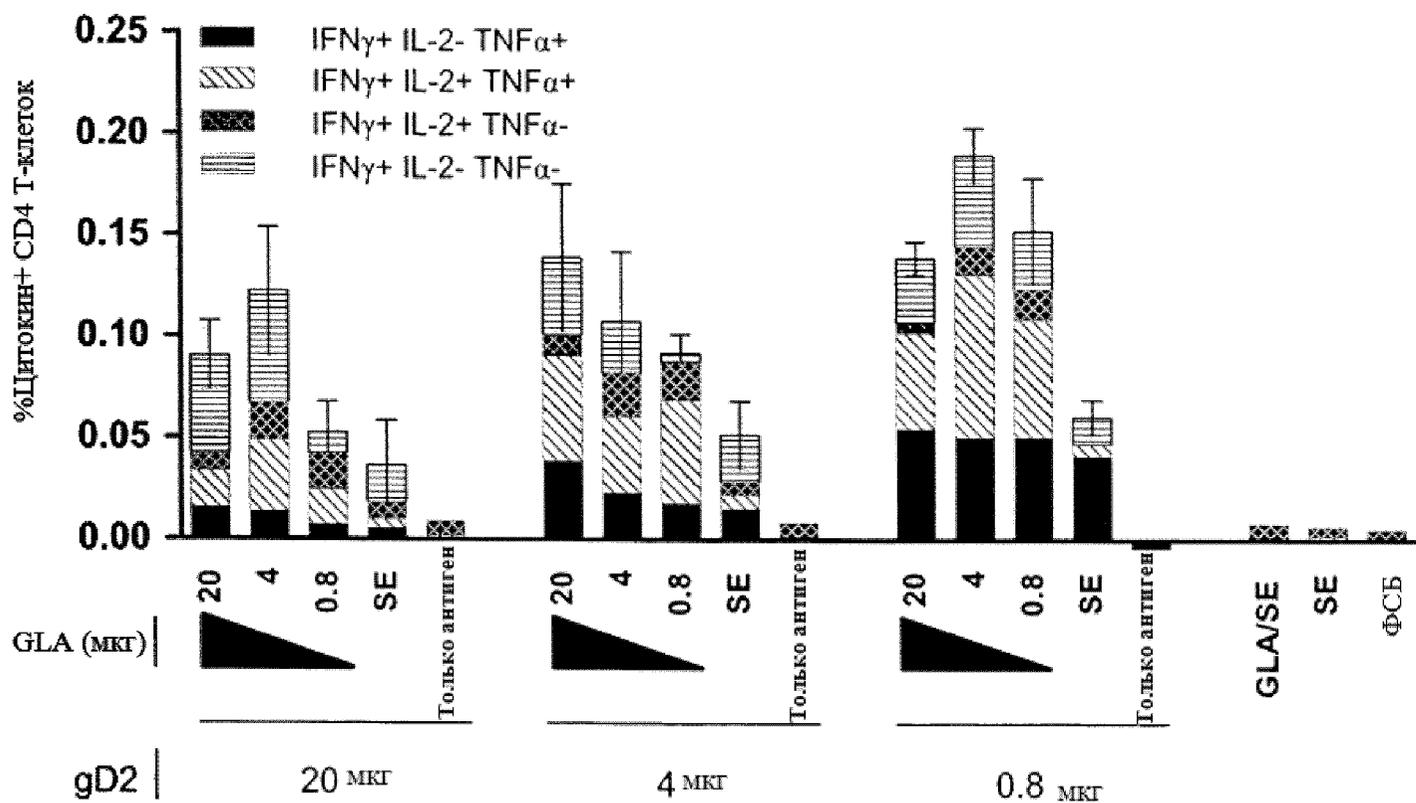
(d) иммуногенного фрагмента (а) или (b); и

(e) химерного продукта слияния (а), (b), (с) или (d).

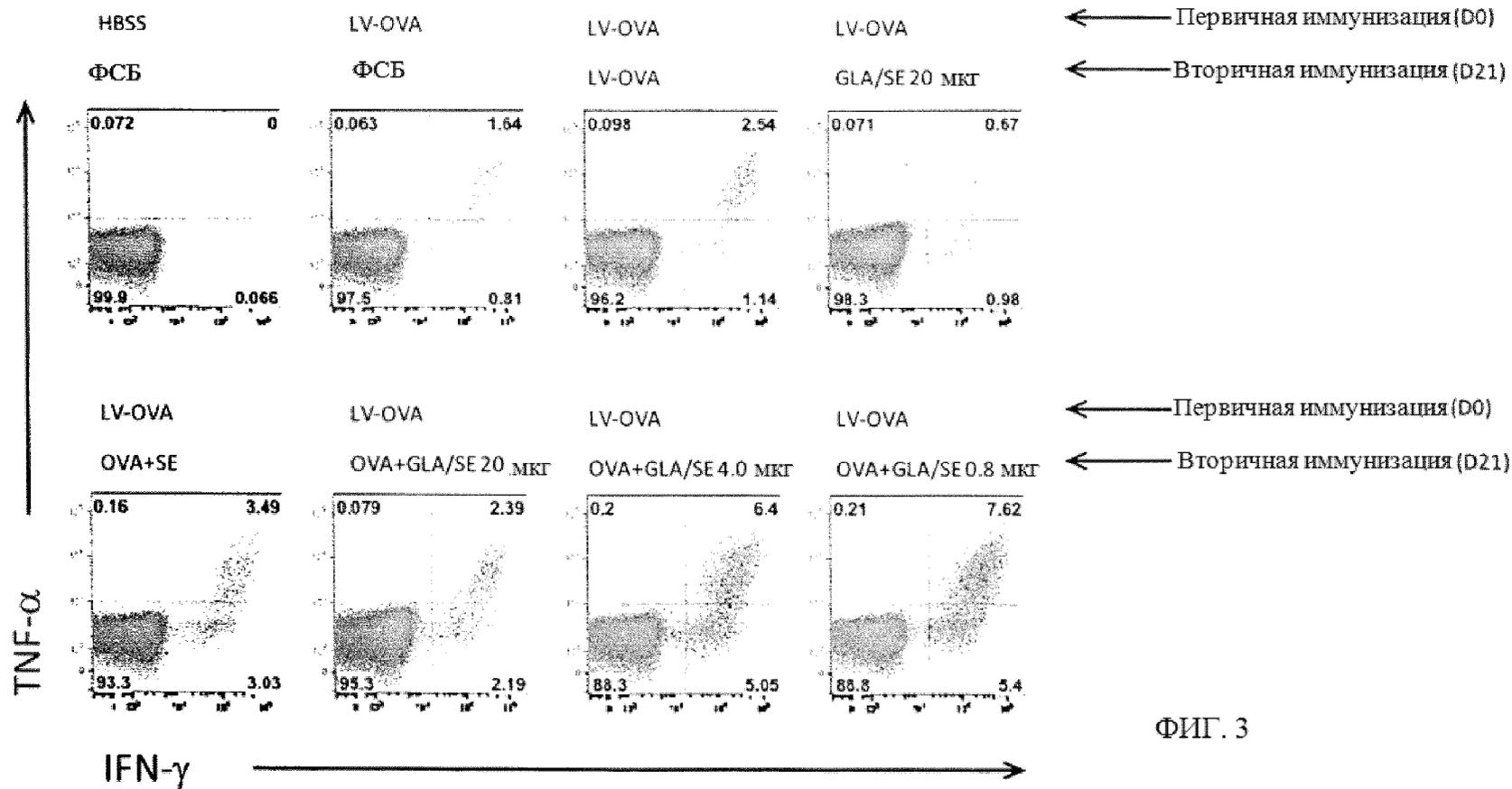
По доверенности



ФИГ. 1

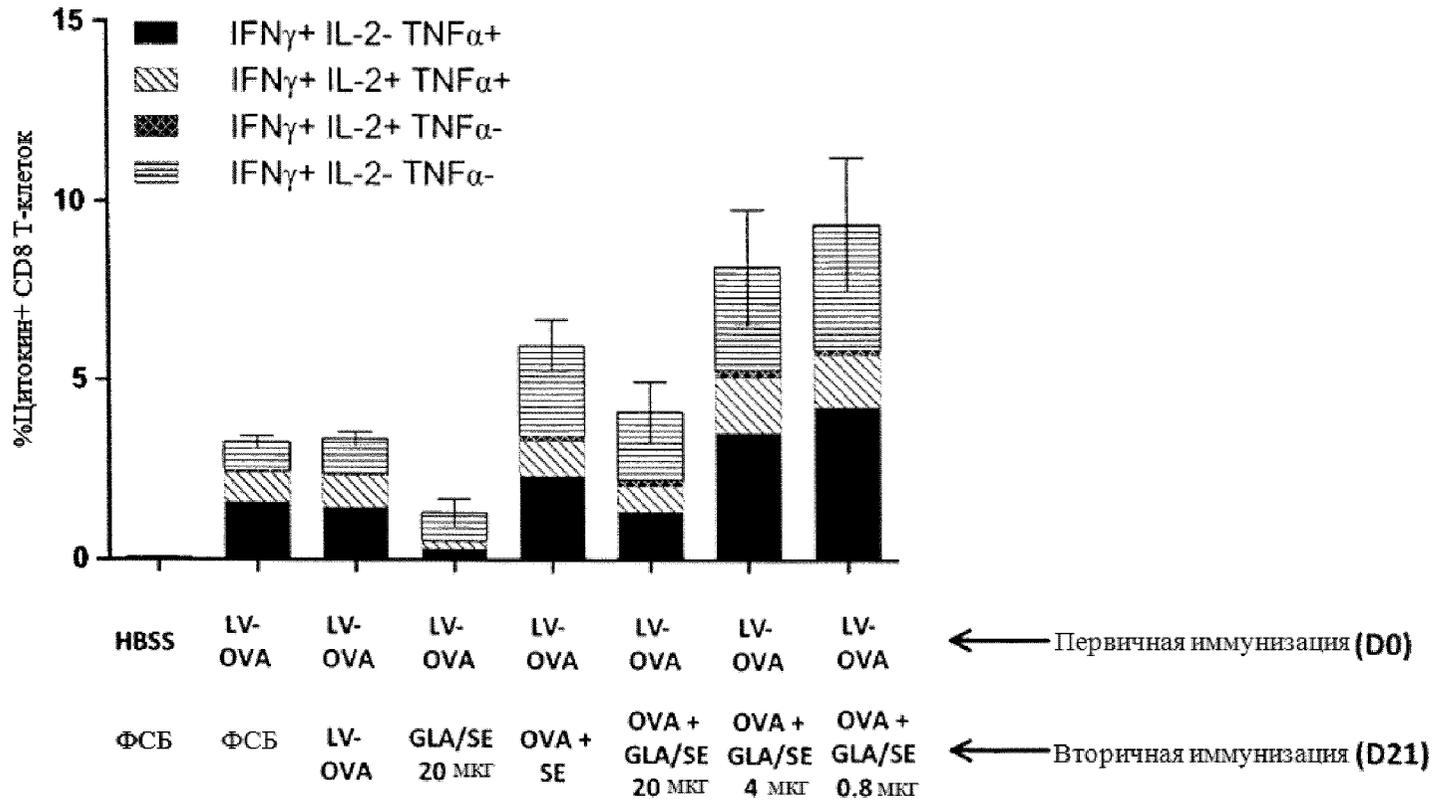


ФИГ. 2

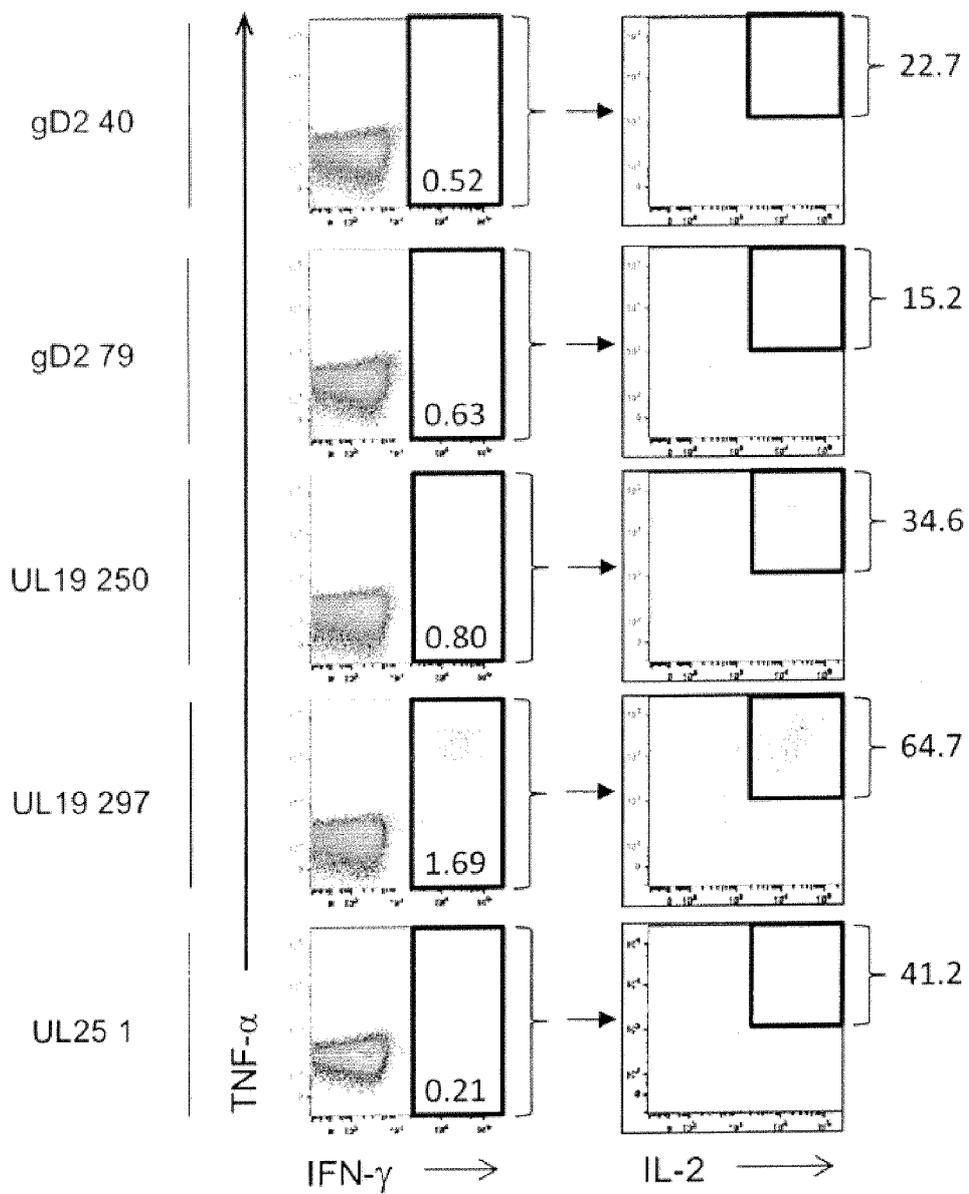


ФИГ. 3

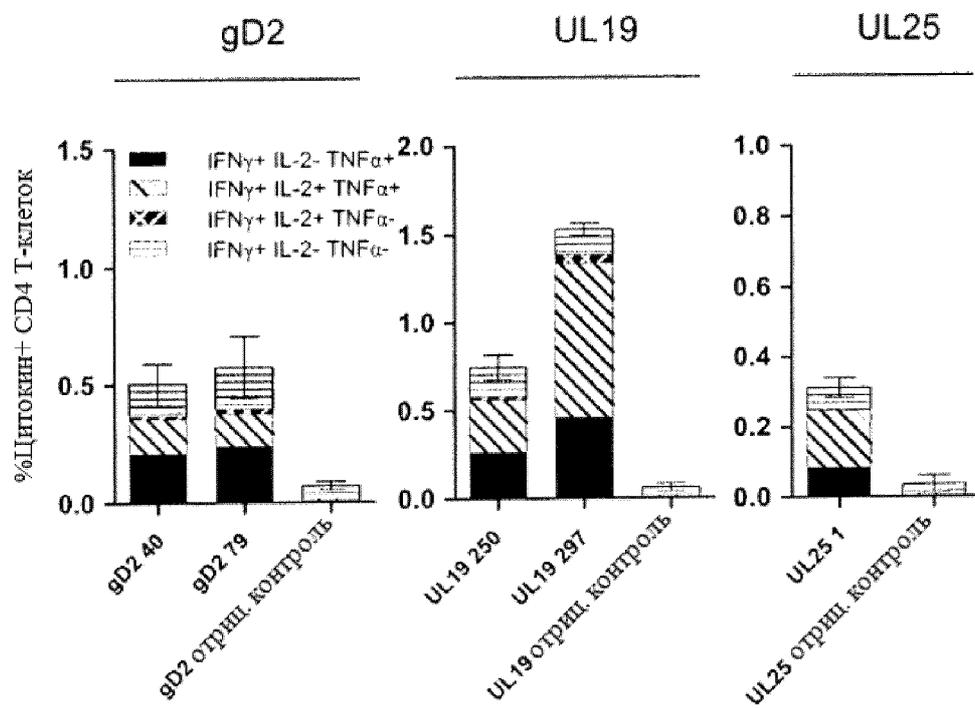
### OVA 257



ФИГ. 4

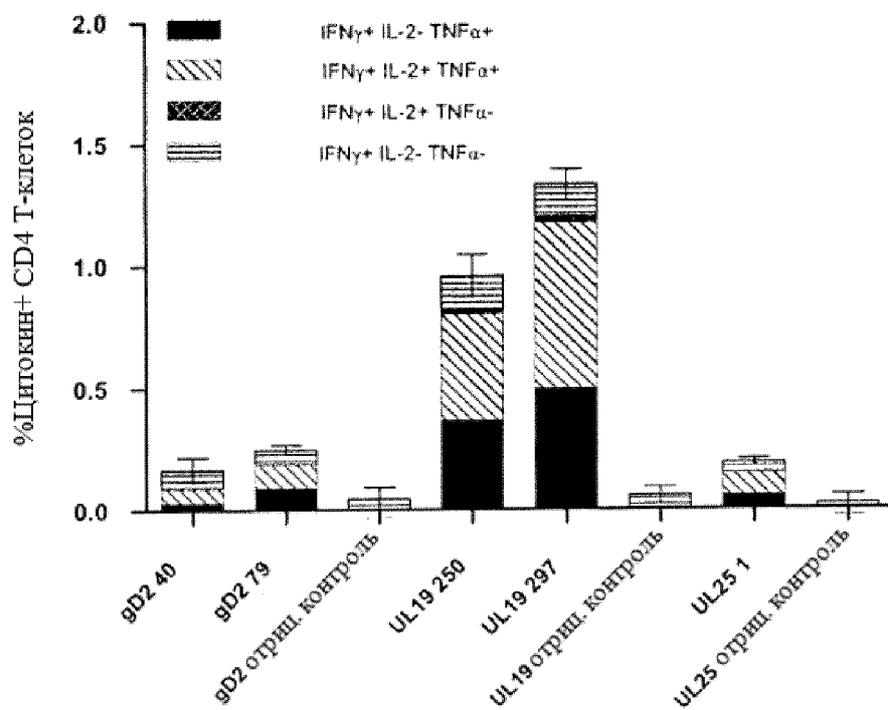


ФИГ. 5А



15 – мер пептид

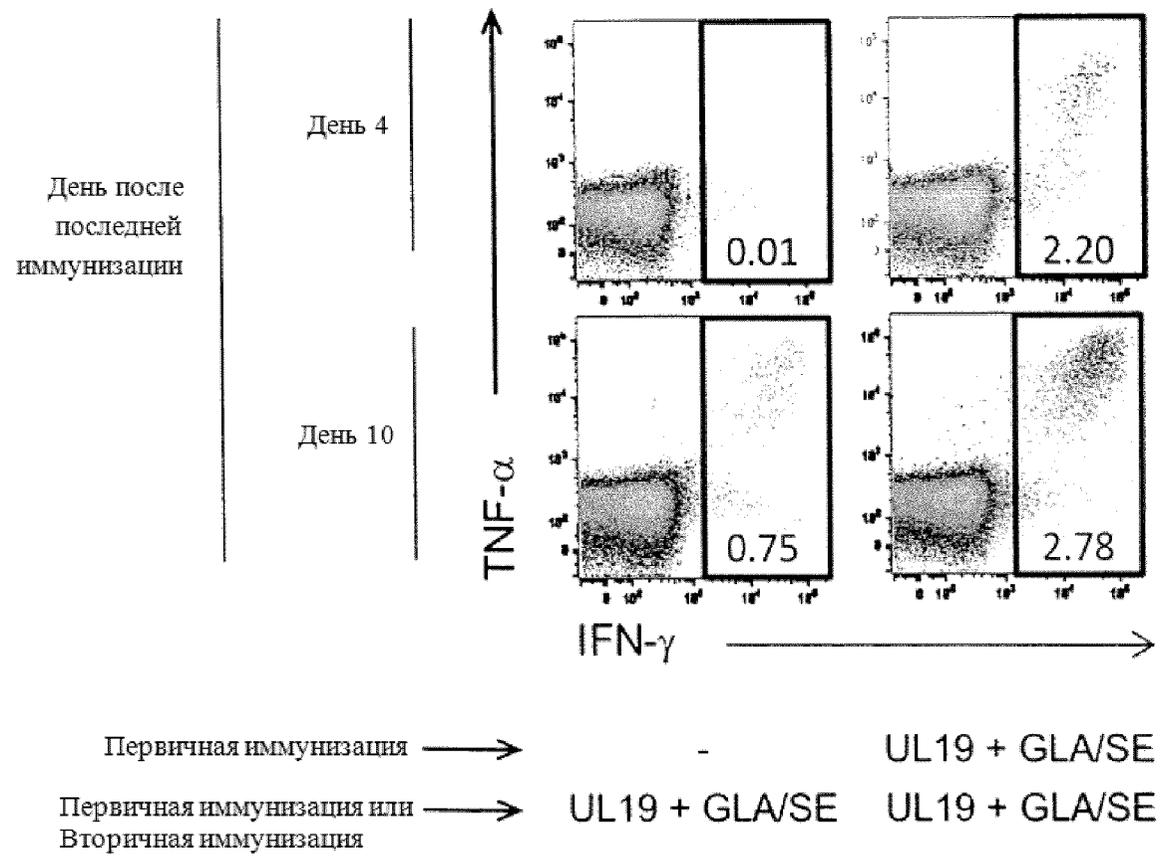
ФИГ. 5В



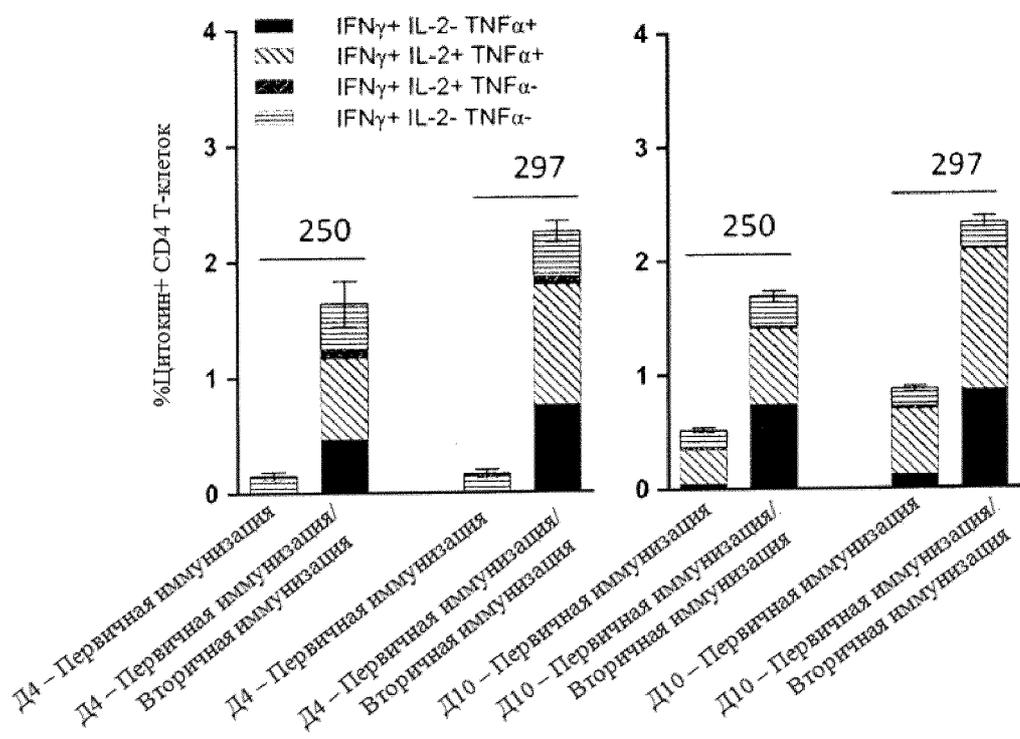
15 – мер пептид

ФИГ. 6А





ФИГ. 7А

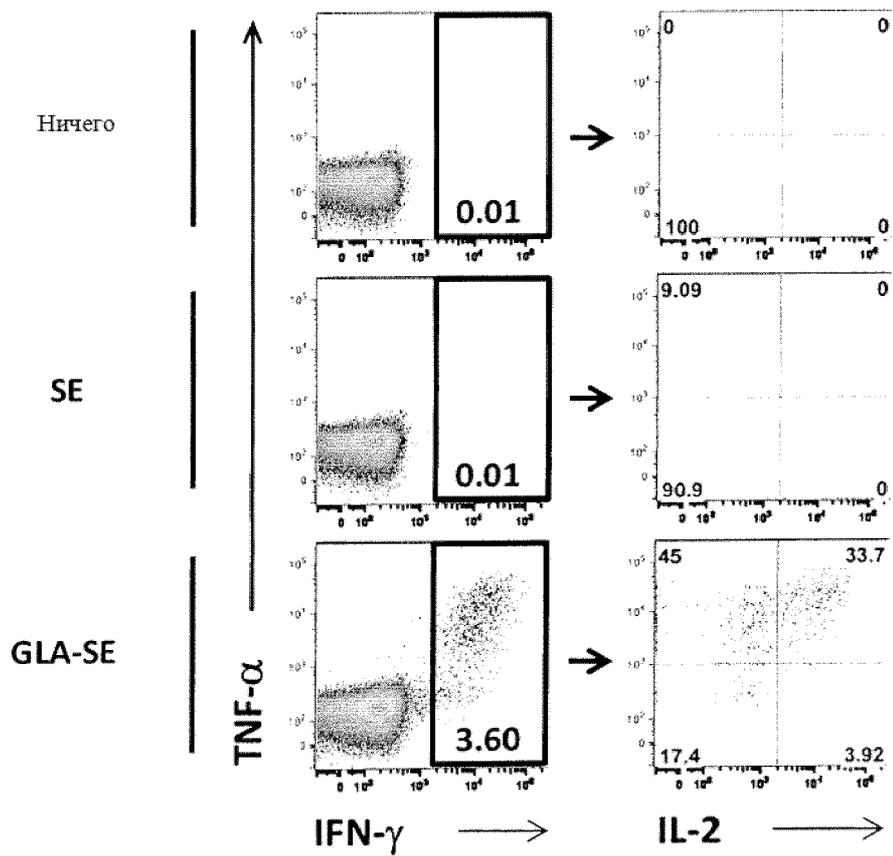


ФИГ. 7В

Первичная иммунизация/Вторичная иммунизация

Адьювант

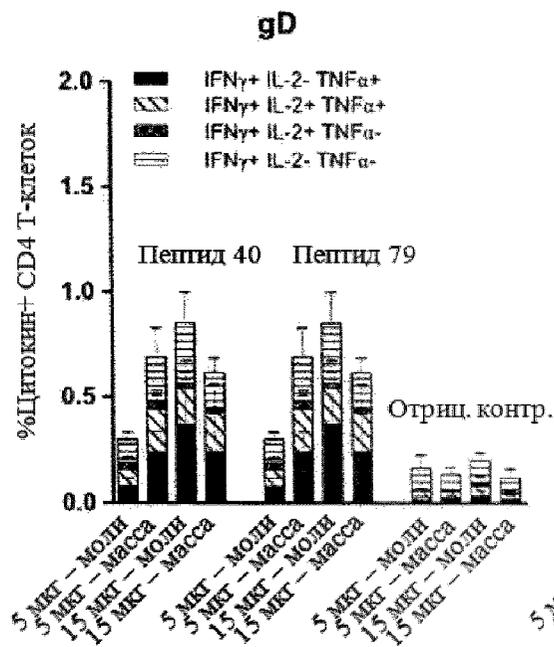
Эпитоп #2 UL19 CD4 Т-клетки



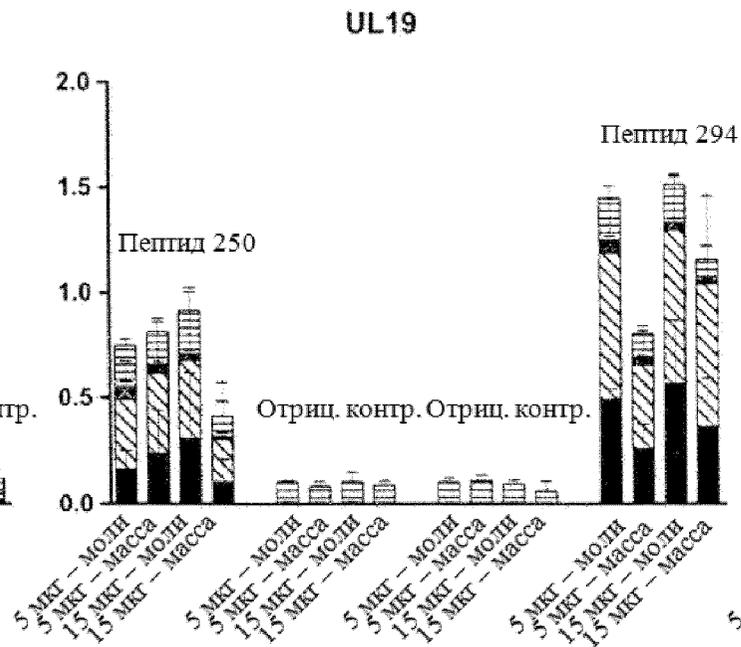
ФИГ. 8А



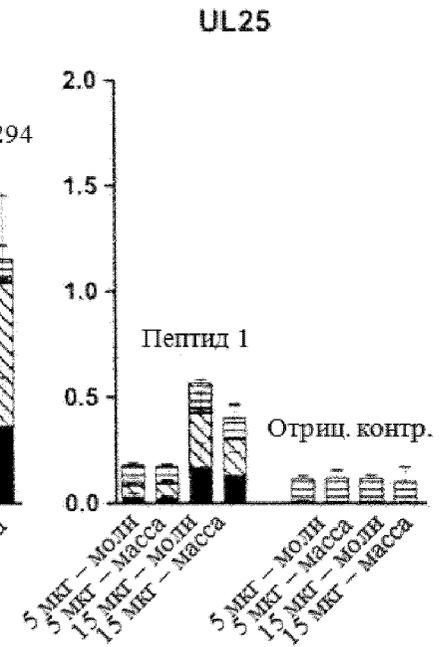
ФИГ. 8В



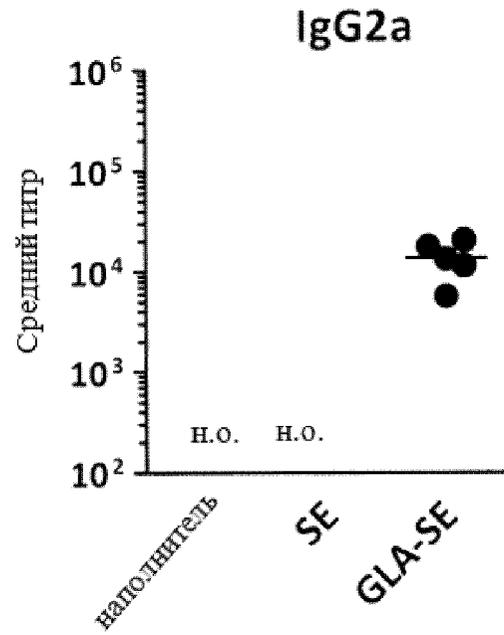
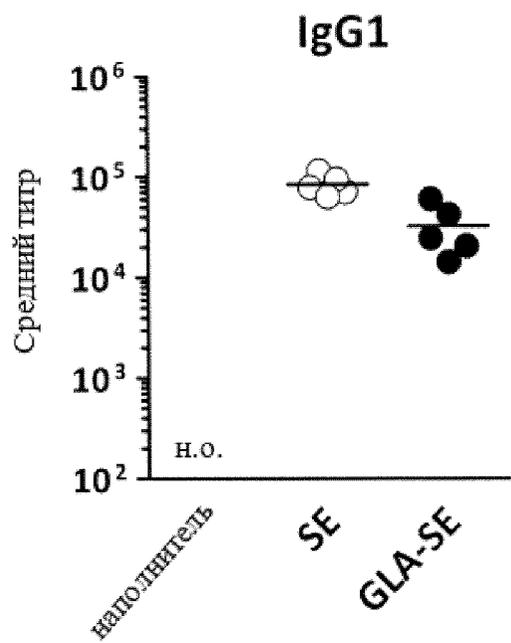
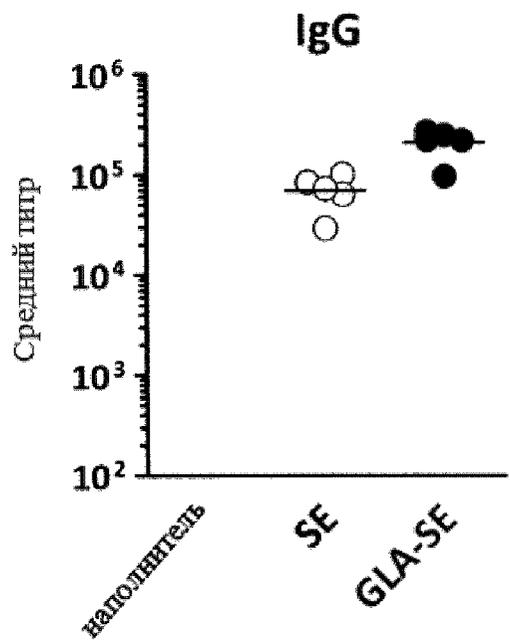
ФИГ. 9А

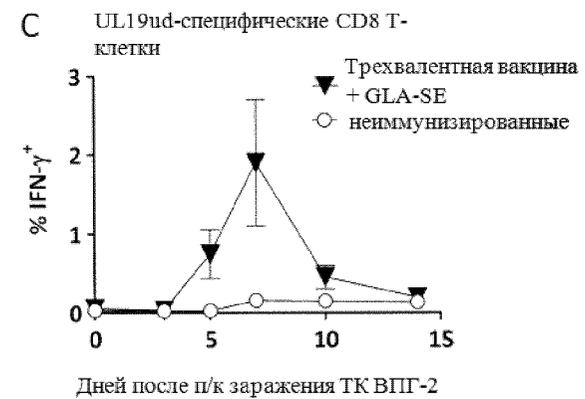
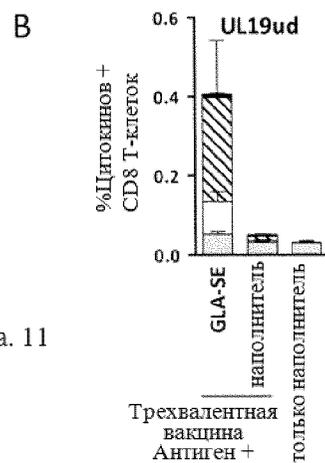
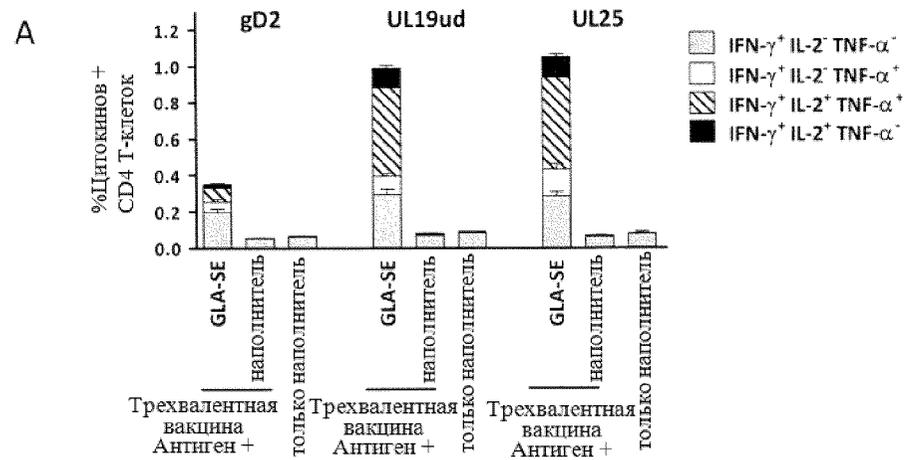


ФИГ. 9В

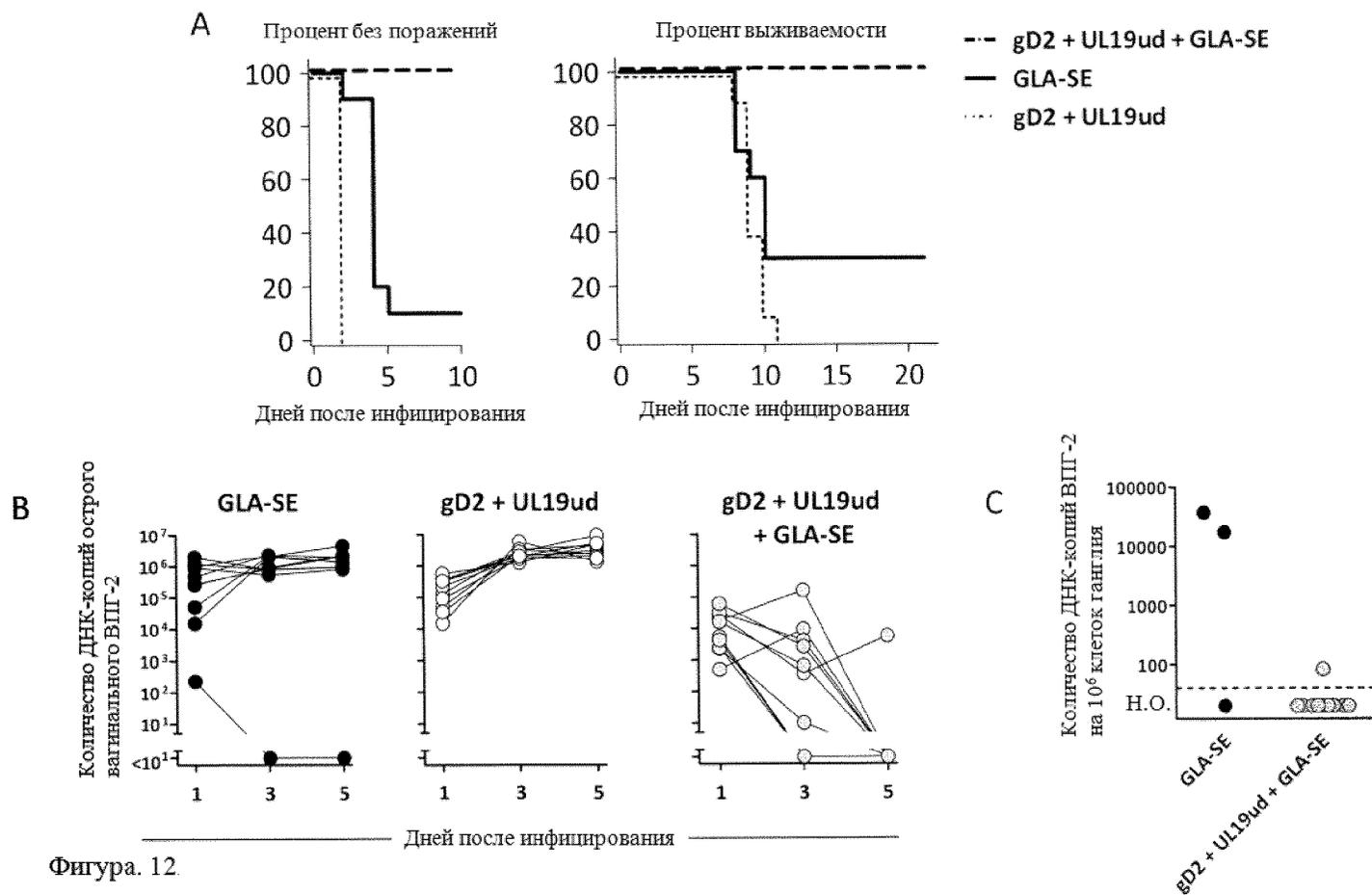


ФИГ. 9С



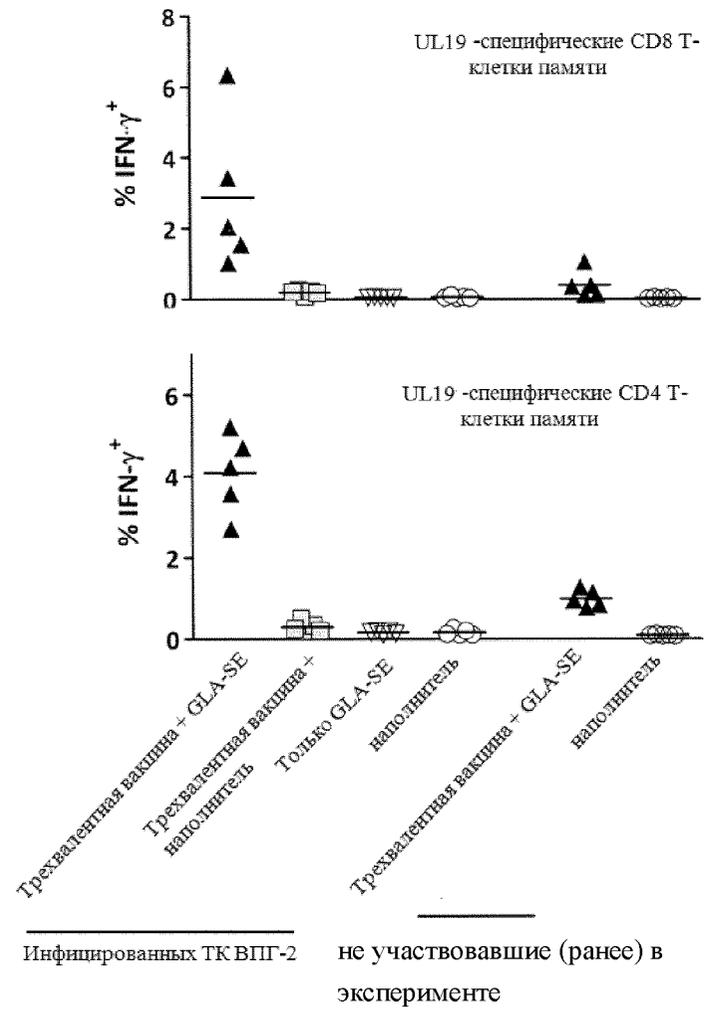


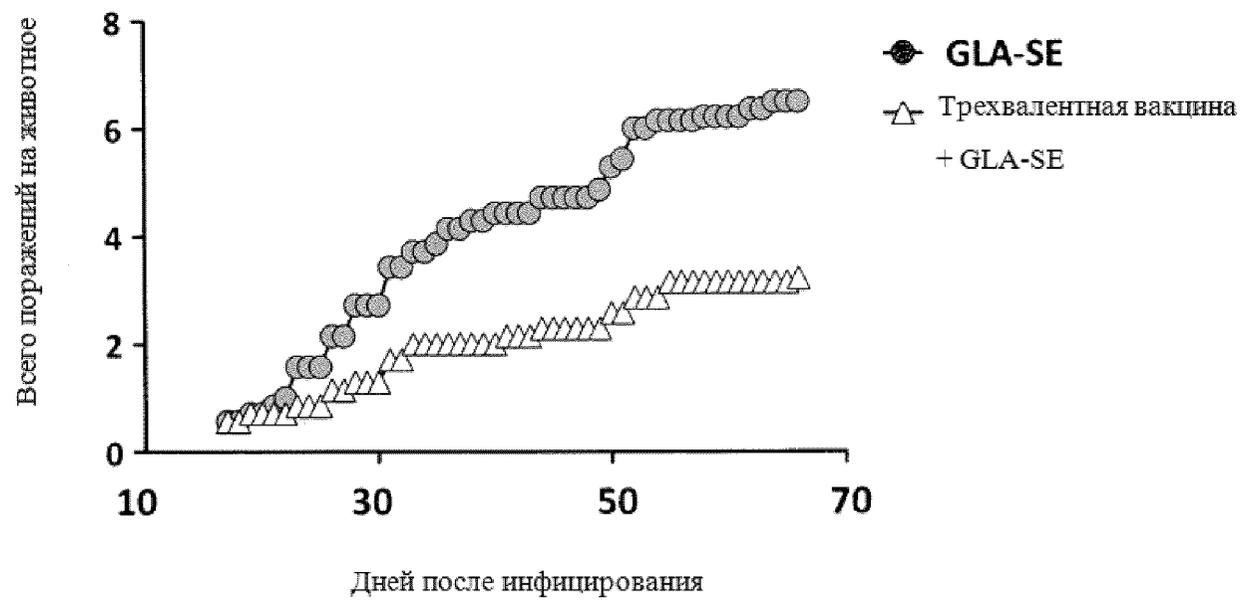
Фигура. 11



Фигура. 12

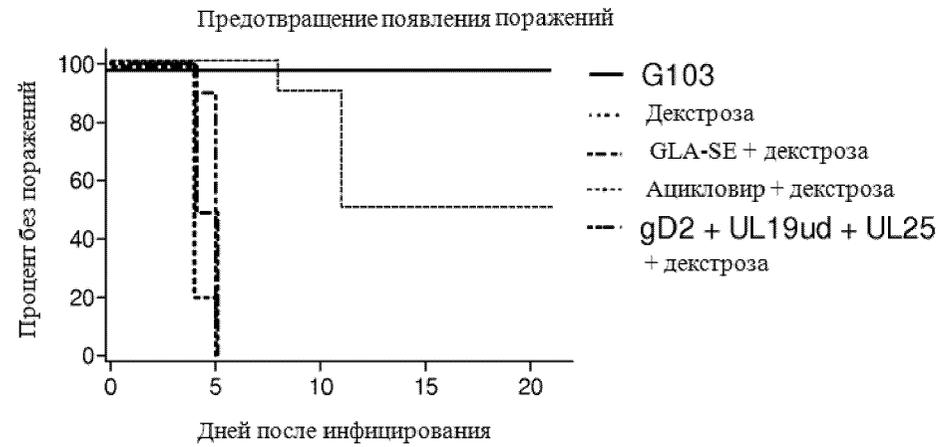
Фигура. 13



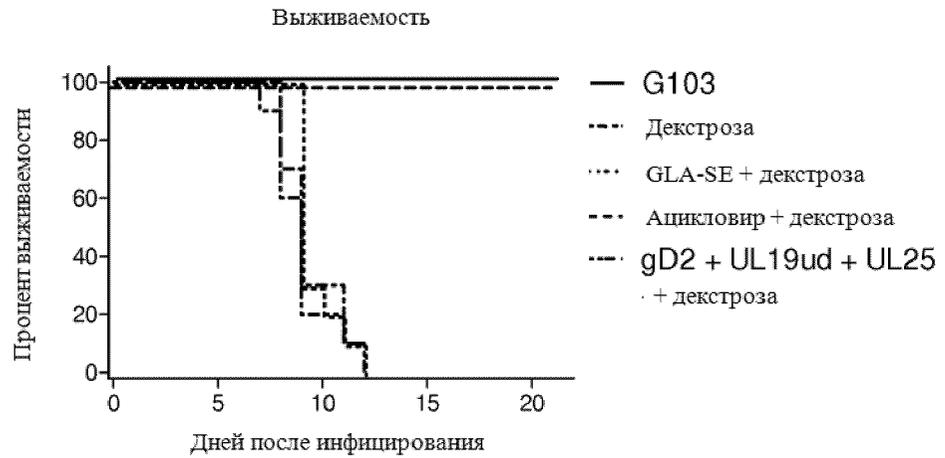


Фигура. 14

A

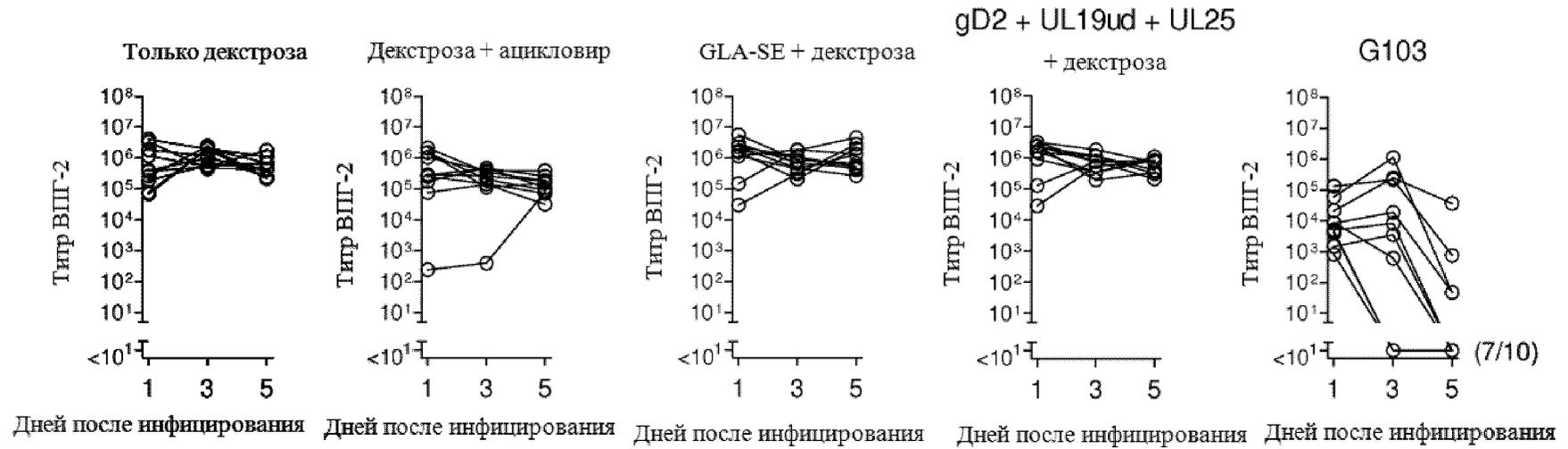


B



Фигура. 15.

Острые вагинальные вирусные титры



Фигура. 16