

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091177** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.08

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.14

(54) КОМПОЗИЦИИ И СХЕМА ИММУНИЗАЦИИ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

(31) 1721069.1

(72) Изобретатель:

(32) 2017.12.15

Аммендола Вирджиния (IT), Баят

(33) GB

Бабак, Лорин Кларисс, Вассилев

(86) PCT/EP2018/085086

Венцислав Божидаров (BE), Вителли

(87) WO 2019/115817 2019.06.20

Алессандра (IT)

(88) 2019.08.08

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям и их комбинациям, которые могут найти применение в схемах иммунизации для лечения хронического гепатита В. Иммуногенная композиция содержит вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотиды, кодирующие HBs, HBc, инвариантную цепь человека (hIi), слитую с HBc. Другая иммуногенная композиция содержит вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc. Другая иммуногенная композиция содержит рекомбинантный HBs, усеченный на С-конце рекомбинантный HBc и адьювант, содержащий MPL и QS-21.

202091177

A1

A1

202091177

РСТ/ЕР2018/085086

КОМПОЗИЦИИ И СХЕМА ИММУНИЗАЦИИ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к новым композициям, которые могут найти применение в схемах иммунизации для лечения хронического гепатита В.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Инфекция вируса гепатита В (HBV) является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Во всем мире HBV инфицированы примерно 257 миллионов человек [ВОЗ, 2017]. Клиническое течение и исход инфекции HBV в значительной степени определяются возрастом заражения и сложным взаимодействием между вирусом и иммунным ответом хозяина [Ott, 2012; Maini, 2016]. Таким образом, при контакте с HBV может развиваться острый гепатит, который разрешается самопроизвольно или может прогрессировать в различные формы хронической инфекции, включая состояние неактивного носительства поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), хронический гепатит, цирроз и гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) [Liaw, 2009]. Распространенность HBsAg среди взрослого населения составляет более 2%, с показателями 5-8% в Юго-Восточной Азии и Китае и более 8% в Африканском регионе. У 15-40% людей с хроническим инфекционным гепатитом В (определяемым как сывороточный HBsAg, обнаруживаемый в течение более 6 месяцев) развиваются осложнения со стороны печени, из которых основными осложнениями являются цирроз печени (ЦП), декомпенсация печени и ГЦК.

Хотя внедрение универсальной профилактической иммунизации против гепатита В у младенцев было очень эффективным в снижении заболеваемости и распространенности гепатита В во многих эндемичных странах, оно еще не привело к значительному снижению распространенности хронической инфекции гепатита В (ХГВ) среди подростков и взрослых, и не ожидается, что она повлияет на смертность, связанную с HBV, пока не пройдет несколько десятилетий после ее внедрения. В 2015 году от гепатита В умерло 887 000 человек, главным образом от цирроза печени и ГЦК [ВОЗ, 2017].

Клиническое ведение хронического гепатита В направлено на улучшение выживаемости и качества жизни путем предотвращения прогрессирования заболевания и, следовательно, развития ГЦК [Liaw, 2013]. Современная стратегия лечения в основном

базируется на длительном подавлении репликации ДНК вируса гепатита В для достижения стабилизации HBV-индуцированного заболевания печени и предотвращения прогрессирования. Уровень ДНК HBV в сыворотке крови является ключевой конечной точкой всех современных методов лечения. Достижение потери (детектируемого) антигена гепатита В (HBeAg) является еще одним ценным биомаркером, однако оптимальной конечной точкой, представляющей «функциональное излечение», обычно считается потеря HBsAg с сероконверсией анти-HBs или без нее, поскольку она указывает на глубокое подавление репликации HBV и экспрессии вирусного белка [Block, 2017; Cornberg, 2017]. В настоящее время существует два основных варианта лечения пациентов с ХГВ: либо пегилированным интерфероном альфа (PegIFNa), либо аналогами нуклеотидов (нуклеозидов) (АН) [EASL, 2017]. PegIFNa, нацеленный на индукцию долгосрочного иммунного контроля при конечной продолжительности лечения, может обеспечить устойчивый контроль без лечения, однако длительный вирусологический ответ и потеря поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) наблюдаются лишь у небольшой части пациентов. Кроме того, из-за плохой переносимости и проблем с безопасностью при длительном применении этот вид лечения не подходит значительному количеству пациентов.

АН действуют путем подавления репликации ДНК путем ингибирования обратотранскриптазной активности полимеразы HBV. АН, одобренные в Европе для лечения HBV, включают энтекавир (ETV), тенофовир дизопроксилфумарат (TDF) и тенофовир алафенамид (TAF), которые характеризуются высоким барьером к устойчивости HBV, а также ламивудин (LAM), адефовир дипивоксил (ADV) и телбивудин (TBV), которые характеризуются низким барьером к устойчивости HBV. Основным преимуществом лечения сильнодействующим АН с высоким барьером к устойчивости является его предсказуемая высокая долгосрочная противовирусная эффективность, приводящая к подавлению ДНК HBV у подавляющего большинства приверженных к терапии пациентов, а также благоприятный профиль безопасности. Недостатком лечения АН является его длительный терапевтический режим, поскольку АН обычно не позволяет достичь эрадикации HBV, а прекращение приема АН может привести к рецидиву HBV [Kranidioti, 2015]. Потеря HBsAg, представляющая собой функциональное излечение, теперь считается золотым стандартом конечной точки при лечении ХГВ [Block, 2017; Cornberg, 2017], что, однако, редко достигается при лечении АН [Zoutendijk, 2011].

Из-за низкого уровня сероклиренса HBsAg [Zoutendijk, 2011] и высокого риска вирусного рецидива без АН [Kranidioti, 2015] большинство пациентов получают

длительную или даже пожизненную терапию АН, которая может быть связана со снижением приверженности пациента к терапии, увеличением финансовых затрат и повышенным риском токсичности лекарства и возникновением мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости при длительном воздействии [Terrault, 2015]. Поэтому необходима новая стратегия в дополнение к терапии АН для достижения «функционального излечения» при конечной длительности применения.

Новые стратегии лечения, которые в настоящее время изучают, включают новые противовирусные стратегии, а также новые иммунотерапевтические стратегии, которые усиливают специфический HBV-адаптивный иммунный ответ или активируют врожденный внутрипеченочный иммунитет [Durantel, 2016]. До сих пор эффективность ни одно из этих экспериментальных методов лечения не была доказана. Среди исследуемых стратегий вакцинации ни одна не позволила индуцировать устойчивый полифункциональный CD8⁺ Т-клеточный ответ на коровый антиген HBV (HBcAg), который имеет ключевое значение для восстановления иммунного контроля над вирусом [Lau, 2002; Li, 2011; Liang, 2011; Bertoletti, 2012; Boni, 2012]. Предварительными результатами первоначальных попыток создания рекомбинантных вакцин на основе поверхностного антигена и/или PreS антигена HBV была индукция гуморального ответа без HBV-специфического CD8⁺ Т-клеточного ответа и без улучшения клинических или вирусологических показателей [Jung, 2002; Vandepapelière, 2007]. ДНК-вакцина, экспрессирующая белок оболочки HBV, не восстанавливала Т-клеточный ответ, специфичный в отношении HBsAg и HBcAg, и таким образом, не снижала риск рецидива у пациентов после отмены АН [Fontaine, 2015]. При использовании новых систем доставки ДНК-вакцина (прайм-вакцина) и векторная вакцина на основе вируса MVA (бустерная вакцина), кодирующая S, preS1/S2, не продемонстрировали индукции Т-клеток или снижения виремии, что свидетельствует о том, что только PreS антигена и поверхностного антигена HBV недостаточно для лечения пациентов [Cavenaugh, 2011]. Позднее были исследованы вакцинные стратегии, нацеленные на множество антигенов HBV, и новые системы доставки. Рекомбинантная вакцина HBsAg/HBcAg привела к снижению вирусной нагрузки до очень низкого уровня (т.е. приблизительно 50 МЕ/мл) только у половины пациентов [Al-Mahtab, 2013]. ДНК-вакцина, кодирующая белки S, preS1/S2, коровый белок, полимеразу и белок X с добавленным в качестве адъюванта методом генной инженерии IL-12 вместе с ламивудином, индуцировала мультиспецифический Т-клеточный ответ и снижение вирусной нагрузки более 2 log₁₀ у половины пациентов. Однако изменений при количественном определении HBsAg, потери

HBsAg или сероконверсии HBsAg ни у одного пациента не наблюдалось [Yang, 2012]. Вакцина GS-4774, Т-клеточная вакцина на основе дрожжей, экспрессирующая большой белок S, коровый белок и белок X HBV, не обеспечивала значительного снижения HBsAg у пациентов с ХГВ с подавленным вирусом [Lok, 2016].

Сохраняется неудовлетворенная потребность в лечении, которое может элиминировать HBsAg, чтобы позволить пациентам безопасно прекратить терапию АН без вирусологического или клинического рецидива.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложена иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческую инвариантную цепь (hIi), слитую с HBc. Композиция может найти применение в способе лечения хронического гепатита В путем введения композиции по схеме прайм-буст по меньшей мере с одной другой иммуногенной композицией.

В следующем аспекте предложена иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающего полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc). Композиция может найти применение в способе лечения хронического гепатита В путем введения композиции по схеме прайм-буст по меньшей мере с одной другой иммуногенной композицией.

В дополнительном аспекте предложена иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) с усеченным С-концом и адъювант, содержащий MPL (3D-монофосфориллипид А) и QS-21 (тритерпеновый гликозид, выделенный из коры *Quillaja saponaria*). Композиция может найти применение в способе лечения хронического гепатита В путем введения композиции по схеме прайм-буст с по меньшей мере одной другой иммуногенной композицией.

В следующем аспекте предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), включающий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

с) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант.

Иммуногенная комбинация может найти применение в способе лечения хронического гепатита В (ХГВ) путем введения композиций по схеме прайм-буст.

Иммуногенная комбинация может найти применение в способе лечения ХГВ у человека путем введения композиций последовательно или одновременно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 - HBc-специфический (А) и HBs-специфический (В) CD8⁺ Т-клеточный ответ через 14 дней после первичной иммунизации ChAd155-HBV (с hIi и без) и через 7 дней после бустерной иммунизации MVA-HBV (показаны значения у отдельных животных и медианное значение).

Фиг. 2 - HBc-специфические гуморальные ответы через 14 дней после первичной иммунизации ChAd155-HBV (с hIi и без) и через 7 дней после бустерной иммунизации MVA-HBV (показаны титры у отдельных животных и средние геометрические значения титров (GMT))

Фиг. 3 - HBc и HBs-специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы через 7 дней после третьего введения NaCl, HBc, HBs или HBc-HBs в 50 мкл AS01_{B-4} (показаны значения для пулов 5 животных/группу и медианные значения)

Фиг. 4 - HBs-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ через 7 дней после третьего введения NaCl, HBc, HBs или HBc-HBs в 50 мкл AS01_{B-4} (показаны значения для пулов 5 животных/группу и медианные значения)

Фиг. 5 - Гуморальные ответы против HBc и против HBs через 14 дней после третьего введения NaCl, HBc, HBs или HBc-HBs в 50 мкл AS01_{B-4} (показаны значения у отдельных животных, а также средние геометрические значения и 95% ДИ)

Фиг. 6 - HBs- (А) и HBc- (В) специфические CD4⁺ и HBs-специфические CD8⁺ (С) Т-клеточные ответы через 7 дней после третьего введения NaCl, HBc-HBs, HBc-HBs с добавлением гидроксида алюминия, HBc-HBs плюс AS01_{B-4} или HBc-HBs плюс AS01_{E-4} (показаны значения для пулов 5 животных/группу и медианные значения)

Фиг. 7 - HBs- (А) и HBc- (В) специфические гуморальные ответы через 14 дней после третьего введения NaCl, HBc-HBs, HBc-HBs с добавлением гидроксида алюминия,

HBs-НВs плюс AS01_{B-4} или HBs-НВs плюс AS01_{E-4} (показаны значения у отдельных животных, а также средние геометрические значения и 95% ДИ)

Фиг. 8 - HBs- (А) и НВs- (В) специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы через 7 дней после второго и четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 9 - HBs- (А) или НВs- (В) специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы через 7 дней после второго и четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 10 - HBs- и НВs-специфические CD4⁺ (А) и CD8⁺ (В) Т-клетки в инфильтрирующих печень лимфоцитах через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения в пулах из 3 или 4 животных и медианные значения)

Фиг. 11 - HBs-специфический (А) и НВs-специфический (В) гуморальный ответ после вакцинации по схеме прайм-буст (показаны значения у отдельных животных и средние геометрические значения).

Фиг. 12 - mIi-, HBs- и НВs-специфические ответы в анализе IFN γ методом ELISpot через 2 недели после первой и второй инъекций PBS или вектора ChAd155-mIi-HBV (10^9 вирусных частиц)

Фиг. 13 - гуморальные ответы против mIi (ELISA), вызванные 2 введениями ChAd155-mIi-HBV (10^9 вирусных частиц) у мышей СВ6F1 через 2 недели после первой и второй инъекций

Фиг. 14 - HBs-специфические CD8⁺ Т-клетки селезенки (А) или печени (В) через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 15 - HBs-специфические CD4⁺ Т-клетки селезенки (А) или печени (В) через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 16 - HBs-специфические CD8⁺ Т-клетки селезенки (А) или печени (В) через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 17 - HBs-специфические CD4⁺ Т-клетки селезенки (А) или печени (В) через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

Фиг. 18 – ответы в виде HBs- (А) и HBs- (В) связывающих антител в Дни 23, 65 и 93 (до введения, через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков)

Фиг. 19 – уровни АСТ (А) и АЛТ (В), измеренные в сыворотке мышей (группы 1, 2, 3 и 4) в Дни 38, 65 и 93 (через 7 дней после первого, второго и после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков в группах 1, 2, 3) или в день 93 (в группе 4)

Фиг. 20 - уровни HBs-антигена в сыворотке от мышей, которым делали инъекции AAV2/8-HBV, до введения, через 7 дней после второго введения и через 7 дней после четвертого введения NaCl, гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с последующим введением рекомбинантных белков или гетерологичных векторов по схеме прайм-буст с одновременным введением рекомбинантных белков

Фиг. 21 – Структура конструкции HBc-2A-HBs

Фиг. 22 – Структура конструкции hIi-HBc-2A-HBs

Фиг. 23 – процентное содержание HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток в лейкоцитах мышей СВ6F1 через 7 дней после 2-й иммунизации HBc, HBs и HBc/HBs в различных соотношениях с использованием адьюванта

Фиг. 24 – процентное содержание HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток в лейкоцитах мышей СВ6F1 через 7 дней после 3-й иммунизации HBc, HBs и HBc/HBs в различных соотношениях с использованием адьюванта

Фиг. 25 – процентное содержание HBs-специфических CD8⁺ Т-клеток в лейкоцитах мышей СВ6F1 через 7 дней после 2-й и 3-й иммунизации HBc, HBs и HBc/HBs в различных соотношениях с использованием адьюванта

Фиг. 26 – гуморальные ответы против HBc и HBs, индуцированные у мышей СВ6F1 через 14 дней после 2-й иммунизации HBc, HBs и HBc/HBs в различных соотношениях с использованием адьюванта

Фиг. 27 – гуморальные ответы против HBc и HBs, индуцированные у мышей СВ6F1 через 14 дней после 3-й иммунизации HBc, HBs и HBc/HBs в различных соотношениях с использованием адьюванта

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 аминокислотная последовательность HBs

SEQ ID NO:2 аминокислотная последовательность усеченного HBc

SEQ ID NO:3 аминокислотная последовательность спейсера, включающая область расщепления 2A вируса ящура

SEQ ID NO:4 нуклеотидная последовательность, кодирующая спейсер, включающий область расщепления 2A вируса ящура

SEQ ID NO:5 аминокислотная последовательность HBc-2A-HBs

SEQ ID NO:6 нуклеотидная последовательность, кодирующая HBc-2A-HBs

SEQ ID NO:7 аминокислотная последовательность hIi

SEQ ID NO:8 нуклеотидная последовательность, кодирующая hIi

SEQ ID NO:9 аминокислотная последовательность hIi-HBc-2A-HBs

SEQ ID NO:10 нуклеотидная последовательность, кодирующая hIi-HBc-2A-HBs

SEQ ID NO:11 аминокислотная последовательность HBc

SEQ ID NO:12 аминокислотная последовательность альтернативного варианта hIi

SEQ ID NO:13 нуклеотидная последовательность, кодирующая альтернативный вариант hIi

SEQ ID NO:14 альтернативная нуклеиновокислотная последовательность hIi-HBc-2A-HBs

SEQ ID NO:15 альтернативная аминокислотная последовательность hIi-HBc-2A-HBs

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терминология

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области. Например, определения терминов, используемых в данном документе, соответствуют описанию, приведенному в «Многоязычном глоссарии биотехнологических терминов: (рекомендации IUPAC)», под ред. Leuenberger, H.G.W, Nagel, B., Klbl, H. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland).

Во всем этом описании и в приведенной далее формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и такие варианты, как «содержит» и «содержащий», подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключая любое другое целое число или стадию или группу целых чисел или стадий.

В тексте данного описания цитируются несколько документов. Каждый из документов, процитированных в данном описании (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, включен во всей полноте путем ссылки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не может лежать в основе данного изложения ввиду предшествующего изобретения. Все определения, приведенные в данном документе в контексте одного аспекта изобретения, также применяются к другим аспектам изобретения.

Термины «белок», «полипептид» и «пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любой цепи аминокислот, связанных пептидными связями, независимо от длины, котрансляционной или посттрансляционной модификации. Слитый белок (или «химерный белок») представляет собой рекомбинантный белок, содержащий два или более чем два белка, связанных пептидными связями. Слитые белки создаются путем объединения двух или более генов, которые изначально кодируют отдельные белки. В результате трансляции этого слитого гена получают единый слитый белок. Рекомбинантный применительно к белку или полипептиду означает, что белок экспрессируется из рекомбинантного полинуклеотида.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной макромолекуле, состоящей из нуклеотидных мономеров. Соответственно, полинуклеотиды по изобретению являются рекомбинантными. Рекомбинантный означает, что полинуклеотид является продуктом по меньшей мере одной из стадий клонирования, рестрикции или лигирования или других процедур, которые приводят к получению полинуклеотида, отличающегося от полинуклеотида, встречающегося в природе.

Гетерологичная нуклеиновокислотная последовательность относится к любой нуклеиновокислотной последовательности, которая не выделена, не получена или не основана на встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, обнаруживаемой в организме хозяина. «Встречающаяся в природе» означает последовательность, обнаруживаемую в природе и не полученную путем синтеза или модифицированную. Последовательность «получена» из источника, когда она выделена из источника, но модифицирована (например, путем удаления, замены (мутации), вставки или другой модификации), соответственно, чтобы не нарушать нормальную функцию исходного гена.

Соответственно, полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенный» полинуклеотид - это тот, который отделен от своего исходного окружения. Например, встречающийся в природе полинуклеотид является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих в природной системе веществ. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонирован в вектор, который не является частью его естественного окружения, или если он содержится в кДНК.

Используемый в данном документе термин «лечить» в отношении хронического гепатита В относится к введению подходящих композиций с целью уменьшения симптомов ХГВ, предотвращения прогрессирования ХГВ или снижения уровня одного или нескольких обнаруживаемых маркеров ХГВ. Термин «лечение» следует толковать аналогичным образом. Например, предотвращение прогрессирования ХГВ может включать в себя предотвращение возникновения заболевания печени или стабилизацию ранее существовавшего заболевания печени, на что указывают уровни АЛТ (аланиновой трансаминазы), фиброз печени или другие подходящие обнаруживаемые маркеры. Другие маркеры ХГВ включают уровень ДНК HBV в сыворотке, который является индикатором репликации вируса, и уровень антигена HBs в сыворотке, который является индикатором вирусной нагрузки, поэтому лечение ХГВ может включать снижение уровня HBsAg в

сыворотке (например, по результатам количественного иммунологического исследования) или ДНК HBV (например, по результатам исследования в тесте Cobas® HBV (Roche) или эквивалентного) до неопределяемых уровней (элиминация HBsAg или ДНК HBV).

«Одновременное» введение в данном документе относится к введению во время того же продолжающегося иммунного ответа, и «одновременно» следует толковать аналогичным образом. Предпочтительно, оба компонента вводят в одно и то же время (например, одновременное введение композиции, содержащей вектор, и композиции, содержащей белок), однако один компонент можно вводить в течение нескольких минут (например, при одном и том же медицинском приеме или посещении врача), или в течение нескольких часов после другого компонента. Такое введение также обозначают совместным введением. Одновременное введение отдельных компонентов можно осуществлять через один и тот же путь введения, например, путем внутримышечной инъекции. В качестве альтернативы, одновременное введение отдельных компонентов можно осуществлять через различные пути введения, например, путем внутримышечной и внутривенной инъекции, внутримышечного и интраназального введения, ингаляции и подкожного введения и т. д. В некоторых воплощениях одновременное введение может относиться к введению аденовирусного вектора и белкового компонента. В других воплощениях совместное введение относится к введению аденовирусного вектора и вектора на основе другого вируса, например, поксвируса, такого как MVA. В других воплощениях совместное введение относится к введению аденовирусного вектора и белкового компонента, в котором белковый компонент используется вместе с адъювантом.

«Последовательное» введение относится к введению первой композиции с последующим введением второй композиции через значительное время спустя. Период времени между двумя последовательными введениями составляет от 1 недели до 12 месяцев, например от 2 недель до 12 недель, например, 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель или 12 недель, 6 месяцев или 12 месяцев. Более конкретно, оно составляет от 4 недель до 8 недель, например, период времени между последовательными введениями может составлять 4 недели. Таким образом, последовательное введение включает в себя первое и последующее введение по схеме прайм-буст, то есть когда введение второй композиции не выполняется во время продолжающегося иммунного ответа, вызванного первым введением.

Термин «иммуногенная комбинация» в данном описании относится к множеству отдельно составленных иммуногенных композиций, вводимых последовательно и/или

одновременно в одной схеме иммунизации, например, схеме прайм-буст, причем каждая иммуногенная композиция, составленная отдельно, является компонентом иммуногенной комбинации.

Что касается процента гомологий, при рассмотрении попарного выравнивания двух последовательностей можно увидеть выровненные остатки, идентичные между двумя последовательностями («совпадения»). Процент идентичности (или гомологии) можно рассчитать путем умножения на 100 отношения (отношений) числа совпадений к полной длине референтной последовательности (т.е. Процент идентичности = (Количество совпадений x 100) / Длина референтной последовательности).

Композиции и комбинации

В одном аспекте данного изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая вектор ChAd, выбранный из группы, состоящей из ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также обозначаемый C7) и Pan 9, в частности, ChAd63 или ChAd155, который включает векторную вставку, кодирующую HBc и HBs. В одном воплощении полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей область расщепления 2A вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A FMDV. В некоторых воплощениях HBc слит с hIi. В конкретном воплощении композиция содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую hIi, HBc, 2A и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 22. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В определенных воплощениях HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотная последовательность, гомологичная ей по меньшей мере на 98%) слита с hIi (например, SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере на 98%, или SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере на 98%). Например, HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7) или HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi

(например, SEQ ID NO: 12). В одном конкретном воплощении вектор представляет собой вектор ChAd155. В одном воплощении композиция содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном воплощении композиция содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В одном воплощении композиция содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В одном воплощении композиция содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая вектор MVA, который включает векторную вставку, кодирующую HBc и HBs, разделенные последовательностью, кодирующей область расщепления 2A вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A FMDV. В конкретном воплощении композиция содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую HBc, 2A и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 21. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере на 98%). В одном воплощении композиция содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном воплощении композиция содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте данного изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая полноразмерный рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), усеченный на С-конце, и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный

рекомбинантный НВс содержит домен сборки НВс, например, включающий 145-149 аминокислот домена сборки корового антигенного белка дикого типа, например, аминокислоты 1-145, 1-146, 1-147, 1-148 или аминокислоты 1-149 корового антигенного белка вируса гепатита В дикого типа. В одном воплощении композиция содержит полноразмерный рекомбинантный НВс, аминокислоты 1-149 НВс и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях рекомбинантные белковые антигены НВс и НВс находятся в форме вирусоподобных частиц. В одном воплощении композиция содержит рекомбинантный НВс и рекомбинантный НВс в соотношении 1:1. В другом воплощении соотношение НВс к НВс в композиции превышает 1, например, соотношение НВс к НВс может составлять 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1 или более, в частности, от 3:1 до 5:1, например, 3:1, 4:1 или 5:1, в частности, соотношение 4:1. В конкретных воплощениях композиция содержит рекомбинантный НВс и рекомбинантный НВс в соотношении 4:1 или более. В определенных воплощениях композиция содержит полноразмерный рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (НВс) (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотная последовательность, гомологичная ей по меньшей мере на 98%), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (НВс), усеченный на С-конце, и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный рекомбинантный НВс содержит домен сборки НВс, например, аминокислоты 1-149 НВс (например, SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). Например, композиция может содержать полноразмерный рекомбинантный НВс (SEQ ID NO: 1), аминокислоты 1-149 НВс (SEQ ID NO: 2) и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина в забуференном фосфатом физиологическом растворе.

В следующем аспекте предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), включающий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (НВс), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (НВс);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (НВс), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (НВс); и

в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант.

В одном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd, выбранный из группы, состоящей из ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также обозначаемый C7) и Pan 9, в частности ChAd63 или ChAd155, который включает в себя векторную вставку, кодирующую HBc и HBs. В одном воплощении полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей область расщепления 2А вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2А FMDV. В некоторых воплощениях HBc слит с hIi. В конкретном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую hIi, HBc, 2А и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 22. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2А вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В определенных воплощениях HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотная последовательность, гомологичная ей по меньшей мере на 98%) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%, или SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%). Например, HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7) или HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 12). В одном конкретном воплощении вектор представляет собой вектор ChAd155. В одном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В одном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd155, который содержит

полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В одном воплощении композиция части (а) иммуногенной комбинации содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном воплощении композиция части (б) иммуногенной комбинации содержит вектор MVA, который включает в себя векторную вставку, кодирующую HBc и HBs, разделенные последовательностью, кодирующей область расщепления 2A вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A FMDV. В конкретном воплощении композиция части (б) иммуногенной комбинации содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую HBc, 2A и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 21. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В одном воплощении композиция части (б) иммуногенной комбинации содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном воплощении композиция части (б) иммуногенной комбинации содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении композиция части (в) иммуногенной комбинации содержит полноразмерный рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), усеченный на С-конце, и адьювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный рекомбинантный HBc содержит домен сборки HBc, например, включающий 145-149 аминокислот домена сборки корового антигенного белка дикого типа, например, аминокислоты 1-145, 1-146, 1-147, 1-148 или аминокислоты 1-149 корового антигенного белка вируса гепатита В дикого типа. В одном воплощении композиция части (в)

иммуногенной комбинации содержит полноразмерный рекомбинантный HBs, аминокислоты 1-149 HBc и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях рекомбинантные белковые антигены HBs и HBc находятся в форме вирусоподобных частиц. В одном воплощении композиция содержит рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 1:1. В другом воплощении соотношение HBc к HBs в композиции превышает 1, например, соотношение HBc к HBs может составлять 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1 или более, в частности, от 3:1 до 5:1, например, 3:1, 4:1 или 5:1, в частности, соотношение 4:1. В конкретных воплощениях композиция части (в) иммуногенной комбинации содержит рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более. В некоторых воплощениях композиция содержит полноразмерный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs) (например, SEQ ID NO: 1), рекомбинантный коровий антиген вируса гепатита В (HBc), усеченный на С-конце, и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный рекомбинантный HBc содержит домен сборки HBc, например, аминокислоты 1-149 HBc (например, SEQ ID NO: 2). Например, композиция части (в) иммуногенной комбинации содержит полноразмерный рекомбинантный HBs (SEQ ID NO: 1), аминокислоты 1-149 HBc (SEQ ID NO: 2) и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина, например, в забуференном фосфатом физиологическом растворе.

Так, в одном частном воплощении данного изобретения предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

- а) композицию, содержащую вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую hIi, HBc, 2A и HBs;
- б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую HBc, 2A и HBs; и
- в) композицию, содержащую рекомбинантный белок HBs, рекомбинантный усеченный белок HBc и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В одном таком воплощении иммуногенная комбинация содержит:

- а) композицию, содержащую вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и

в) композицию, содержащую рекомбинантный белок HBs с SEQ ID NO: 1, рекомбинантный усеченный белок HBc с SEQ ID NO: 2 и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В другом воплощении иммуногенная комбинация содержит:

а) композицию, содержащую вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 10 или полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 14;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 6; и

в) композицию, содержащую рекомбинантный белок HBs с SEQ ID NO: 1, рекомбинантный усеченный белок HBc с SEQ ID NO: 2 и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В следующем аспекте данного изобретения предложен набор, содержащий следующие компоненты:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), включающий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант, с инструкциями для введения компонентов последовательно или одновременно для лечения ХГВ.

В одном воплощении композиция части (а) набора содержит вектор ChAd, выбранный из группы, состоящей из ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также обозначаемый C7) и Pan 9, в частности ChAd63 или ChAd155, который включает в себя векторную вставку, кодирующую HBc и HBs. В одном воплощении полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательно, кодирующей область расщепления 2А вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях

полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A FMDV. В некоторых воплощениях HBc слит с hIi. В конкретном воплощении композиция компонента (а) набора содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую hIi, HBc, 2A и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 22. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В определенных воплощениях HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотная последовательность, гомологичная ей по меньшей мере на 98%) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%, или SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%). Например, HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7) или HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 12). В одном конкретном воплощении вектор представляет собой вектор ChAd155. В одном воплощении композиция компонента (а) набора содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном воплощении композиция компонента (а) набора содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В одном воплощении композиция компонента (а) набора содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В одном воплощении композиция компонента (а) набора содержит вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном воплощении композиция компонента (б) набора содержит вектор MVA, который включает в себя векторную вставку, кодирующую HBc и HBs, разделенные последовательностью, кодирующей область расщепления 2A вируса ящура (FMDV). В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область

расщепления 2A FMDV. В конкретном воплощении композиция компонента (б) набора содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую HBc, 2A и HBs, например, вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 21. В некоторых воплощениях векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В одном воплощении композиция компонента (б) набора содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном воплощении компонент композиции (б) набора содержит вектор MVA, который содержит полинуклеотидную векторную вставку, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении компонент композиции (в) набора содержит полноразмерный рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), усеченный на С-конце, и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный рекомбинантный HBc содержит домен сборки HBc, например, включающий 145-149 аминокислот домена сборки корового антигенного белка дикого типа, например, аминокислоты 1-145, 1-146, 1-147, 1-148 или аминокислоты 1-149 корового антигенного белка вируса гепатита В дикого типа. В одном воплощении композиция компонента (в) набора содержит полноразмерный рекомбинантный HBs, аминокислоты 1-149 HBc и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях рекомбинантные белковые антигены HBs и HBc находятся в форме вирусоподобных частиц. В одном воплощении композиция содержит рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 1:1. В другом воплощении соотношение HBc к HBs в композиции превышает 1, например, соотношение HBc к HBs может составлять 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1 или более, в частности, 3:1, 4:1 или 5:1, особенно, соотношение 4:1. В конкретных воплощениях композиция компонента (в) набора содержит рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более. В некоторых воплощениях композиция содержит полноразмерный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs) (например, SEQ ID NO: 1), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), усеченный на С-конце, и

адъювант, содержащий MPL и QS-21. В некоторых воплощениях усеченный рекомбинантный HBc содержит домен сборки HBc, например, аминокислоты 1-149 HBc (например, SEQ ID NO: 2). Например, композиция компонента (в) набора содержит полноразмерный рекомбинантный HBs (SEQ ID NO: 1), аминокислоты 1-149 HBc (SEQ ID NO: 2) и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина, например, в забуференном фосфатом физиологическом растворе.

В одном воплощении набор содержит следующие компоненты:

а) композицию, содержащую вектор ChAd155, который содержит полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 10 или полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 14;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку с SEQ ID NO: 6; и

в) композицию, содержащую рекомбинантный белок HBs с SEQ ID NO: 1, рекомбинантный усеченный белок HBc с SEQ ID NO: 2 и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина,

с инструкциями для введения компонентов последовательно или одновременно для лечения ХГВ.

Схемы введения

В данном документе описана схема вакцинации, которая предусматривает гетерологичную вакцинацию по схеме прайм-буст с двумя вирусными векторами, кодирующими коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs) для индукции сильного CD8⁺ Т-клеточного ответа с последовательным или одновременным введением рекомбинантных белков HBc и HBs с адъювантом для индукции сильного антигенспецифического CD4⁺ Т-клеточного и гуморального ответов. В данном документе также описываются иммуногенные композиции и комбинации, которые могут найти применение в качестве вакцинных композиций. Такие композиции и комбинации могут применяться в изложенных схемах. Изложенные вакцинные композиции и схемы успешно восстанавливали HBs- и HBc-специфические гуморальный и CD8⁺ Т-клеточный ответы, а также HBs-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ без сопутствующих признаков побочных эффектов со стороны печени в модели на мышах, воспроизводящей вирусологические и иммунологические характеристики хронической инфекции HBV у человека.

Иммуногенные композиции и иммуногенные комбинации, описанные в данном документе, могут найти применение в способе лечения хронического инфекционного гепатита В (ХГВ) у человека, включающем стадии:

а) введения человеку композиции, содержащей вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) введения человеку композиции, содержащей вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) введения человеку композиции, содержащей рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант.

В одном воплощении стадии способа осуществляют последовательно, со стадией (а), предшествующей стадии (б), и стадией (б), предшествующей стадии (в). Возможно, стадия (в) может быть повторена. В некоторых воплощениях период времени между стадиями способа составляет от 2 до 12 недель, например, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель. В одном воплощении период времени между стадиями способа составляет от 4 до 8 недель. В одном воплощении период времени между последовательными введениями композиций согласно способу составляет 4 недели. В другом воплощении стадию (в) выполняют одновременно со стадией (а) и/или со стадией (б). В определенных воплощениях одновременные стадии (б) и (в) могут быть повторены. В следующем воплощении стадию (в) повторяют, и стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (а), стадия (б), стадия (в), стадия (в). В некоторых воплощениях период времени между стадиями способа составляет от 2 до 12 недель, например, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель. В одном воплощении период времени между стадиями способа составляет от 4 до 8 недель. В одном воплощении период времени между последовательными введениями композиций согласно способу составляет 4 недели.

В другом аспекте иммуногенные композиции и иммуногенные комбинации могут найти применение в способе лечения хронической инфекции гепатита В (ХГВ) у человека, включающем стадии:

а) введения человеку 1) композиции, содержащей вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и одновременно 2) композиции, содержащей рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант; и

б) введения человеку 1) композиции, содержащей вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и, одновременно, композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант.

В одном воплощении стадии способа выполняют последовательно, со стадией (а), предшествующей стадии (б). Возможно, стадия (б) может быть повторена. Возможно, стадия (а) может быть повторена. В одном воплощении стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (а), затем стадия (а), затем стадия (б). В качестве альтернативы, стадии способа можно выполнять в следующем порядке: стадия (а), затем стадия (б), затем стадия (а). Возможно, стадия (б) может быть повторена. В одном воплощении стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (а), затем стадия (б), затем стадия (б). В альтернативном воплощении стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (б), затем стадия (а), затем стадия (б). Возможно, стадия (б) может быть повторена более одного раза. Возможно, и стадия (а), и стадия (б) могут быть повторены. В одном воплощении стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (а), затем стадия (б), затем стадия (б), затем стадия (б). В следующем воплощении стадии способа выполняют в следующем порядке: стадия (а), затем стадия (а), затем стадия (б), затем стадия (б), возможно, затем стадия (б). В некоторых воплощениях период времени между стадиями способа составляет от 2 до 12 недель, например, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель. В одном воплощении период времени между стадиями способа составляет от 4 до 8 недель. В одном воплощении период времени между последовательными введениями композиций согласно способу составляет 4 недели.

Антигены

Идентифицировано по меньшей мере девять генотипов (от А до I) HBV, различающихся своими генами более чем на 8%. В рамках заданного генотипа HBV

выявлено несколько суб-генотипов, различающихся на 4-8%. Антигены для применения в изложенных способах предпочтительно выбирают для обеспечения иммунологического охвата множества, предпочтительно всех генотипов HBV. Антиген корового белка гепатита В (HBc) высоко консервативен среди генотипов и суб-генотипов, а последовательность антигена поверхностного белка гепатита В (HBs) выбирают таким образом, чтобы она включала ключевые В-клеточные эпитопы, сохраняющиеся среди генотипов, что позволяет индуцировать полиспецифические нейтрализующие ответы. Соответственно, последовательности HBc и HBs для применения в изложенных способах и композициях основаны на последовательностях из генотипа/подтипа А2.

Соответственно, HBs антиген для применения в изложенных способах и композициях имеет происхождение от белка малого, среднего или большого поверхностного антигена. В частности, подходящий HBs антиген включает малый (S) белок HBV штамма adw2, генотипа А. Например, подходящий HBs антиген имеет 226 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. При использовании в качестве рекомбинантного белка HBs антиген предпочтительно собран в вирусоподобные частицы. Этот антиген входит в хорошо изученные имеющиеся в продаже вакцины для профилактики гепатита В (Engerix B, Fendrix, Twinrix и др.), и было продемонстрировано, что он защищает от вируса гепатита В всех генотипов. Предпочтительно рекомбинантный белок HBs антигена экспрессируют в дрожжах и очищают для применения в вакцинных композициях и способах по данному изобретению. Подходящие способы экспрессии и очистки известны, например, из EP1307473 B1.

Коровый белок гепатита В (HBc) является основным компонентом оболочки нуклеокапсида, в которую упакован вирусный геном. Этот белок (длиной 183-185 аминокислот) экспрессируется в цитоплазме инфицированных клеток и остается негликозилированным. На С-конце HBc содержится домен сборки из 149 остатков и РНК-связывающий домен из 34-36 остатков. Антиген HBc для применения в изложенных способах и композициях может быть полной длины или может содержать усеченный по С-концу белок (лишенный РНК-связывающего С-конца), например, содержащий 145-149 аминокислот домена сборки дикого типа корового антигенного белка, например, аминокислоты 1-145, 1-146, 1-147, 1-148 или аминокислоты 1-149 корового антигенного белка вируса гепатита В. Усеченный белок сохраняет способность собираться в частицы нуклеокапсида. Подходящий антиген HBc для применения в изложенных способах и композициях имеет аминокислотную последовательность HBV штамма adw2, генотипа А. При применении в качестве рекомбинантного белка антиген HBc предпочтительно усечен

по С-концу по сравнению с белком дикого типа, в частности, антиген может представлять собой аминокислоты 1-149 НВс, например, может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, рекомбинантный белковый антиген НВс экспрессируют в *E. coli* и очищают для применения в вакцинных композициях и способах по данному изобретению. Способы рекомбинантной экспрессии вирусных белков в *E. coli* хорошо известны в области техники.

При применении в качестве рекомбинантного белка антиген НВс предпочтительно собран в вирусоподобные частицы. При экспрессии из вирусного вектора, антиген НВс может быть полноразмерным или усеченным, например, подходящим является полноразмерный антиген НВс (например, SEQ ID NO: 11). Подходящие дозы рекомбинантного белкового антигена НВс для применения в способах, изложенных в данном документе, составляют от 10 мкг на дозу до 100 мкг на дозу, такие как 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг или 100 мкг на дозу. Подходящие дозы рекомбинантного белка-антигена НВс для применения в способах, изложенных в настоящем документе, составляют от 10 мкг на дозу до 100 мкг на дозу, такие как 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг или 100 мкг на дозу.

Антигены - это вещества, которые вызывают иммунный ответ в организме, в частности, выработку антител. Антигены могут быть чужеродного происхождения, то есть патогенными, или могут происходить из самого организма, последние называются аутоантигенами. Антигены могут быть презентированы на поверхности антигенпрезентирующих клеток молекулами МНС. Существует два класса молекул МНС, МНС класса I (МНС-I) и МНС класса II (МНС-II). Молекулы МНС-II являются мембраносвязанными рецепторами, которые синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и покидают эндоплазматический ретикулум в компартменте для МНС класса II. Для предотвращения связывания эндогенных пептидов, то есть аутоантигенов, с молекулой МНС-II и их презентирования для выработки иммунного ответа, образовавшаяся молекула МНС-II объединяется с другим белком, инвариантной цепью, которая блокирует карман молекулы МНС-II, с которым связывается пептид. Инвариантная цепь человеческого происхождения (hIi, при экспрессии на плазматической мембране также известная как CD74) является эволюционно консервативным мембранным белком типа II, который играет несколько ролей в клетке и во всей иммунной системе [Borghese, 2011]. Когда компартмент для МНС класса II сливается с

поздней эндосомой, содержащей фагоцитированные и распавшиеся чужеродные белки, инвариантная цепь расщепляется, оставляя только область CLIP, связанную с молекулой МНС-II. На втором этапе CLIP удаляется молекулой HLA-DM, оставляя молекулу МНС-II свободной для связывания фрагментов чужеродных белков. Указанные фрагменты презентуются на поверхности антиген-презентирующей клетки, когда компартмент МНС класса II сливается с плазматической мембраной, таким образом презентуя чужеродные антигены другим клеткам, в первую очередь Т-хелперам.

Известно, что иммунный ответ против антигена усиливается, когда для вакцинации используется экспрессирующая система на основе аденовируса, кодирующая инвариантную цепь, слитую с указанным антигеном (см. WO 2007/062656, также опубликованный как US2011/0293704 и включенный путем ссылки для изложения последовательностей инвариантных цепей), то есть инвариантная цепь усиливает иммуногенность антигена, и для подчеркивания этого эффекта инвариантные цепи, такие как hIi, иногда называют «генетическим адьювантом». Кроме того, указанная аденовирусная конструкция оказалась полезной для примирования иммунного ответа в контексте схем вакцинации прайм-буст (см. WO2014/141176, также опубликованный как US2016/0000904, и W02010/057501, также опубликованный как US2010/0278904, которые включены путем ссылки для изложения последовательностей инвариантных цепей и аденовирусных векторов, кодирующих последовательности инвариантных цепей). В частности, последовательность hIi и hIi обладают потенциалом для увеличения CD8⁺ Т-клеточных ответов [Spencer, 2014; Capone, 2014]. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, включенная в вектор для применения в способах, применениях и композициях, изложенных в данном документе, может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую hIi. Аминокислотная последовательность hIi, которая может быть включена в изложенный аденовирусный вектор ChAd155-hIi-HBV, приведена в SEQ ID NO: 7, а альтернативная последовательность приведена в SEQ ID NO: 12. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти аминокислотные последовательности, приведены в SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 13. Соответственно, нуклеотидную последовательность, кодирующую hIi, сливают с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBc, чтобы получить слитый белок, в котором полипептид hIi слит N-концом с антигеном HBc.

Векторы

В дополнение к полинуклеотиду, кодирующему антигенные белки (также называемому в данном документе «вставкой»), векторы для применения в способах и

композициях, изложенных в данном документе, могут также включать в себя обычные контролирующие элементы, которые функционально связаны с кодирующим полинуклеотидом таким образом, что обеспечивают его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной вектором. Таким образом, полинуклеотидная векторная вставка, которая кодирует белковые антигены, включается в экспрессирующую кассету с подходящими контролируемыми элементами.

Элементы, контролирующие экспрессию, включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, последовательности промотора и энхансера; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли А), включая полиА бета-глобина кролика; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (например, консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта.

«Промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая позволяет связываться РНК полимеразе и направляет транскрипцию гена. Как правило, промотор расположен в 5' некодирующей области гена, вблизи сайта начала транскрипции гена. Элементы последовательности в составе промоторов, которые функционируют при инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примеры промоторов включают промоторы бактерий, дрожжей, растений, вирусов и млекопитающих (включая человека), но не ограничиваются ими. В области техники известно и может применяться большое количество последовательностей, контролирующих экспрессию, включая промоторы, которые являются собственными, нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифичными.

Примеры конститутивных промоторов включают промотор TBG, промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (возможно, с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (возможно, с энхансером CMV, см., например, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)), промотор CASI, промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1a (Invitrogen). Подходящим промотором является промотор CMV или его вариант, более подходящим является промотор CMV человека (HCMV) или его вариант.

Аденовирусные векторы

Аденовирус широко используют для переноса генов благодаря его способности осуществлять эффективный перенос генов в различных тканях-мишенях и его большой трансгенной емкости. Обычно осуществляют делецию генов E1 аденовируса и заменяют их трансгенной кассетой, состоящей из выбранного промотора, последовательности кДНК гена, представляющего интерес, и сигнала полиаденилирования, в результате чего получают дефектный по репликации рекомбинантный аденовирус. Показано, что векторы на основе аденовируса человека являются мощными векторами для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на трансген на животных моделях, а также на людях. Аденовирусы обладают широким тропизмом и способны поражать как реплицирующиеся, так и не реплицирующиеся клетки. Основным ограничением для клинического применения векторов на основе аденовируса человека является высокая распространенность нейтрализующих антител в общей популяции. Аденовирусы, выделенные из альтернативных видов, рассматривались как потенциальные вакцинные векторы, чтобы обойти проблему существующего противоаденовирусного иммунитета у людей. Среди них, аденовирусы обезьян, полученные от шимпанзе, горилл или бонобо, могут быть пригодны для использования в доставке антигенов и индукции направленного Т-клеточного и/или гуморального ответа на эти антигены у людей. Аденовирусы обезьян, в том числе полученные от шимпанзе, были протестированы в ходе клинических исследований. Векторы на основе аденовирусов шимпанзе имеют низкую/нулевую распространенность в человеческой популяции, случаи, когда они вызывали патологические заболевания у людей, неизвестны, и некоторые векторы ChAd можно набирать в высоких титрах в клеточных линиях, ранее использовавшихся для производства материала клинического качества, таких как эмбриональные клетки почки человека 293 (293 НЕК).

Репликативно-некомпетентный или дефектный по репликации аденовирус представляет собой аденовирус, который не способен к репликации, поскольку он был сконструирован так, чтобы иметь по меньшей мере функциональную делецию (или мутацию с «потерей функции»), т.е. делецию или мутацию, которая нарушает функцию гена без полного его удаления, например, введение искусственных стоп-кодонов, делецию или мутацию активных сайтов или взаимодействующих доменов, мутацию или делецию регуляторной последовательности гена и т.д., или полное удаление гена, кодирующего генный продукт, необходимый для репликации вируса, такого как один или более генов аденовируса, выбранных из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4 (таких как E3 ORF1, E3 ORF2,

E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8, E3 ORF9, E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF5, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2 и/или E4 ORF1). Предпочтительно, производят делецию генов E1 и E3. Более предпочтительно, производят делецию генов E1, E3 и E4.

Подходящими векторами для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, являются векторы на основе дефектных по репликации аденовирусов шимпанзе, например, ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также обозначаемый C7) или Pan 9. Примеры таких штаммов описаны в WO 03/000283, WO 2005/071093, WO 2010/086189 и WO2016/198621. Вектор ChAd155 (см. WO2016/198621, который включен путем ссылки с целью изложения последовательностей вектора ChAd155 и способов) принадлежит к той же филогенетической группе аденовирусов, что и вектор ChAd3 (группа C). В одном воплощении вектор для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, представляет собой вектор ChAd филогенетической группы C, например, ChAd3 или ChAd155. В одном конкретном воплощении способ лечения хронического гепатита В, изложенный в данном документе, включает стадию введения человеку композиции, содержащей вектор ChAd155, содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc). Подходящая доза вектора ChAd для применения в способах, изложенных в данном документе, составляет 1×10^8 – 1×10^{11} вирусных частиц (вч) на дозу, например, приблизительно 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} или 1×10^{11} вирусных частиц (вч) на дозу.

Более конкретно, в одном воплощении вектор для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, представляет собой вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе ChAd155, кодирующий слитые последовательности, происходящие от двух белков HBV: HBc (коровый белок, белок нуклеокапсида) и HBs (малый поверхностный антиген). В некоторых конкретных воплощениях вектор представляет собой ChAd155, кодирующий HBc и HBs, разделенные SEQ ID NO: 3, спейсером, который включает в себя последовательность, кодирующую область расщепления 2A вируса ящура (в результате образуется хвост из 23 аминокислот на С-конце белка, расположенного в направлении 5' и один пролин на N-конце белка, расположенного в направлении 3') для процессинга HBc и HBs в отдельные белки. Отщепление корового белка от поверхностных антигенов обеспечивает правильное сворачивание HBs, что позволяет развиваться гуморальному ответу на поверхностный антиген. В альтернативном варианте аденовирусный вектор может представлять собой

вектор с двумя промоторами (бицистронный), чтобы обеспечить независимую экспрессию антигенов HBs и HBc.

В некоторых воплощениях N-концевая часть гена, кодирующего белок HBc, может быть слита с геном, кодирующим изоформу р35 инвариантной цепи (т.е. hIi или CD74), ассоциированную с человеческим главным комплексом гистосовместимости (MHC) класса II. Таким образом, конкретный вектор ChAd155 для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 22, включающую hIi, HBc, 2A и HBs. Аминокислотная последовательность такой конструкции приведена в SEQ ID NO: 9, а нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность конструкции, приведена в SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность альтернативной конструкции приведена в SEQ ID NO: 15, а нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность конструкции, приведена в SEQ ID NO: 14.

Вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA)

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), дефектный по репликации у людей и других млекопитающих, происходит из вируса осповакцины. Он принадлежит к семейству поксвирусов, и был изначально разработан для повышения безопасности вакцинации против оспы путем пассирования вируса осповакцины более 570 раз в клетках фибробластов куриных эмбрионов (CEF), что привело к множественным делециям, после чего вирус был сильно ослаблен и стал дефектным по репликации у человека и других млекопитающих. Дефект репликации возникает на поздней стадии сборки вириона, так что экспрессия вирусного и рекомбинантного гена не нарушается, что делает MVA эффективным одноцикловым экспрессирующим вектором, не способным вызвать инфекцию у млекопитающих. Впоследствии MVA широко использовали в качестве вирусного вектора для индукции антигенспецифического иммунитета против трансгенов как в моделях на животных, так и у людей. Описание MVA можно найти у Mayg A, et al. (1978) и Mayg, A. et al. (1978), а также Mayg, A. et al., (1975).

В одном воплощении MVA получают из вирусного посевного материала 460 MG, полученного из 571-го пассажа вируса осповакцины на клетках CEF. В другом воплощении MVA получают из вирусного посевного материала MVA 476 MG/14/78. В следующем воплощении MVA получен или произведен до 31 декабря 1978 года и не содержит примеси прионов. Подходящая доза вектора MVA для применения в способах, изложенных в данном документе, составляет 1×10^6 – 1×10^9 бляшкообразующих единиц

(БОЕ) на дозу, например, приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 или 1×10^9 БОЕ на дозу.

В одном конкретном воплощении вектор для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, представляет собой MVA, кодирующий слитые последовательности, полученные из двух белков HBV: HBc (коровый белок нуклеокапсида) и HBs (малый поверхностный антиген). В некоторых воплощениях вектор для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, представляет собой MVA, кодирующий HBc и HBs, разделенные нуклеотидной последовательностью, кодирующей SEQ ID NO: 3 - спейсер, который включает в себя последовательность, кодирующую область расщепления 2A вируса ящура (в результате образуется хвост из 23 аминокислот на С-конце белка, расположенного в направлении 5' и один пролин на N-конце белка, расположенного в направлении 3') для процессинга HBc и HBs в отдельные белки. Таким образом, конкретный вектор MVA для применения в способах и композициях, изложенных в данном документе, содержит полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую конструкцию, имеющую структуру, показанную на Фиг. 21, включающую HBc, 2A и HBs. Аминокислотная последовательность такой конструкции приведена в SEQ ID NO: 5, а нуклеотидная последовательность, кодирующая конструкцию аминокислотной вставки, приведена в SEQ ID NO: 6.

Фармацевтические композиции

Изложенные в данном документе иммуногенные композиции, которые находят применение в изложенных способах, представляют собой подходящие фармацевтически приемлемые композиции. Соответственно, фармацевтическая композиция будет включать фармацевтически приемлемый носитель.

Иммуногенные композиции, которые содержат векторы ChAd или MVA, могут быть приготовлены для введения путем суспендирования частиц вирусного вектора в фармацевтически или физиологически приемлемом носителе, таком как изотонический физиологический раствор или другой изотонический солевой раствор. Подходящий носитель будет очевиден для специалистов в данной области и будет зависеть в значительной степени от пути введения.

Композиции, которые содержат рекомбинантные белковые антигены, могут быть получены путем выделения и очистки белков из клеточной культуры, в которой они экспрессируются, суспендирования в буфере состава, который включает одну или несколько солей, поверхностно-активные вещества и/или криозащитные вещества, и лиофилизирования. Например, подходящий буфер состава может включать сахар или

смесь сахаров, например, сахарозу, трегалозу или сукралозу, в качестве криозащитного вещества, и неионный сополимер, например, поллоксамер, в качестве поверхностно-активного вещества. Для введения составы лиофилизированного рекомбинантного белка восстанавливают в фармацевтически или физиологически приемлемом носителе, таком как изотонический физиологический раствор или изотонический солевой раствор для инъекций или ингаляций. Подходящий носитель будет очевиден для специалистов в области техники и будет зависеть в значительной степени от пути введения. Восстановленная композиция может также включать адъювант или смесь адъювантов. В одном воплощении лиофилизированные рекомбинантные белки восстанавливают в жидком препарате системы адъювантов.

Используемый в данном документе термин «носитель» относится к фармакологически неактивному веществу, такому как разбавитель, эксципиент или носитель, без ограничения, с которым вводят терапевтически активный ингредиент. Жидкие носители включают стерильные жидкости, такие как растворы солей в воде и маслах, включая масла, произведенные из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное, но не ограничиваются ими. В качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов, могут применяться растворы солей и водные растворы декстрозы и глицерина. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в документе «Remington's Pharmaceutical Sciences» под редакцией E.W. Martin.

Композиции для применения в изложенных в данном документе способах могут включать в составе композиции, помимо вектора или рекомбинантных белков, систему адъювантов. Термин «адъювант» относится к агенту, который усиливает, стимулирует, активирует, потенцирует или модулирует иммунный ответ на антиген композиции на клеточном или гуморальном уровне, например, иммунологические адъюванты стимулируют ответ иммунной системы на антиген, но сами по себе не оказывают иммунологического влияния. Изложенные в данном документе иммуногенные композиции могут включать адъювант в качестве отдельного ингредиента в составе, независимо от того, кодирует ли вектор, содержащийся в композиции, также «генетический адъювант», такой как hIi.

Подходящими адъювантами являются те, которые могут усиливать иммунный ответ у субъектов с хроническими состояниями и нарушенной иммунной компетентностью. Больные ХГВ характеризуются неспособностью обеспечить

эффективный врожденный и адаптивный иммунный ответ на вирус, что затрудняет разработку эффективной вакцины. У этих пациентов одна из ключевых функций состава адьювантной вакцины должна быть направлена на то, чтобы в профиле клеточно-опосредованного иммунного ответа преобладали Т хелперы 1 (Th1), считающиеся ключевыми для удаления внутриклеточных патогенов.

Примеры подходящих адьювантов включают неорганические адьюванты (например, неорганические соли металлов, такие как фосфат алюминия или гидроксид алюминия), органические непептидные адьюванты (например, сапонины, такие как QS21 или сквален), адьюванты на масляной основе (например, полный адьювант Фрейнда и неполный адьювант Фрейнда), цитокины (например, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF и INF- γ), корпускулярные адьюванты (например, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), липосомы или биоразлагаемые микросферы), виросомы, бактериальные адьюванты (например, монофосфориллипид А (MPL), такой как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) или мурамилпептиды), синтетические адьюванты (например, неионные блок-сополимеры, аналоги мурамилпептидов или синтетический липид А), синтетические полинуклеотидные адьюванты (например, полиаргинин или полилизин) и иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные динуклеотиды CpG («CpG»), но не ограничиваются ими. В частности, адьювант(ы) могут представлять собой органические непептидные адьюванты (например, сапонины, такие как QS21 или сквален) и/или бактериальные адьюванты (например, монофосфориллипид А (MPL), такой как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL)).

Одним из подходящих адьювантов является монофосфориллипид А (MPL), в частности, 3-де-О-ацетилованный монофосфориллипид А (3D-MPL). По химическому составу он часто поставляется в виде смеси 3-де-О-ацетилованного монофосфориллипида А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Его можно очистить и получить способами, изложенными в GB 2122204B, где также изложено получение дифосфориллипида А и его 3-О-деацетилованных вариантов. Описаны другие очищенные и синтетические липополисахариды (патенты US 6005099 и EP0729473B1; Hilgers, 1986; Hilgers, 1987 и EP0549074B1].

Сапонины также являются подходящими адьювантами [Lacaille-Dubois, 1996]. Например, сапонин Quil А (полученный из коры южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria* Molina) и его фракции описаны в патенте US 5057540 и Kensil, 1996; а также в EP 0362279 B1. Очищенные фракции Quil А также известны как иммуностимуляторы, такие как QS21 и QS17; способы их получения описаны в патентах US 5057540 и EP

0362279 В1. Применение QS21 также описано Kensil, 1991. Также известны комбинации QS21 с полисорбатом или циклодекстрином (WO 99/10008). Корпускулярные системы адьювантов, содержащие фракции QuilA, такие как QS21 и QS7, описаны в WO 96/33739 и WO 96/11711.

Адьюванты, такие как описанные выше, могут быть объединены вместе с носителями, такими как липосомы, эмульсии масло-в-воде и/или солями металлов (включая соли алюминия, такие как гидроксид алюминия). Например, 3D-MPL может быть объединен с гидроксидом алюминия (EP 0689454) или эмульсиями масло-в-воде (WO 95/17210); QS21 может быть объединен с холестеринсодержащими липосомами (WO 96/33739), эмульсиями масло-в-воде (WO 95/17210) или алюминием (WO 98/15287).

В изложенных композициях могут применяться комбинации адьювантов, в частности, комбинация монофосфориллипида А и производного сапонины (см., например, WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241), более конкретно, комбинация QS21 и 3D-MPL, как описано в WO 94/00153, или композиция, в которой QS21 «гасится» холестеринсодержащими липосомами (DQ), как описано в WO 96/33739. Эффективный состав адьюванта, включающий QS21, 3D-MPL и токоферол в эмульсии масло-в-воде, описан в WO 95/17210 и представляет собой другой состав, который может найти применение в изложенных композициях. Так, подходящие системы адьювантов включают, например, комбинацию монофосфорил липида А, предпочтительно, 3D-MPL, вместе с солью алюминия (например, как описано в WO00/23105). Еще один приведенный в качестве примера адьювант включает QS21 и/или MPL и/или CpG. QS21 может быть «погашен» холестеринсодержащими липосомами, как описано в WO 96/33739.

Соответственно, подходящим адьювантом для применения в изложенных иммуногенных композициях является AS01, адьювант на основе липосом, содержащий MPL и QS-21. Липосомы, которые являются носителями для иммуно-энхансеров MPL и QS-21, состоят из диолеилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина в забуференном фосфатом физиологическом растворе. AS01_{B-4} является особенно предпочтительным вариантом адьюванта AS01, в состав которого входят иммуно-энхансеры QS-21 (тритерпеновый гликозид, выделенный из коры *Quillaja saponaria*) и MPL (3-D монофосфориллипид А), липосомы из DOPC/холестерина в качестве носителей для этих иммуно-энхансеров, а также сорбит в растворе PBS. В частности, одна доза AS01_{B-4} для человека (0,5 мл) содержит 50 мкг QS-21 и 50 мкг MPL. AS01_{E-4} соответствует

двукратному разведению AS01_{B-4}, то есть содержит 25 мкг QS-21 и 25 мкг MPL в одной человеческой дозе.

В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), усеченный рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант, содержащий MPL и QS-21. В одном воплощении иммуногенная композиция содержит рекомбинантный HBs, усеченный рекомбинантный HBc и адъювант AS01. В конкретном воплощении иммуногенная комбинация содержит композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более, а также адъювант AS01, например, AS01_{B-4} или AS01_{E-4}.

В одном воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc и полноразмерный рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более, и адъювант,

содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc и полноразмерный рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более и адъювант AS01.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc, состоящий из аминокислот 1-149 HBc (например, SEQ ID NO: 2) и полноразмерный рекомбинантный HBs (например, SEQ ID NO: 1) в соотношении 4:1 и AS01_{B-4}.

В одном воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации ChAd155, содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации ChAd155, содержащий полинуклеотид, кодирующий HBs, и полинуклеотид, кодирующий HBc, разделенные полинуклеотидом, кодирующим линкер, включающий область расщепления 2А вируса ящура;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотид, кодирующий HBs, и полинуклеотид, кодирующий HBc, разделенные полинуклеотидом, кодирующим линкер, включающий область расщепления 2А вируса ящура; и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc и полноразмерный рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более, и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации ChAd155, содержащий полинуклеотид, кодирующий HBs, и полинуклеотид, кодирующий инвариантную цепь человеческого происхождения (hIi), слитую с N-концом HBc;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотид, кодирующий HBs, и полинуклеотид, кодирующий HBc, разделенные полинуклеотидом, кодирующим линкер, включающий область расщепления 2А вируса ящура; и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc и полноразмерный рекомбинантный HBs в соотношении 4:1 или более и адъювант AS01.

В некоторых воплощениях векторная вставка вектора ChAd компонента (а) иммуногенной комбинации кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2А вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). В некоторых воплощениях HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотная последовательность, гомологичная ей по меньшей мере на 98%) слит с hIi (например, SEQ

ID NO: 7 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%, или SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательностью, гомологичной ей по меньшей мере, на 98%). Например, HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 7) или HBc (например, SEQ ID NO: 11) слит с hIi (например, SEQ ID NO: 12).

В некоторых воплощениях векторная вставка вектора MVA компонента (б) иммуногенной комбинации кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%) и HBs (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%). Например, векторная вставка кодирует HBc (например, SEQ ID NO: 11) и HBs (например, SEQ ID NO: 1), разделенные последовательностью, кодирующей спейсер, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура (например, SEQ ID NO: 3).

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации ChAd155, полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc, состоящий из аминокислот 1-149 HBc (например, SEQ ID NO: 2) и полноразмерный рекомбинантный HBs (например, SEQ ID NO: 1) в соотношении 4:1, а также AS01_{B-4}.

В другом воплощении предложена иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации ChAd155, полинуклеотидную векторную вставку, содержащую SEQ ID NO: 10, или полинуклеотидную векторную вставку, содержащую SEQ ID NO: 14;

б) композицию, содержащую вектор MVA, содержащий полинуклеотидную векторную вставку, содержащую SEQ ID NO: 6; и

в) композицию, содержащую усеченный рекомбинантный HBc, состоящий из аминокислот 1-149 HBc (например, SEQ ID NO: 2) и полноразмерный рекомбинантный HBs (например, SEQ ID NO: 1) в соотношении 4:1, а также AS01_{B-4}.

Введение

В определенных воплощениях изложенные иммуногенные композиции и иммуногенные комбинации вводят интраназальным, внутримышечным, подкожным, внутрикожным или местным путем. Предпочтительно, введение осуществляют внутримышечно.

Интраназальное введение представляет собой введение иммуногенной композиции в слизистую оболочку всего респираторного тракта, включая легкое. Более конкретно, композицию вводят в слизистую оболочку носа. В одном воплощении интраназальное введение достигается при помощи спрея или аэрозоля. Внутримышечное введение относится к инъекции композиции в любую мышцу индивидуума. В качестве примера, внутримышечные инъекции осуществляют в дельтовидную мышцу, латеральную широкую мышцу бедра или ventro-ягодичную и dorso-ягодичную области. Предпочтительно введение в дельтовидную мышцу. Подкожное введение относится к инъекции композиции в гиподерму. Внутрикожное введение относится к инъекции композиции в дерму между слоями кожи. Местное введение представляет собой введение композиции в любую часть кожи или слизистой оболочки без проникновения в кожу иглы или аналогичного устройства. Композицию можно вводить местно на слизистую оболочку рта, носа, половых органов и/или прямой кишки. Местное введение включает способы введения, такие как подъязычное и/или трансбуккальное введение. Сублингвальное введение представляет собой введение композиции под язык (например, с использованием тонкой пленки для перорального применения (OTF)). Трансбуккальное введение представляет собой введение вектора через слизистую оболочку щеки.

Иммуногенные композиции и комбинации, изложенные в данном описании, могут найти применение в иммунизации по схеме прайм-буст. Соответственно, в данном документе изложены композиции для применения в способе лечения ХГВ, который представляет собой способ иммунизации по схеме прайм-буст. Во многих случаях однократного введения иммуногенной композиции недостаточно для образования количества долговременных иммунных клеток, которое требуется для эффективной защиты или для терапевтического лечения заболевания. Следовательно, для установления длительного защитного иммунитета против конкретного патогена или заболевания или для лечения или функционального лечения данного заболевания может потребоваться повторная стимуляция биологическим препаратом, специфичным для указанного патогена или заболевания. Схема введения, включающая повторное введение иммуногенной композиции или вакцины, направленной против одного и того же патогена или

заболевания, называют «схемой прайм-буст». В одном воплощении схема прайм-буст включает по меньшей мере два введения иммуногенной композиции, направленной против гепатита В. Первое введение иммуногенной композиции называется «примирование», а любое последующее введение той же иммуногенной композиции или иммуногенной композиции, направленной против того же патогена, называется «бустерное введение». Следует понимать, что для усиления иммунного ответа также предусматриваются 2, 3, 4 или даже 5 введений. Период времени между примированием и бустерным введением возможно составляет 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель или 12 недель. В частности, это 4 недели или 8 недель. Если выполняют более одного бустерного введения, последующее бустерное введение осуществляют через 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель или 12 недель, 6 месяцев или 12 месяцев после предыдущего бустерного введения. Например, интервал между любыми двумя бустерными введениями может составлять 4 недели или 8 недель.

Иммуногенные композиции, изложенные в данном описании, можно вводить в составе терапевтической схемы, которая включает введение дополнительного иммуногенного компонента, каждый из которых включен в различные композиции (например, иммуногенная комбинация). Композиции предпочтительно вводят в одно и то же самое место или вблизи того же места. Например, компоненты можно вводить внутримышечно, на одной и той же стороне или конечности («ко-латеральное» введение) или на противоположной стороне или конечности («контралатеральное» введение). Например, при контралатеральном введении первую композицию можно вводить в левую дельтовидную мышцу, а вторую композицию можно вводить последовательно или одновременно в правую дельтовидную мышцу. В качестве альтернативы, при коллатеральном введении первую композицию можно вводить в левую дельтовидную мышцу, а вторую композицию можно вводить последовательно или одновременно, также в левую дельтовидную мышцу.

Общие способы изготовления

- ChAd155-hIi-HBV:

Фрагмент ДНК, встроенный в качестве трансгена в вектор на основе рекомбинантного дефектного по репликации аденовируса группы С обезьян (полученного у шимпанзе) ChAd155, происходит из двух белковых антигенов HBV, корового белкового антигена нуклеокапсида HBc и малого поверхностного антигена HBs, разделенных саморасщепляющейся областью 2А вируса ящура (FMDV) [Donnelly et al. 2001]. Область 2А ящура обеспечивает процессинг слитых HBc-HBs в отдельные белковые антигены. Кроме

того, N-концевая часть гена, кодирующего белок HBc, была слита с геном, кодирующим изоформу р35 инвариантной цепи (hIi), ассоциированной с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) класса II. Схематическое представление последовательности трансгена hIi-HBV представлено на Фиг. 22.

Область 2A (18 аминокислот) была дополнена спейсером из 6 аминокислот на ее N-конце; сообщалось, что спейсеры такого типа увеличивают эффективность 2A-опосредованного расщепления. Опосредованное областью 2A расщепление протеазой происходит на C-конце 2A непосредственно перед последним пролином в аминокислотной последовательности 2A. Пролин остается на N-конце белка HBs, в то время как 23 аминокислоты, предшествующие сайту расщепления пролина, остаются с полипептидом hIi-HBc-2A.

Таким образом, экспрессия трансгена после обработки протеазой приводит к получению двух отдельных полипептидов: hIi-HBc-спейсер-2A и HBs. Для краткости полипептид hIi-HBc-спейсер-2A называют белком hIi-HBc. При экспрессии в клеточной культуре антиген hIi-HBc обнаруживается в культуральной надосадочной жидкости, тогда как белок HBs обнаруживается во внутриклеточной фракции.

Экспрессионная кассета, кодирующая антигенные белки, функционально связанные с регуляторными компонентами таким образом, который обеспечивает экспрессию в клетке-хозяине, собирается в плазмидную конструкцию на основе вектора ChAd155, как описано ранее (см. WO2016/198621, включенный путем ссылки с целью изложения последовательностей вектора ChAd155 и способов) для получения ChAd155-hIi-HBV. Трансген hIi-HBV находится под транскрипционным контролем промотора цитомегаловируса человека (hCMV) и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH рА). Экспрессионная кассета кодирует аминокислотные последовательности HBs, HBc и hIi, в которых последовательность hIi слита с N-концом HBc, а последовательности HBs и HBc разделены спейсером, который включает в себя область расщепления 2A вируса ящура, для процессинга HBc и HBs в отдельные белки.

Для образования рекомбинантных аденовирусов ChAd155, дефектных по репликации, функция области deletированного гена, необходимой для репликации и инфицирующей способности аденовируса, должна обеспечиваться рекомбинантному вирусу вирусом-помощником или клеточной линией, т.е. комплементирующей или пакующей клеточной линией. Особенно подходящей комплементирующей клеточной линией является клеточная линия Procell92. Линия клеток Procell92 получена на основе клеток HEK 293, экспрессирующих гены E1 аденовируса, трансфицированных Tet

репрессором под контролем промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK) человека, и ген устойчивости к G418 (Vitelli et al. *PLOS One* (2013) 8(e55435):1-9). Procell92.S адаптирована для роста в суспензии и может найти применение в получении аденовирусных векторов, экспрессирующих токсичные белки.

Получение лекарственного вещества ChAd155-hIi-HBV:

Получение вирусных частиц ChAd155-hIi-HBV (лекарственное вещество) включает культивирование клеток Procell-92.S до плотности 5×10^5 клеток/мл при инфицировании. Затем клетки инфицируют главным вирусным посевным материалом (MVS) ChAd155-hIi-HBV при множественности заражения 200 вч/клетку. Собранный вирус ChAd155-hIi-HBV очищают после лизиса клеток, осветления лизата и концентрирования (стадии фильтрации) с помощью многостадийного процесса, который включает анионообменную хроматографию.

Составление вакцин и заполнение

Затем с очищенным нерасфасованным лекарственным веществом ChAd155-hIi-HBV производят следующие операции:

- Разводят очищенное лекарственное вещество ChAd155-hIi-HBV в рецептурном буфере.
- Стерилизуют фильтрованием.
- Заполняют контейнеры для готовой продукции.

Вакцина ChAd155-hIi-HBV представляет собой жидкую композицию, содержащуюся во флаконах. Рецептурный буфер включает трис (10 мМ), L-гистидин (10 мМ), NaCl (75 мМ), MgCl₂ (1 мМ) и ЭДТА (0,1 мМ) с сахарозой (5% мас./об.), полисорбат-80 (0,02% мас./об.) и этанол (0,5% мас./об.), доведенный до pH 7,4 с помощью HCl (вода для инъекций до конечного объема).

- **MVA-HBV:**

MVA-HBV представляет собой рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), несущий два различных белка HBV: Белок Core и белок S, разделенные пептидом 2A. Конструкция MVA-HBV была создана на основе векторной системы MVA-Red [Di Lullo et al. 2010], полученной из серии посевного вирусного материала MVA, ослабленного в результате 571 пассажа (названного MVA-571), который был описан профессором Антоном Майром [Maug, A. et al. 1978].

Трансген MVA-HBV кодирует коровый белок нуклеокапсида HBc и малый поверхностный антиген HBs вируса гепатита В. Последовательность HBc-HBs разделена саморасщепляющейся областью 2A вируса ящура, которая обеспечивает процессинг

слитого белка в отдельные антигены HBc и HBs, как описано выше для аденовирусного вектора. Схематическое изображение трансгена представлено на Фиг. 21.

Экспрессия трансгена после обработки протеазой приводит к образованию двух отдельных полипептидов: HBc-спейсер-2А и HBs. Для краткости полипептид HBc-спейсер-2А называют белком HBc.

Экспрессионную кассету субклонировали в челночный вектор MVA p94-elisaRen с получением вектора для переноса генов p94-HBV. p94-HBV содержит кассету для экспрессии антигена под контролем раннего/позднего промотора осповакцины P7.5 и фланкированного областями FlankIII-2 и FlankIII-1, чтобы обеспечить вставку в del III MVA путем гомологичной рекомбинации.

Получение рекомбинантного вируса основано на двух событиях рекомбинации *in vivo* в клетках CEF.

Вкратце, первичные фибробласты эмбрионов кур (CEF) инфицировали MVA-Red и затем трансфицировали p94-HBV, несущим трансгенный антиген (а также маркерный ген EGFP под контролем синтетического промотора sP). Первое событие рекомбинации происходит между гомологичными последовательностями (области FlankIII-1 и -2), присутствующими как в геноме MVA-Red, так и в векторе для переноса p94-HBV, и приводит к замене гена белка Hcred на кассету, несущую трансген/eGFP. Инфицированные клетки, содержащие интермедиат MVA-Green, выделяют путем сортировки методом FACS и используют для инфицирования свежих CEF. Промежуточный рекомбинантный MVA, полученный в результате первой рекомбинации, несет и трансген, и кассету eGFP, но нестабилен из-за присутствия повторяющихся Z-областей.

Следовательно, происходит спонтанное второе событие рекомбинации с участием Z-областей, в результате чего происходит удаление кассеты eGFP. Полученный рекомбинантный MVA является бесцветным и несет трансгенную кассету.

Наконец, клетки, инфицированные рекомбинантным вирусом без маркера (MVA-HBV), сортировали с помощью FACS, клонировали MVA-HBV с использованием предельного разведения и размножали в CEF с использованием стандартных методов.

Получение лекарственного вещества MVA-HBV

Вирусные частицы MVA-HBV (лекарственное вещество) получали в первичных культурах клеток фибробластов куриных эмбрионов (CEF) при плотности клеток от 1Е6 до 2Е6 клеток/мл, а затем инфицировали главным посевным вирусным материалом MVA-HBV (MVS) при множественности заражения от 0,01 до 0,5 БОЕ/клетку. Собранный вирус

MVA-HBV очищали в ходе многоступенчатого процесса, основанного на осаждении центрифугированием, ресуспендировании и центрифугировании в градиенте плотности.

Составление вакцин и заполнение

Затем с очищенным нерасфасованным лекарственным веществом MVA-HBV производят следующие операции:

- Разводят очищенное лекарственное вещество MVA-HBV DS в рецептурном буфере.
- Заполняют контейнеры для готовой продукции.

Вакцина MVA-HBV представляет собой жидкую композицию, содержащуюся во флаконах. Рецептурный буфер включает трис(гидроксиметил)аминометан, pH 7,7 (10 mM), NaCl (140 mM) и воду для инъекций до конечного объема.

- Смесь рекомбинантных белков HBs-HBc:

Получение лекарственного вещества HBc

Способ получения рекомбинантного белка (лекарственного вещества) HBc включает внесение рабочего посевного материала *E. coli* во флакон для предварительного культивирования, последующий процесс ферментации и многостадийный процесс очистки, включающий сбор, экстракцию, осветление и многократную хроматографию и фильтрацию.

Получение лекарственного вещества HBs

Способ получения рекомбинантного белка (лекарственного вещества) HBs включает внесение рабочего посевного материала *S. cerevisiae* во флакон для предварительного культивирования, последующий процесс ферментации и многостадийный процесс очистки, включающий сбор, экстракцию, осветление и многократную хроматографию и фильтрацию

Составление вакцин и заполнение

Очищенные лекарственное вещество HBs и лекарственное вещество HBc разводят в рецептурном буфере, содержащем сахарозу в качестве криозащитного вещества и полоксамер в качестве поверхностно-активного вещества, заполняют и лиофилизируют в прозрачном стеклянном флаконе объемом 4 мл.

ПРИМЕРЫ

Задачи доклинической разработки:

Сильные и функциональные CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточные ответы, особенно на HBcAg, были связаны с элиминацией HBV и разрешением инфекции [Boni, 2012; Li, 2011; Liang, 2011; Lau, 2002; Bertoletti, 2012]. Кроме того, анти-S-антитела предотвращают

распространение вируса гепатита В в неинфицированные гепатоциты и могут играть ключевую роль для контроля возобновления репликации вируса гепатита В после отмены лечения [Rehermann 2005; Neumann 2010]. Предложенная схема вакцинации включает гетерологичную схему прайм-буст с двумя векторными вакцинами на основе вируса (ChAd155-hIi-HBV и MVA-HBV), кодирующими коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и поверхностный (HBs) антиген вируса гепатита В для индукции сильного CD4⁺ Т-клеточного ответа наряду с последовательным или одновременным введением белков HBc-HBs с адьювантом AS01_{B-4} для индукции сильного антигенспецифического CD4⁺ Т-клеточного и гуморального ответа у пациентов с ХГВ. Этот вызванный вакциной иммунный ответ должен в конечном итоге привести к значительному снижению концентрации HBsAg или потере HBsAg (т.е. концентрации HBsAg ниже определяемого уровня), которую считают маркером полного и длительного контроля инфекции HBV.

Основными задачами доклинической разработки были:

- продемонстрировать иммуногенность компонентов исследуемой вакцины, например, ChAd155-hIi-HBV, MVA-HBV и HBC-HBS/AS01_{B-4} у наивных и HBV-толерантных мышей, чтобы руководствоваться этим при выборе векторных конструкций, включении hIi, состава белковой композиции, включая выбор системы адьювантов и схемы иммунизации;
- продемонстрировать безопасность полной схемы вакцинации у HBV-толерантных мышей (исследование, не предусматривающее применение требований надлежащей лабораторной практики) и в исследовании токсичности при многократном введении в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики, проведенном на кроликах NZW.
- документально зафиксировать биораспределение векторов у вакцинированных животных (исследования в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики).

Стратегия доклинической разработки и обоснование выбора моделей на животных

Вначале собрали пакет документов для исследования иммуногенности на здоровых мышах, чтобы руководствоваться этим при выборе векторных конструкций, белковой композиции, включая выбор системы адьювантов, и схемы иммунизации.

Большинство доклинических экспериментов проводили на инбредных мышах СВ6F1 (гибрид мышей C57Bl/6 и BALB/c), модель, использовавшаяся ранее для оценки Т-клеточных ответов, вызванных вакцинами-кандидатами с адьювантом AS01 и аденовирусными векторами [Lorin, 2015], чтобы подтвердить выбор векторных

конструкций, белковой композиции, включая выбор системы адъювантов, и схемы иммунизации.

Мышей HLA.A2/DR1 (трансгенных по человеческим молекулам HLA-A2 и HLA-DR1) использовали для оценки способности вакцины-кандидата индуцировать HBc-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, поскольку такие ответы против этого антигена не наблюдались у мышей CB6F1. Это, скорее всего, связано с отсутствием иммунодоминантного эпитопа (MGLKFRQL), рестриктированного по H2-K^b МНС-I, в последовательности HBc исследуемой вакцины, которая основана на последовательности HBV генотипа A/подтипа *adv*, имеющей отличие в одной аминокислоте, когда изолейцин (I) заменяет фенилаланин (F) в эпитопе (MGLKIRQL), согласно сообщению Riedl *et al.* [Riedl, 2014]. HBV-специфические CD4⁺ Т-клетки и антитела оценивали у тех же мышей HLA.A2/DR1.

Поскольку HBV естественным образом заражает только шимпанзе и людей, число существующих моделей на животных для оценки эффективности терапевтической вакцины ограничено. Разработаны модели на мышах, у которых весь геном HBV экспрессируется либо в результате интеграции вирусного генома в геном хозяина (трансгенных по HBV мышей), либо в результате инфицирования репликативной формой ДНК HBV или векторами, экспрессирующими геном HBV. Хотя они не воспроизводят хронический патогенез HBV, в печени могут быть обнаружены промежуточные продукты репликации и белки вируса, и наблюдается иммунная толерантность.

Модель на мышях HLA.A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV, воспроизводит вирусологические и иммунологические характеристики хронической инфекции HBV и была выбрана [Dion, 2013; Martin, 2015]

- чтобы продемонстрировать, что схема вакцинации может преодолеть толерантность к антигенам HBs и HBc;
- чтобы оценить влияние инфильтрирующих печень HBc-специфических CD8⁺ Т-клеток, потенциально нацеленных на гепатоциты, экспрессирующие HBcAg, на гистологию печени (окрашивание гематоксилин-эозином [H&E]) и уровни АЛТ/АСТ.

Наконец, для оценки вакцин-кандидатов были выбраны стандартные модели на животных для исследования биораспределения (крысы Sprague-Dawley) и токсикологических исследований (кролики NZW), поскольку, хотя они и не являются животными для моделирования инфекции, они способны выработать фармакологически релевантные иммунные ответы на экспрессируемые векторами и рекомбинантные белки, и являются общепринятыми видами для исследования токсичности вакцин. Эти виды

также ранее использовались в программах токсикологических исследований адьюванта AS01_{B-4} и его иммуно-энхансеров, MPL и QS-21.

Доклинические фармакологические исследования

Проводили ряд доклинических исследований для демонстрации иммуногенности компонентов исследуемой вакцины, например, ChAd155-hIi-HBV, MVA-HBV и HBS-HBS/AS01_{B-4} у наивных и HBV-толерантных животных после внутримышечного введения. Антигенспецифический профиль иммуногенности сначала оценивали отдельно для вирусных векторов (ChAd155-hIi-HBV и MVA-HBV) и исследуемой вакцины рекомбинантного белка HBV (HBS-HBS/AS01_{B-4}) с адьювантом. Профиль иммуногенности и безопасности полной схемы вакцинации, впервые применяемой у человека, оценивали на второй фазе.

Материалы

Дозы системы адьювантов AS01, используемой в доклинических исследованиях иммуногенности

Система адьювантов AS01_{B-4} содержит иммуно-энхансеры QS-21 (тритерпеновый гликозид, выделенный из коры *Quillaja saponaria*) и MPL (3-D монофосфориллипид А), а также липосомы в качестве носителей для этих иммуно-энхансеров и сорбит. В частности, одна человеческая доза AS01_{B-4} (0,5 мл) содержит 50 мкг QS-21 и 50 мкг MPL. 1/10 человеческой дозы, т.е. 50 мкл - это объем, вводимый мышам (соответствует 5 мкг QS-21 и MPL).

Система адьювантов AS01_{E-4} соответствует двукратному разведению разведения AS01_{B-4}. 1/10 человеческой дозы, т.е. 50 мкл - это объем, вводимый мышам (соответствует 2,5 мкг QS-21 и MPL).

Клеточный иммунный ответ - окрашивание на внутриклеточные цитокины (ICS)

Свежие пулы лейкоцитов периферической крови (PBL), спленоцитов или инфильтрирующих печень лимфоцитов, собранных в разные моменты времени, стимулировали *ex vivo* в течение 6 часов с использованием пулов 15-меров, перекрывающихся 11 аминокислотами и охватывающих последовательность HBS или HBS. HBS и HBS-специфические клеточные ответы оценивали при помощи ICS, измеряя количество CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ и/или IL-2, и/или фактор некроза опухоли (TNF)- α . Технические критерии приемлемости результатов ICS включают минимальное количество зарегистрированных CD8⁺ Т или CD4⁺ Т-клеток, составляющее более 3000 событий. В качестве альтернативы, IFN- γ -ELISpot проводили после повторной стимуляции спленоцитов теми же пептидами, что и для ICS.

Гуморальный иммунный ответ - иммуноферментный анализ (ELISA)

HBs- и HBs-специфические гуморальные ответы измеряли при помощи ELISA в сыворотке иммунизированных мышей в разные моменты времени. Вкратце, на поверхности 96-луночных планшетов иммобилизовали антигены HBs или HBs. Затем добавляли серии разведений индивидуальных образцов сыворотки и инкубировали в течение 2 часов. Затем добавляли биотинилированный F(ab)'₂ -фрагмент к IgG мыши и выявляли комплекс антиген-антитело путем инкубации с комплексом стрептавидина и пероксидазы хрена и субстратом пероксидазы орто-фенилендиамина дигидрохлоридом/H₂O₂. Для каждого момента времени и каждого антигена (HBs, HBs) проводили дисперсионный анализ (ANOVA) значений титров, подвергнутых log₁₀ преобразованию, включая группу, исследование и взаимодействие в качестве фиксированных эффектов и используя модель гетерогенной дисперсии (исходя из предположения, что вариации между группами не равны). Эту модель использовали для оценки средних геометрических значений (и их 95% ДИ), а также отношений средних геометрических и их 95% ДИ. Поскольку не были установлены заранее определенные критерии, анализ носил описательный характер, и 95% ДИ отношений между группами рассчитывали без поправки на множественность сравнений.

Определение АЛТ/АСТ

Уровни АЛТ и АСТ в сыворотке мышей определяли количественно с использованием следующих коммерческих наборов:

- Набор для анализа активности аланин-аминотрансферазы Sigma Aldrich кат. номер MAK052
- Набор для анализа активности аспартат-аминотрансферазы Sigma Aldrich кат. номер MAK055

Количественное определение антигена HBs в сыворотке

Количественно определение циркулирующего HBs антигена в сыворотке мышей проводили с использованием набора Monolisa Anti-HBs PLUS от BIO-RAD (кат. номер 72566) и международного стандарта (Abbott Diagnostics).

Гистопатологический анализ

Печени (одна доля на печень) собирали и хранили в 10% фиксирующем растворе формальдегида. Все образцы для микроскопического исследования подготавливали в соответствии с рекомендациями RITA [Ruehl-Fehlert, 2003; Kittel 2004; Morawietz 2004], погружали в парафиновый воск, делали срезы толщиной приблизительно 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Оценку гистологической активности

(некровоспалительные поражения) и фиброза проводили по шкале METAVIR [Bedossa, 1996; Mohamadnejad, 2010; Rammeh, 2014]. Средоточия воспалительных клеток оценивали по шкале Desmet, как описано Buchmann *et al.* [Buchmann, 2013].

Статистический анализ, выполненный в каждом исследовании, подробно описан в разделах, относящихся к каждому отдельному исследованию.

Пример 1 - Оценка примиряющей вакцинации с применением ChAd155-HBV (с hIi и без hIi) и бустерной вакцинации с применением MVA-HBV в модели на трансгенных мышях HLA.A2/DR1

Задачи

Основная задача этого эксперимента состояла в том, чтобы определить, способно ли примирование одной дозой ChAd155-HBV (с или без hIi) с последующей бустерной дозой MVA-HBV индуцировать сильный CD8⁺ Т-клеточный ответ против HBs у мышей HLA.A2/DR1, которые являются трансгенными по молекулам МНС-I/II человека. Кроме того, провели прямое сравнение ChAd155-HBV с hIi и без hIi, чтобы исследовать потенциал последовательности hIi для дальнейшего усиления HBs-специфических CD8⁺ Т-клеточных ответов, как ранее сообщалось для других антигенов [Spencer, 2014; Carone 2014]. Также оценивали HBs-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, а также HBs- и HBs-специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы и антитела.

Схема исследования

Мышей HLA.A2/DR1 (11 мышей в группе) иммунизировали 10⁸ вч ChAd155-HBV (с и без hIi) внутримышечным путем в День 0 и осуществляли бустерную инъекцию 10⁷ БОЕ MVA-HBV (без hIi) в День 28 (Таблица 1). Мышей подвергали эвтаназии на 14 день после первой иммунизации (14dpi) (примирование) или через 7 дней после второй иммунизации (7dpi) (бустерная инъекция) для определения HBs- и HBs-специфических гуморальных и клеточных иммунных ответов в сыворотке и селезенке соответственно.

Таблица 1. Схема исследования в эксперименте с первичной иммунизацией ChAd155-HBV (с hIi и без) / бустерной иммунизацией MVA-HBV (без hIi) мышей HLA.A2/DR1

Группы	Первичная инъекция	Бустерная инъекция	Эвтаназия
1	10^8 вч ChAd155-HBV (День 0)	10^7 БОЕ MVA-HBV (День 28)	14dpI и 7dpII
2	10^8 вч ChAd155-hIi-HBV (День 0)	10^7 БОЕ MVA-HBV (День 28)	14dpI и 7dpII
3	NaCl (День 0)	NaCl (День 28)	14dpI и 7dpII

Статистический анализ

После \log_{10} преобразования частот встречаемости $CD8^+$ Т-клеток проводили ANOVA, включая 2 группы (с или без hIi) и эксперименты (результаты 3 экспериментов после первичной иммунизации и результаты 2 экспериментов после бустерной иммунизации) в качестве фиксированных параметров и используя модель гетерогенной дисперсии. Эту модель использовали для оценки средних геометрических значений (и их 95% ДИ), а также отношений средних геометрических и их 95% ДИ.

Результаты

НВс- и НВs-специфический Т-клеточный ответ

Оба вектора ChAd155-HBV и ChAd155-hIi-HBV индуцировали НВс-специфический $CD8^+$ Т-клеточный ответ (Фиг. 1А). Присутствие hIi имеет тенденцию индуцировать более высокий $CD8^+$ Т-клеточный ответ против антигена НВс. Бустерная инъекция MVA-HBV индуцировала у мышей, иммунизированных ChAd155-hIi-HBV, 3-кратное увеличение НВс-специфических $CD8^+$ Т-клеточных ответов, в то время как в группе ChAd155-HBV никакого увеличения не наблюдалось.

Оба вектора индуцировали НВs-специфические $CD8^+$ Т-клеточные ответы, и бустерный эффект MVA-HBV был более выраженным у мышей, получивших первичную иммунизацию конструкцией ChAd155-HBV (Фиг. 1В).

НВс- и НВs-специфические $CD4^+$ Т-клеточные ответы были низкими (данные не показаны).

Результаты этого эксперимента согласовывались с результатами двух других аналогичных независимых экспериментов (данные не показаны). Хотя каждое исследование в отдельности не обладало достаточной статистической мощностью для сравнения групп из-за ограничений, связанных с наличием животных, проводили мета-анализ по трем исследованиям, чтобы сравнить НВс-специфические $CD8^+$ Т-клеточные

ответы, индуцированные ChAd155-HBV и ChAd155-hIi-HBV, после первичной иммунизации и бустерной иммунизации MVA-HBV.

Статистический анализ показал, что HBc-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, индуцированные иммунизацией по схеме прайм-буст с использованием конструкции ChAd155-hIi-HBV, были значительно выше, чем те, которые были вызваны иммунизацией по схеме прайм-буст с использованием ChAd155-HBV, после примирования и бустерной инъекции MVA-HBV, обосновывая применение последовательности человеческой инвариантной цепи, слитой с последовательностью HBc.

- а) Через 14 дней после введения дозы I среднее геометрическое соотношение (hIi / без hIi) по подсчетам составило 3,27 (95% ДИ: 1,57 - 6,79).
- б) Через 7 дней после введения дозы II среднее геометрическое соотношение (hIi / без hIi) по подсчетам составило 6,25 (95% ДИ: 2,11 - 18,51).

HBc- и HBs-специфические гуморальные ответы

Иммунизация ChAd155-HBV, но не ChAd155-hIi-HBV-индуцировала HBc-специфические антитела. После бустерной инъекции MVA-HBV гуморальный ответ, направленный против HBc, в группах, примированных ChAd155-HBV или ChAd155-hIi-HBV был сопоставим (Фиг. 2). Никакого HBs-специфического гуморального ответа не выявляли (данные не показаны).

Заключение

ChAd155-hIi-HBV индуцировал самый высокий CD8⁺ Т-клеточный ответ против HBc по сравнению с ChAd155-HBV, и этот ответ еще более усиливался после бустерной инъекции MVA-HBV.

Пример 2 - исследование иммуногенности HBc-HBs/AS01_{B-4} у инбредных мышей (CB6F1)

Задачи

Основная задача этого исследования иммуногенности состояла в том, чтобы определить, способны ли белки HBc и HBs индуцировать HBc- и HBs-специфические гуморальный и Т-клеточный ответы при составлении вместе с AS01_{B-4}.

Схема исследования

Мышей CB6F1 (30 мышей на группу) в возрасте от 6 до 8 недель иммунизировали три раза внутримышечно в 0, 14 и 28 день HBc, HBs или HBc-HBs в 50 мкл AS01_{B-4} (перечислены в Таблице 2 ниже). HBc- и HBs-специфические Т-клеточные ответы измеряли на свежих PBL через 7 дней после второго и третьего введения, а анти-HBs и анти-HBc гуморальные ответы измеряли через 14 дней после второго и третьего введения.

Таблица 2. Группы воздействия

Группы	Антиген
1	1 мкг НВс/AS01 _{B-4} (НВс/AS01 _{B-4})
2	1 мкг НВs/AS01 _{B-4} (НВs/AS01 _{B-4})
3	1 мкг НВс + 1 мкг НВs/AS01 _{B-4} (НВс-НВs/AS01 _{B-4})
4	NaCl

Статистический анализ

Проводили статистический анализ значений, подвергнутых \log_{10} преобразованию, включая в ANOVA 1 фактор (группа) и используя модель гетерогенной дисперсии, то есть исходя из предположения, что вариации неодинаковы при различных величинах фактора. Этот анализ был выполнен по моментам времени (после 2-й и после 3-й иммунизации), по Т-клеточному ответу ($CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки) и антигенной специфичности (НВs и НВс). Отношения средних геометрических значений между группами и их 95% доверительных интервалов (ДИ) оценивали с использованием обратного преобразования значений \log_{10} . Для внесения поправки на множественные сравнения применяли метод Тьюки. Установили 95% доверительные интервалы, скорректированные на множественные сравнения.

Результаты**НВс- и НВs-специфические Т-клеточные ответы**

Иммунизация мышей НВс/AS01_{B-4}, НВs/AS01_{B-4} или НВс-НВs/AS01_{B-4} индуцировала мощный $CD4^+$ Т-клеточный ответ против обоих антигенов (Фиг. 3). Величина НВс-специфического ответа $CD4^+$ Т-клеток была значительно ниже (в 2,3 раза, значение $P = 0,0468$) для состава НВс-НВs/AS01_{B-4} по сравнению с НВс/AS01_{B-4}, что предполагает интерференцию НВs с НВс-специфическими Т-клеточными ответами. Тем не менее, уровень НВс-специфических $CD4^+$ Т-клеток все еще считался высоким, значительно превосходящим контрольную группу. Такой интерференции с величиной НВs-специфического ответа $CD4^+$ Т-клеток не наблюдалось.

Составы НВs/AS01_{B-4} или НВс-НВs/AS01_{B-4} индуцировали сильный НВs-специфический $CD8^+$ Т-клеточный ответ (Фиг. 4). Ни один из кандидатов в вакцины не вызывал детектируемый НВс-специфический $CD8^+$ Т-клеточный ответ (данные не показаны), как и ожидалось для этой модели на мышах, из-за отсутствия в последовательности НВс нашей вакцины-кандидата H2-K^b МНС-I рестриктированного

иммунодоминантного эпитопа MGLKFRQL, как сообщалось другими исследователями [Riedl, 2014].

HBc- и HBs-специфические гуморальные ответы

Все три состава индуцировали высокие уровни антител против HBc и/или против HBs (см. Фиг. 5). Значительно более низкий уровень гуморального ответа, направленного против HBc, наблюдался для состава HBC-HBs/AS01_{B-4} по сравнению с HBc/AS01_{B-4} (в 2,35 раза, $P < 0,0001$). Напротив, присутствие HBc в комбинации HBc-HBs/AS01_{B-4} не оказывало негативного влияния на гуморальный ответ против HBs (Фиг. 5).

Заключение

Все составы (HBs/AS01_{B-4}, HBc/AS01_{B-4} и HBc-HBs/AS01_{B-4}) были иммуногенными и индуцировали как клеточные, так и гуморальные ответы против обоих антигенов, за исключением HBc-специфических CD8⁺ Т-клеточных ответов (как и ожидалось в этой модели). Ответ против HBc, вызванный составом HBc-HBs/AS01_{B-4}, был ниже, чем ответ, вызванный HBc/AS01_{B-4}, что предполагает интерференцию, связанную с присутствием HBs в этой модели на мышах. Эту интерференцию оценивали дополнительно; см. Пример 7, где соотношение HBc к HBs 4:1 позволяло восстановить иммунный ответ против HBc (антител и специфических CD4⁺ Т-клеток), не влияя на гуморальный ответ против HBs. Этот состав, HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} выбрали для дальнейших доклинических исследований иммуногенности с применением белковых составов, содержащих адьюванты.

Пример 3 - Сравнение адьювантов в эксперименте на инбредных мышах (СВ6F1)

Задачи

Основная задача данного эксперимента заключалась в том, чтобы сравнить способность антигенов HBc и HBs в соотношении 4:1, в составах с различными адьювантами (гидроксид алюминия, AS01_{B-4} или AS01_{E-4}) или без адьюванта индуцировать сильный CD4⁺ Т-клеточный и гуморальный ответ на оба антигена.

Схема исследования

Мышей СВ6F1 (35 мышей для групп 1-4 и 25 мышей для группы 5) в возрасте от 6 до 8 недель иммунизировали три раза внутримышечно в Дни 0, 14 и 28 антигенами HBc-HBs (4 мкг-1 мкг) в составах с гидроксидом алюминия, AS01_{B-4} или AS01_{E-4} (перечислены в Таблице 3 ниже). Система адьювантов AS01_{E-4} содержит половину количества иммуноэнхансеров QS-21 и MPL по сравнению с AS01_{B-4}. HBc- и HBs-специфические Т-клеточные ответы измеряли на свежих PBL через 7 дней после второго и третьего введения, после 6-часовой повторной стимуляции *ex vivo* пулами пептидов и измеряли

гуморальные ответы против HBs и против HBc методом ИФА через 14 дней после второго и третьего введения.

Таблица 3. Группы воздействия

Группы	Антиген
1	HBc-HBs 4-1
2	HBc-HBs 4-1/гидроксид алюминия
3	HBc-HBs 4-1 /AS01 _{B-4}
4	HBc-HBs 4-1/AS01 _{E-4}
5	NaCl

Статистический анализ

В ходе статистического анализа частоты встречаемости Т клеток подвергали \log_2 преобразованию, а значения титров антител подвергали \log_{10} преобразованию, включали в ANOVA в качестве фиксированного эффекта группу воздействия и использовали модель гетерогенной дисперсии (исходя из предположения, что вариации между группами не равны, группу, получавшую NaCl, исключали из анализа). Данную модель использовали для оценки средних геометрических (и их 95% ДИ), а также соотношения средних геометрических (AS01_B в 3 других группах) и их 95% ДИ. Применяли поправку Даннетта к доле HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток (основная конечная точка) и титрам антител против HBs (вторичная конечная точка), измеренным через 14 дней после третьего введения. Для других ответов/моментов времени анализ носил описательный характер, и поправку не применяли.

Результаты

HBc- и HBs-специфические Т-клеточные ответы

Составы с адьювантами AS01 вызывали значительно более выраженные HBc-специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы по сравнению с гидроксидом алюминия в качестве адьюванта и составами без адьюванта (Фиг. 6B). Статистически значимых различий между составами AS01_{B-4} и AS01_{E-4} не наблюдалось. Как ранее наблюдалось у мышей CB6F1, HBc-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ не обнаруживался независимо от тестируемого состава (данные не показаны).

HBs-специфические CD4⁺ (Фиг. 6A) и CD8⁺ (Фиг. 6C) Т-клеточные ответы были значительно выше для составов с адьювантами AS01 по сравнению с использованием в

качестве адъюванта гидроксида алюминия и составами без адъювантов. Статистически значимых различий между составами AS01_{B-4} и AS01_{E-4} не наблюдалось.

HBc- и HBs-специфические гуморальные ответы

Составы с адъювантами AS01 вызывали значительно более выраженное образование HBc- и HBs-специфических IgG по сравнению с адъювантом гидроксид алюминия и составами без адъюванта (Фиг. 7). Суммарное образование IgG, вызванное составами с адъювантами AS01_{B-4} и AS01_{E-4}, достоверно не различалось.

Заключение

В целом, система адъювантов AS01 (AS01_{E-4} или AS01_{B-4}) индуцировала наиболее выраженные гуморальные и клеточные ответы против HBc и HBs по сравнению с составами на основе гидроксида алюминия или составами без адъювантов у мышей СВ6F1.

Пример 4 - Оценка иммуногенности схем вакцинации ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV/HBs-HBc/AS01_{B-4} у трансгенных мышей HLA.A2/DR1

Задачи

Задача данного исследования состояла в том, чтобы оценить иммуногенность различных схем вакцинации прайм/буст с применением вирусных векторов ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV с последующим или совместным введением двух доз белков HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}.

Схема исследования

Первую группу мышей (N = 16) иммунизировали в День 0 ChAd155-hIi-HBV с последующим введением MVA-HBV через 28 дней. После этого введения вирусных векторов по схеме прайм/буст вводили две дозы HBc-HBs 4-1 мкг/AS01_{B-4} с интервалом 14 дней (Таблица 4). Вторую группу мышей (N = 16) иммунизировали ChAd155-hIi-HBV and HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} в День 0, а 28 дней спустя выполняли бустерную инъекцию MVA-HBV, который вводили совместно с HBc-HBs 4-1/AS01_B. Две последующие совместные иммунизации MVA-HBV и HBc-HBs 4-1/AS01_B выполняли с интервалом в 14 дней (Таблица 4). Третьей группе мышей (N = 8) вводили NaCl в качестве отрицательного контроля. Мышей подвергали эвтаназии через 7 дней после второй (7dpII) и после четвертой иммунизации (7dpIV) для определения HBc- и HBs-специфических гуморальных (сыворотки) и клеточных иммунных ответов (спленоциты и инфильтрирующие печень лимфоциты).

Это исследование было описательным, статистическое обоснование размера выборки и статистический анализ не проводили.

Таблица 4. Группы воздействия

Группы	День 0	День 28	День 42	День 56	Эвтаназия
1	10 ⁸ вч ChAd155-hIi-HBV	10 ⁷ БОЕ MVA-HBV	HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	7dpII и 7dpIV
2	10 ⁸ вч ChAd155-hIi-HBV + HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	10 ⁷ БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	10 ⁷ БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	10 ⁷ БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1/AS01 _{B-4}	7dpII и 7dpIV
3	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	7dpII и 7dpIV

Результаты

HBc- и HBs-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ (спленоциты)

Совместное введение HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} с вектором ChAd155-hIi-HBV в качестве праймирующего и с вектором MVA-HBV в качестве бустерного (группа 2) вызывало 4-кратное увеличение HBc-специфического CD8⁺ Т-клеточного ответа по сравнению с инъекцией только ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV (группа 1) на 7dpII (Фиг. 8). Схожий CD8⁺ Т-клеточный ответ против HBs был индуцирован в обеих группах (Фиг. 8).

На 7dpIV HBc-специфический, но не HBs-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ явно усиливался после последующих введений HBc-HBs/AS01_{B-4} (5-кратное увеличение по сравнению с 7dpII) (Группа 1). Дальнейшее увеличение HBc- или HBs-специфических CD8⁺ Т-клеток не наблюдалось при совместном введении двух дополнительных доз MVA-HBV/HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} (Группа 2).

HBc- и HBs-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ (спленоциты)

Низкие уровни HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток обнаруживали после первичной иммунизации ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV (медиана 0,17% и 0,11% соответственно) (Группа 1), тогда как выраженный ответ против обоих антигенов наблюдали на 7 dpII при совместном введении HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} и иммунизацией по схеме прайм-буст ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV (группа 2) (Фиг.9).

Последующие введения HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} после иммунизации ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV по схеме прайм-буст (группа 1) значительно усиливали как HBc-, так и HBs-специфические Т-клеточные ответы на 7dpIV (медиана 1,64% и 2,32% соответственно). Наконец, наблюдалось значительное увеличение HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток, когда две дополнительные дозы MVA-HBV и HBc-HBs/AS01_{B-4} совместно

вводили мышам, уже вакцинированным ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV по схеме прайм-буст с введением HBc-HBs/AS01_{B-4} (группа 2) в тот же момент времени. В этой группе HBc-специфические CD4⁺ Т-клетки оставались на том же уровне, что и на 7-й день после II введения.

HBc- и HBs-специфические Т-клеточные ответы, зарегистрированные в инфильтрирующих печень лимфоцитах

Через 7 дней после последней иммунизации наличие индуцированных вакцинацией Т-клеточных ответов в печени исследовали методом ICS. Чтобы иметь достаточное количество инфильтрирующих печень лимфоцитов для повторной стимуляции *in vitro* и ICS, для каждой экспериментальной точки на графике собирали пул клеток, выделенных после того, как 3 или 4 печени перфузировали. Из-за малого количества экспериментальных точек статистический анализ не проводили, и результаты носят описательный характер.

Обе схемы вакцинации вызывали появление HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток, обнаруживаемых в печени вакцинированных мышей (Фиг. 10). В печени животных, вакцинированных согласно обеим схемам вакцинации, регистрировали выраженные HBc-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, тогда как доля HBs-специфических CD8⁺ Т-клеток была существенно более низкой.

HBc- и HBs-специфический гуморальный ответ

Совместное введение ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV и HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} (Группа 2) индуцировало наибольшее количество антител против HBc на 7dpII (Фиг. 11). Последующие инъекции MVA-HBV + HBc-HBs/AS01_{B-4} не приводили к дополнительному повышению уровня антител против HBc (7dpIV). Явное увеличение анти-HBc-специфического гуморального ответа наблюдалось на 7dpIV после инъекций HBc-HBs/AS01_{B-4} мышам, предварительно иммунизированным ChAd155-hIi-HBV и MVA-HBV (Группа 1). Присутствие в схеме компонента HBc-HBs/AS01_{B-4}, по-видимому, важно для выработки сильного гуморального ответа на HBs, поскольку у животных после иммунизации ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV анти-HBs антител не выявляли (Фиг. 11). Наибольший по величине ответ наблюдали в группе совместного введения (группа 2) после последней иммунизации.

Выводы

У трансгенных мышей HLA.A2/DR1 ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV вызывал низкий, но детектируемый HBc-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ, который явно усиливался HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}. Первоначальная первичная иммунизация ChAd155-hIi-

HBV/MVA-HBV индуцировала мощные HBc- и HBs-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, причем HBc-специфические ответы еще более усиливались вслед за последовательным бустерным введением HBc-HBs/AS01_{B-4}.

Интересно, что, когда ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV вводили совместно с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, высокие уровни HBc- и HBs-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и антител появлялись только после двух иммунизаций. Последующие иммунизации MVA-HBV + HBc-HBs/AS01_{B-4} не приводили к дальнейшему усилению этих ответов.

Кроме того, индуцированные вакцинацией HBc- и HBs-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки также обнаруживали в печени животных, вакцинированных согласно обеим схемам вакцинации.

Пример 5. Оценка толерантности Т- и В-клеток к последовательности «инвариантной цепи» Ii, кодируемой вектором ChAd155: использование конструкции ChAd155, кодирующей последовательность Ii мыши (mIi) у мышей CB6F1

Задачи

Исследование иммуногенности проводили на мышах CB6F1 для изучения толерантности Т- и В-клеток к последовательности «инвариантной цепи» Ii в гомологичной модели с использованием конструкции ChAd155, кодирующей последовательность Ii мыши (mIi): ChAd155-mIi-HBV.

Схема исследования

Индукцию аутологичных mIi-специфических иммунных ответов оценивали с помощью IFN-γ ELISpot (в спленоцитах) и с помощью ELISA (в сыворотке крови) после 2 внутримышечных иммунизаций (День 0 и 14) высокой дозой (10⁹ вч) вектора ChAd155-mIi-HBV (Таблица 5).

Таблица 5. Группы воздействия

Группы	Составы
1	ChAd155-mIi-HBV (10 ⁹ вч) в Дни 0 и 14
2	PBS в Дни 0 и 14

Методы

В случае Т-клеточных ответов в качестве антигена в анализе IFN-γ-ELISpot использовали пул 15-мерных пептидов, перекрывающихся 11 аминокислотами и охватывающих последовательность мышшиной Ii. В случае гуморального ответа для иммобилизации на поверхности планшетов и в качестве положительного контроля

использовали имеющийся в продаже рекомбинантный белок Ii мыши и моноклональное антитело, специфичное к Ii мыши, соответственно. В качестве положительного контроля «получения вакцины» отслеживали HBc- и HBs-специфические Т-клеточные ответы в анализе IFN- γ -ELISpot.

Результаты

После первой и второй иммунизации ChAd155-mIi-HBV регистрировали мощный HBc-специфический Т-клеточный ответ и более низкий, но детектируемый HBs-специфический Т-клеточный ответ. Следует отметить, что в эту конструкцию был добавлен HBc K_b-рестриктированный доминантный эпитоп класса I (MGLKFRQL), чтобы позволить наблюдать за HBc-специфическим ответом CD8⁺ Т-клеток у этой линии мышей, и в анализе ELISpot спленоциты повторно стимулировали этой конкретной последовательностью. Никаких антител против mIi (Фиг. 13) и mIi-специфических Т-клеток не было обнаруживали ни у одного животного через 2 недели после первой или второй иммунизации (Фиг. 12), что позволяет предположить, что иммунная толерантность к последовательности mIi была сохранена.

Пример 6 - Оценка иммуногенности и безопасности схем вакцинации ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV/HBc-HBs/AS01_{B-4} у мышей HLA.A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV

Задачи

Модель на мышах HLA.A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV, воспроизводит вирусологические и иммунологические характеристики хронической инфекции HBV. В этой модели печень мышей трансдуцируют вектором на основе аденоассоциированного вируса серотипа 2/8 (AAV2/8), несущим способный к репликации геном ДНК HBV.

Одна инъекция в хвостовую вену 5×10^{10} вг (вирусный геном) вектора AAV2/8-HBV приводит к репликации HBV и экспрессии генов в печени мышей, трансдуцированных AAV2/8-HBV [Dion; 2013]. Промежуточные продукты репликации ДНК HBV, РНК-транскрипты HBV и антигены HBc обнаруживают в печени вплоть до 1 года после инъекции в отсутствие существенного воспаления печени. Антигены HBs и HBe и ДНК HBV можно обнаружить в сыворотке вплоть до 1 года. Кроме того, в этой суррогатной модели хронической инфекции HBV наблюдается установление иммунной толерантности к антигенам HBV.

Задачи этого исследования, проведенного на трансдуцированных AAV2/8-HBV мышах HLA.A2/DR1, заключались в следующем:

- продемонстрировать, что схема вакцинации может преодолеть толерантность к антигенам HBs и HBc;
- оценить влияние инфильтрирующих печень HBc-специфических CD8⁺ Т-клеток, потенциально нацеленных на гепатоциты, экспрессирующие HBcAg, по гистологии печени (окрашивание гематоксилин-эозином) и уровням АСТ и АЛТ, как суррогатным параметрам для оценки функции печени.

Схема исследования

Исследовали две разные схемы вакцинации, основанные на последовательной иммунизации ChAd155-hIi-HBV и MVA-HBV (обе кодируют коровый [HBc] и поверхностный [HBs] антигены HBV), отдельно или в комбинации с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} с последующими двумя дополнительными дозами HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} (отдельно или в комбинации с MVA-HBV) (Таблица 6).

Мышей HLA.A2/DR1 из групп 1, 2 и 3 трансдуцировали 5×10^{10} вг вектора AAV2/8-HBV (внутривенное введение) в День 0, тогда как группа 4 служила в качестве положительного контроля на иммуногенность (отсутствие установления толерантности до вакцинации).

Животных из группы 1 (N = 21) иммунизировали в День 31 ChAd155-hIi-HBV, а затем MVA-HBV в День 58. После этого введения вирусного вектора по схеме прайм-буст выполняли инъекции двух доз HBc-HBs 4-1 мкг/AS01_{B-4} в Дни 72 и 86 (Таблица 6).

Животных из Группы 2 (N = 21) иммунизировали в День 31 ChAd155-hIi-HBV и совместно вводили HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, а затем в День 58 проводили бустерное введение MVA-HBV совместно с HBc-HBs 4-1/AS01_B. Две последующие совместные иммунизации MVA-HBV и HBc-HBs 4-1/AS01_B выполняли в дни 72 и 86 (Таблица 6).

Животным из Группы 3 (N = 21) выполняли инъекции NaCl в День 31, 58, 72 и 86 в качестве отрицательного контроля.

Животным из Группы 4 (N = 8) проводили вакцинацию по той же схеме, что и Группе 2 (за исключением того, что они не были трансдуцированы AAV2/8-HBV).

Все вакцины вводили внутримышечно.

Уровень циркулирующего антигена HBs измеряли в сыворотках в Дни 23, 65 и 93 (группы 1, 2 и 3).

HBs- и HBc-специфические антитела определяли методом ELISA в сыворотках всех животных в День 23 (после трансдукции AAV2/8-HBV), 65 (7 дней после второй иммунизации) и 93 (7 дней после четвертой иммунизации). HBs- и HBc-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы оценивали в День 65 (9 животных/группу) и 93 (12

животных/группу) в спленocyтaх и инфилтpиpующих пeчeнь лимфоцитах после повторной стимуляции *ex vivo* и ICS (Группы 1, 2 и 3). У животных из группы 4 (8 животных) эти показатели иммуногенности определяли только в День 93.

Что касается параметров безопасности в отношении печени, уровни АСТ и АЛТ измеряли в сыворотках в Дни 38, 65 и 93, а микроскопическое исследование срезов печени, окрашенных гематоксилином-эозином, проводили в Дни 65 и 93 для выявления потенциальных гистопатологических изменений или воспаления, связанных с вакциной (Группы 1, 2 и 3).

Таблица 6. Группы воздействия

Группы	N*	День 0	День 31	День 58	День 72	День 86
1	21	AAV2/8- HBV	10^8 вч ChAd155-hIi- HBV	10^7 БОЕ MVA-HBV	HBc-HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	HBc-HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}
2	21	AAV2/8- HBV	10^8 вч ChAd155-hIi- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}
3	21	AAV2/8- HBV	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
4	8	Без вектора	10^8 вч ChAd155-hIi- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}	10^7 БОЕ MVA- HBV + HBc- HBs 4-1 мкг/AS01 _{B-4}

* 1 мышь была найдена мертвой в Группе 3 до Дня 65 и в Группе 2 до Дня 93.

Статистический анализ

Уровни АСТ и АЛТ

После \log_{10} преобразования значений ферментативной активности применяли ANOVA для повторных измерений, включая Пол, День, Группу и три попарных взаимодействия и используя неструктурированную ковариационную матрицу. Проверяли гипотезы модели. Взаимодействия, оказавшиеся незначимыми при уровне значимости 5%, исключали из модели. Для обоих ферментов окончательная модель включала Пол, День,

Группу и взаимодействие между переменными Группа и День. С использованием данной модели получали средние геометрические значения ферментативной активности в каждой группе в каждый момент времени. Групповые сравнения, представляющие интерес, представлены в виде отношения средних геометрических значений (GMR), которые также получали с использованием этой модели. Для всех указанных статистических данных приведен двусторонний 95% доверительный интервал. При расчете этих GMR множественность сравнений не учитывали.

Весь анализ выполняли с использованием SAS 9.2.

Гуморальные ответы

Для подсчета количества ответивших животных использовали описательную статистику. Пороговые значения, указывающие на образование антител против HBc или HBs, устанавливали на основе средних геометрических значений титров, рассчитанных в Группе 3 (трансдукция AAV2/8-HBV без вакцинации).

Клеточный ответ

Для определения количества ответивших животных применяли описательный анализ HBc-, HBs-специфических CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток. Пороговым значением, указывающим на наличие ответной реакции, считали 95-й процентиль показателей в Группе 3 (трансдукция AAV2/8-HBV без вакцинации).

Результаты

HBc-специфические CD8⁺ и CD4⁺ Т клетки

У мышей HLA-A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV, фоновый уровень HBc-специфических CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток без иммунизации во всех исследуемых моментах времени был очень низким или не определяемым (Группа 3).

Иммунизация векторами ChAd155-hli-HBV и MVA-HBV, отдельно (Группа 1) или в комбинации с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} (Группа 2) индуцировала HBc-специфические CD8⁺ Т-клетки (6/7 и 9/9 ответивших животных, соответственно, через 7 дней после II введения), демонстрируя обход толерантности к антигену HBc (Фигура 14А). Две дополнительные дозы HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, отдельно или в комбинации с MVA-HBV, лишь незначительно увеличивали частоту встречаемости HBc-специфических CD8⁺ Т-клеток через 7 дней после четвертого введения с достижением медианных значений этих показателей 1% в Группе 1 и 1,45% в Группе 2. Частота встречаемости HBc-специфических CD8⁺ Т-клеток, индуцированных той же схемой вакцинации, что и в Группе 2, была выше у нетрансдуцированных мышей HLA.A2/DR1 из Группы 4 (8/8 ответивших животных, при этом частота встречаемости была приблизительно в 4 раза

выше через 7 дней после IV введения), как и ожидалось благодаря иммунной толерантности к антигену НВс. НВс-специфические CD8⁺ Т-клетки также обнаруживали в печени вакцинированных мышей, профиль был таким же, как и в селезенке (Фиг. 14В).

У мышей HLA-A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV (Группы 1 и 2) уровень НВс-специфических CD4⁺ Т-клеток был очень низким или неопределяемым при вакцинации по обеим схемам, в то время как у нетрансдуцированных мышей (Группа 4) определяли устойчивый ответ, что позволяло предположить, что схема вакцинации не позволяла преодолеть толерантность CD4⁺ Т-клеток к НВс антигену в этих экспериментальных условиях (Фиг. 15А, В).

НВс-специфические CD8⁺ и CD4⁺ Т клетки

Иммунизация векторами ChAd155-hli-HBV и MVA-HBV, отдельно (Группа 1) или в сочетании с НВс-НВс 4-1/AS01_{B-4} (Группа 2) вызывала появление НВс-специфических CD8⁺ Т-клеток без дальнейшего увеличения интенсивности после двух дополнительных введений НВс-НВс 4-1/AS01_{B-4}, отдельно или в комбинации с MVA-HBV, у мышей, трансдуцированных AAV2/8-HBV (Фиг. 16А). В конце графика вакцинации (7 дней после четвертого введения) частоты встречаемости НВс-специфических CD8⁺ Т-клеток, измеренные у животных из групп 1 и 2, были близки к тем, которые были обнаружены в Группе 4 (нетрансдуцированные мыши HLA.A2/DR1, медиана через 7 дней после IV введения = 0,62%, 5/8 ответивших животных), что свидетельствует о преодолении толерантности Т-клеток к антигену НВс. НВс-специфические CD8⁺ Т-клетки обнаруживали в печени животных из Групп 1, 2 и 4 у большинства вакцинированных животных (Фиг. 16В).

НВс-специфические CD4⁺ Т-клетки появлялись после введения НВс-НВс 4-1/AS01_{B-4} отдельно или в комбинации с векторами, через 7 дней после второй вакцинации в Группе 2 и через 7 дней после четвертой вакцинации в группе 1 (Фиг. 17А). Частота встречаемости НВс-специфических CD4⁺ Т-клеток при вакцинации по схеме, используемой у животных из Группы 2 (медиана через 7 дней после IV введения = 3,7%, 11/11 ответивших животных) была примерно в 3 раза выше по сравнению с схемой вакцинации, используемой у животных из Группы 1 (медиана через 7 дней после IV введения = 1,34%, 11/12 ответивших животных), достигая уровня, сопоставимого с Группой 4 (нетрансдуцированные мыши HLA.A2/DR1, медиана через 7 дней после IV введения = 3%, 8/8 ответивших животных), что предполагает полное преодоление толерантности Т-клеток к НВс антигену. НВс-специфические CD4⁺ Т-клетки

обнаруживали в печени животных из Групп 1, 2 и 4 у всех вакцинированных животных (Фиг. 17B), аналогично системным CD4⁺ Т-клеточным ответам.

HBc- и HBs-специфические гуморальные ответы

Через 23 дня после инъекции вектора AAV2/8-HBV у мышей HLA.A2/DR1 не обнаруживали гуморального ответа против HBs, что позволяло предположить выраженную гуморальную толерантность к HBs антигену. Иммунизация только с помощью векторов ChAd155-hIi-HBV и MVA-HBV (Группа 1) не нарушала эту толерантность, в то время как иммунизация векторами в комбинации с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} вызывала образование антител против HBs у 15 из 21 животного в День 65 (Группа 2) (Фиг. 18A). Дальнейшее введение 2 доз HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} в группе 1 приводило к обнаружению антител против HBs (средние геометрические титры (GMT) 116,8 и 8/12 ответивших животных в День 93), а 2 дополнительные дозы MVA-HBV в комбинации с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Группе 2 дополнительно увеличивали интенсивность гуморального ответа против HBs до GMT 775 при 11/11 ответивших животных, что оставалось приблизительно в 5 раз ниже, чем у не трансдуцированных AAV2/8-HBV животных из Группы 4 (GMT = 3933) в День 93.

Аналогично, образование антител против HBc запускалось только в том случае, когда в схеме вакцинации присутствовал компонент HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, причем уровни, измеренные в День 93 у животных из Группы 2 (GMT = 1335,5; 11/11 ответивших животных) были в 3 раза выше по сравнению с Группой 1 (GMT = 442,8; 12/12 ответивших животных) (Фиг. 18B). Титры анти-HBc-антител, индуцированные у нетрансдуцированных мышей (Группа 4) при той же схеме вакцинации, что и в Группе 2, были выше (~ 27 раз, GMT = 35782).

Эти результаты показывают, что присутствие в схеме вакцинации белкового компонента с адьювантом имеет решающее значение для нарушения гуморальной толерантности к антигенам HBc и HBs. Кроме того, схема вакцинации, используемая в Группе 2, включающая 4 введения HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, вызывала наиболее выраженные гуморальные ответы против HBc и HBs, которые при этом оставались ниже, чем у мышей, не трансдуцированных AAV2/8-HBV (Группа 4).

Уровни АСТ/АЛТ

В качестве показателя воспаления, связанного с печенью, измеряли активность АСТ и АЛТ в сыворотке в Дни 38 (7 дней после первой вакцинации), 65 (7 дней после второй вакцинации) и/или 93 (7 дней после четвертой иммунизации) (все группы). В целом, уровни АСТ и АЛТ были стабильными в течение курса вакцинации (Группы 1 и 2)

у мышей HLA.A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV, и сопоставимы с показателями у мышей, не получавших вакцины (Группа 3) (Фиг. 19). Уровни АСТ оказались достоверно выше у животных из групп, получавших вакцину (Группы 1 и 2) по сравнению с контрольной группой 3 в День 65. Однако, у животных из Группы 3 уровни АСТ оказались неожиданно низкими в День 65 по сравнению с остальной динамикой, что позволяет предположить, что эти различия скорее связаны с неожиданно низкими значениями, полученными в контрольной группе 3 в этот момент времени, нежели с повышением уровня АСТ в вакцинированных группах (Группы 1 и 2) (Фиг. 19А).

У животных из группы 1 уровень АЛТ в День 38 был незначительно ниже по сравнению с контрольными животными из Группы 3, однако это различие не сочли клинически значимым (Фиг. 19В).

Микроскопическое исследование печени

Микроскопическое исследование срезов печени, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили в Дни 65 и 93 для выявления потенциальных связанных с вакциной гистопатологических изменений или воспаления (Группы 1, 2 и 3) (Таблица 7).

У мышей HLA-A2/DR, трансдуцированных AAV2/8-HBV результаты микроскопии не выявили никаких изменений, связанных с исследуемым продуктом, ни в День 65 (через 7 дней после введения второй вакцины на основе вирусного вектора, MVA-HBV с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} или без), ни в День 93 (7 дней после последней инъекции), т.е. не было никаких гистопатологических изменений, которые могли бы быть связаны с использованием компонентов вакцины ChAd155-hIi-HBV, MVA-HBV и HBc-HBs 4 - 1/AS01_{B-4}.

Кроме того, за исключением контрольного животного 3.13 (у которого был очаговый ступенчатый некроз 1 степени), ни у одного из животных не было морфологических признаков хронического гепатита.

Другие микроскопические данные, отмеченные у животных, получавших воздействие, считали случайными изменениями, так как они также происходили в контрольной группе, имели низкую частоту встречаемости/выраженность и/или являлись обычными находками у мышей аналогичного возраста [McInnes, 2012].

Таблица 7. Микроскопическое исследование печени животных из групп 1, 2 и 3 в

Дни 65 и 93

45028_EPS (Исходные данные)		Группа 1 («низкая доза», получающая: СhAd155-HBV (в День 30)+MVA-HBV (в День 58)+HBe-HBs/AS01B-4(в Дни 72 и 86)																				
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21
ПЕЧЕНЬ		93	93	93	93	65	93	65	93	93	65	93	65	65	93	93	65	93	65	93	65	93
День эксперимента		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ступенчатый некроз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Очаговый дольковый некроз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR A (активность)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR B (фиброз)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Скопления воспалительных клеток		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Некроз отдельных гепатоцитов		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Экстрамедуллярный гемопоэз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пигмент (соответствующий гемосидерину); клетки Купфера		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ПЕЧЕНЬ		Группа 2 («высокая доза», получающая: СhAd155-HBV (в День 30)+MVA-HBV (в День 58)+HBe-HBs/AS01B-4 (в Дни 30,58,72 и 86)																				
День эксперимента		93	65	93	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65
Ступенчатый некроз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Очаговый дольковый некроз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR A (активность)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR B (фиброз)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Скопления воспалительных клеток		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Некроз отдельных гепатоцитов		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Экстрамедуллярный гемопоэз		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пигмент (соответствующий гемосидерину); клетки Купфера		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NA - нет данных (летальный исход 2.9)																						
ПЕЧЕНЬ		Группа 3 (контроль), получающая NaCl																				
День эксперимента		65	NA	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65	93	65
Ступенчатый некроз		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Очаговый дольковый некроз		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR A (активность)		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
METAVIR B (фиброз)		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Скопления воспалительных клеток		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Некроз отдельных гепатоцитов		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Экстрамедуллярный гемопоэз		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пигмент (соответствующий гемосидерину); клетки Купфера		0	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
* Очаговый/незначительный ступенчатый некроз в объеме одной доли; NA - нет данных (летальный исход 3.2)																						

Уровни HBs антигена в сыворотке мышей, получавших инъекции AAV2/8-HBV.

Как уже сообщалось Dion et al [Dion, 2013], через 23 дня после инъекции векторов AAV2/8-HBV уровни HBs антигена были выше у самцов по сравнению с самками. Эти уровни оставались стабильными во всех группах, без заметного влияния схем вакцинации (Фиг. 20). Однако, мышь, получившая инъекцию AAV2/8-HBV, не является модельным животным для изучения эффективности вакцины в отношении HBsAg.

Заключение

В суррогатной модели хронической инфекции HBV, где установлена иммунная толерантность к антигену HBc и HBs, т.е. у мышей HLA-A2/DR1, трансдуцированных AAV2/8-HBV, обе протестированные схемы вакцинации позволили обойти толерантность, индуцируя HBc- и HBs-специфический IgG и CD8⁺ Т-клеточный, а также HBs-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответы, хотя и на более низких уровнях, чем у нетрансдуцированных мышей, как и следовало ожидать из-за выраженной иммунной толерантности. Когда векторы ChAd155-hIi-HBV/MVA-HBV вводили совместно с HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4}, интенсивности индуцированных вакцинацией гуморальных и Т-клеточных ответов были выше, чем в схеме вакцинации, когда векторы и белки с адьювантом вводили последовательно. Кроме того, при оценке воспаления печени, связанного с вакциной, путем измерения активности АСТ и АЛТ в сыворотке и проведения гистопатологической оценки печени, в группах, получавших вакцину, не обнаруживали увеличения ферментов печени по сравнению с невакцинированными, данные микроскопического исследования, связанные с воздействием вакцины, отсутствовали. В совокупности, эти результаты показывают, что исследуемые вакцины-кандидаты успешно восстанавливали HBs- и HBc-специфические гуморальный и CD8⁺ Т-клеточный, а также HBs-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответы при отсутствии признаков нарушений со стороны печени в этих экспериментальных условиях.

Краткое изложение результатов доклинического иммунологического исследования из Примеров 1-6

Исследования на мышях СВ6F1, вакцинированных белками (HBc-HBs), входящими в состав вакцины вместе с системой адьювантов AS01_{B-4}, позволили предположить отрицательное влияние HBs антигена на HBc-индуцированные

гуморальный и CD4⁺ Т-клеточный ответы. Тем не менее, вакцина, содержащая комбинацию НВс-НВs/AS01_{B-4}, способна вызывать устойчивые специфические CD4⁺ Т-клеточный и гуморальный ответы на оба антигена вакцины.

– При сравнении с составом на основе гидроксида алюминия или состава без адьювантов, состав на основе AS01 индуцировал значительно более выраженные CD4⁺ Т-клеточный и гуморальный ответы как на НВс, так и на НВs антиген.

Введение ChAd155-hIi-HBV трансгенным мышам HLA.A2/DR1 вызывало выраженный ответ CD8⁺ Т-клеток на НВс антиген и в меньшей степени на НВs антиген. Ответ на НВс антиген явно усиливался присутствием hIi в конструкции. Последующее введение MVA-HBV дополнительно усиливало CD8⁺ Т-клеточный ответ на НВс антиген: после бустерного введения MVA у мышей, примированных ChAd155-hIi-HBV, наблюдалась более высокая частота встречаемости НВс-специфических CD8⁺ Т-клеток по сравнению с мышами, примированными ChAd155-HBV, в то время как НВs-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ дополнительно не усиливался.

Вакцинация трансгенных мышей HLA.A2/DR1 по полной схеме (то есть последовательное или одновременное введение вирусных векторов и белков с адьювантами) индуцировала устойчивый CD4⁺ Т-клеточный, CD8⁺ Т-клеточный и гуморальный ответы на оба антигена вакцины. Кроме того, индуцированные вакцинацией НВs- и НВс-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки обнаруживали в печени животных, вакцинированных согласно обеим схемам вакцинации.

Исследование иммуногенности проводили на мышах СВ6F1 для изучения толерантности Т и В-клеток к последовательности «инвариантной цепи» (Ii) в гомологичной модели с использованием конструкции ChAd155, кодирующей последовательность Ii мыши (mIi): ChAd155-mIi-HBV. Индукцию аутологичных mIi-специфических иммунных ответов оценивали после 2 иммунизаций (День 0 и 14) вектором ChAd155-mIi-HBV в высокой дозе (10⁹ вч). Никаких антител против mIi и mIi-специфических Т-клеток не обнаруживали ни у одного животного через 2 недели после первой или второй иммунизации, что позволяет предположить, что иммунная толерантность к последовательности mIi была сохранена.

В доклинической модели персистенции HBV у мышей (мыши HLA.A2/DR1, трансдуцированные AAV2/8-HBV), где наблюдалась иммунная толерантность к антигенам HBV, схемы вакцинации были способны нарушать толерантность с индукцией НВс- и НВs-специфического CD8⁺ Т-клеточного, НВs-специфического CD4⁺

Т-клеточного и гуморального ответов на HBs и HBc-антигены, хотя HBc-специфического CD4⁺ Т-клеточного ответа не наблюдалось. Однако уровни индуцированных вакциной ответов у мышей, трансдуцированных AAV, были (как и ожидалось) ниже, чем уровни, обнаруженные у наивных мышей HLA.A2/DR1. Кроме того, при оценке связанного с вакциной воспаления печени путем измерения активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) и АЛТ в сыворотке и проведения гистопатологической оценки печени не было обнаружено увеличения ферментов печени в группах, получавших вакцину, по сравнению с невакцинированной группой, и микроскопические данные, связанные с воздействием вакцины, отсутствовали. В совокупности, эти результаты показывают, что исследуемые вакцины-кандидаты успешно восстанавливали HBs- и HBc-специфические гуморальный и CD8⁺ Т-клеточный, а также HBs-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответы при отсутствии признаков нарушений со стороны печени в этих экспериментальных условиях.

Пример 7. Оценка иммуногенности рекомбинантных белков HBc/HBs в различных соотношениях

Задачи

Задача эксперимента состояла в том, чтобы подтвердить отрицательное влияние антигена HBs на HBc-индуцированный CD4⁺ Т-клеточный ответ, как показано в Примере 2, через 7 дней после третьей иммунизации, когда антигены HBs и HBc смешивали в соотношении 1 к 1. Еще одной задачей была оценка различных соотношений HBs/HBc, чтобы ограничить то влияние и обеспечить, по крайней мере, мощный HBc-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ, в то же время вызывая устойчивый HBc и HBs-специфический гуморальный ответ.

Схема исследования

Мышей СВ6F1 (30 мышей на группу) в возрасте 6-8 недель иммунизировали три раза внутримышечно (икроножная мышца) в дни 0, 14 и 28 различными составами, содержащими антигены HBc и HBs (перечислены в таблице 8) в 50 мкл AS01_{B-3} или AS01_{B-4}. Мыши СВ6F1 были случайным образом распределены в одну из групп исследования. Для оценки HBc и HBs-специфических Т-клеточных ответов проводили внутриклеточное окрашивание на цитокины (ICS) с использованием лейкоцитов, собранных через 7 дней после второй и третьей иммунизации из 6 пулов по 5 мышей/группу. Сыворотку брали у отдельных мышей через 14 дней после второй и третьей иммунизаций, и для оценки суммарных HBc- и HBs-специфических Ig

исследовали сыворотку только 20 рандомизированных мышей благодаря статистическому анализу размера выборки.

Таблица 8. Схема эксперимента для исследования соотношения HBc/HBs у мышей СВ6F1

Группа	N	Воздействие		Схема иммунизации Дни
		Доза вакцины	Доза адьюванта	
1	30	1 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
2	30	0,25 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
3	30	0,1 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
4	30	4 мкг HBc	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
5	30	1 мкг HBc	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
8	30	1 мкг HBc + 1 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
9	30	4 мкг HBc + 1 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
10	30	4 мкг HBc + 0,25 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
11	30	1 мкг HBc + 0,25 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
12	30	4 мкг HBc + 0,1 мкг HBs	AS01B-4 (1/10 HD)	0, 14, 28
13	30	NaCl	/	0, 14, 28

Группы 6 и 7 включали в эксперимент для решения другой задачи и опущены для ясности.

HD: человеческая доза

Статистический анализ

Оценивали сопоставимости по эффективности групп НВс-НВs по сравнению с соответствующими группами НВс. Указанная сопоставимость по эффективности будет достигнута, если верхний предел 95% ДИ соотношения средних геометрических значений частоты встречаемости (в %) НВс-специфических CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих по меньшей мере один цитокин (IL-2 и/или IFN- γ и/или TNF- α), будет ниже 2 через 7 дней после III введения в группах НВс по сравнению с соответствующими группами НВс-НВs. Поскольку это была первая оценка и критерии не были заранее определены, поправка на множественность не применялась.

Для решения двух основных задач использовали модель ANOVA (дисперсионный анализ). После log₁₀ преобразования значений частот встречаемости CD4⁺ после III введения, проводили их анализ, включая группу (с 4 по 12), взаимодействие в качестве фиксированных эффектов и используя модель гетерогенной дисперсии (исходя из предположения, что вариации между группами не равны). Эту модель использовали для оценки средних геометрических (и их 95% ДИ), а также соотношения средних геометрических и их 95% ДИ, проводя обратное преобразование log₁₀ средних значений и различий.

Результаты

Антиген-специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы

Все составы после 2-й иммунизации индуцировали выраженный НВс и НВс-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ ($\pm 1\%$). Хотя величина НВс-специфического CD4⁺ Т-клеточного ответа, вызванного составом, содержащим равное количество НВс и НВs в AS01_{B-4}, проявляла тенденцию быть ниже (Фиг. 23) по сравнению с группой, получавшей только НВс/AS01_{B-4}, эти различия не были статистически значимыми, поскольку соотношение составляло $\pm 1,4$ ($p = 0,143$) (Фиг. 23). После 3-й иммунизации величина НВс-специфического CD4⁺ Т-клеточного ответа, вызванного составом, содержащим равное количество НВс и НВs в AS01_{B-4}, была достоверно ниже (GMR 0,391 и 95% ДИ [0,184-0,828]) по сравнению с группой, получавшей только НВс/AS01_{B-4} (Фиг. 24). Это подтвердило влияние НВs на НВс-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ, наблюдавшийся в Примере 2. Влияние было менее выраженным, когда НВс и

HBs антигены находились в соотношении 4:1. Указанное негативное влияние не наблюдалось при рассмотрении HBs-специфического CD4⁺ Т-клеточного ответа (Фиг. 23 и Фиг. 24).

При дальнейшем увеличении соотношений HBc к HBs существовала тенденция, хотя и не являющаяся статистически значимой, к дополнительному восстановлению такого HBc-специфического CD4⁺ Т-клеточного ответа с медианными значениями общего количества HBc-специфических CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ и/или IL-2 и/или TNF α , доходившими до 1,7%.

HBs-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы оценивали после 2-й и 3-й иммунизации (Фиг. 25). HBs-специфический ответ на диапазон доз наблюдался после 2-й и 3-й иммунизации. После третьей иммунизации HBs-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы имели тенденцию к снижению при нахождении в составе с равным количеством антигена HBc (GMR 0,66 и 95% ДИ [0,337-1,295]), однако, это соотношение не являлось статистически значимым ($p = 0,1717$). HBc-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы варьировали от низкого до неопределяемого (ниже 0,1%, данные не показаны).

Антиген-специфические гуморальные ответы

Все составы после 2-й иммунизации индуцировали выраженный и сопоставимый ответ суммарных анти-HBc и HBs Ig без отрицательного воздействия при совместном составлении HBs и HBc в соотношении 1:1 в системе адъювантов AS01_{B-4} (Фиг. 26). Ответ суммарных HBc-специфических Ig усиливался после третьей иммунизации (Фиг. 27). Влияние HBs на уровень HBc-специфического гуморального ответа наблюдалось при нахождении HBs и HBc в одном составе в соотношении 1:1 в системе адъювантов AS01_{B-4}. Коэффициенты GMT и 95% доверительный интервал составляли 1,88 [1,44; 2,44] при значениях $p < 0,0001$. Увеличение соотношения HBc к HBs до четырех позволяло восстановить гуморальный ответ на HBc, отношения GMT и 95% доверительный интервал составляли 1,37 [1,04; 1,80] при значениях $p = 0,0262$. HBc не оказывал негативного влияния на уровень HBs-специфического гуморального ответа, как сообщалось ранее (Фиг. 26 и 27).

Заключение

Результаты этого эксперимента показывают, что составы с соотношением HBc/HBs ≥ 4 позволяли преодолеть отрицательное влияние HBs на HBc-специфические CD4⁺ Т-клеточный и гуморальный ответы, наблюдающееся, когда оба антигена

находились в одном составе в соотношении 1/1. В результате для дальнейших доклинических экспериментов отбирали дозы HBc 4 мкг и HBs 1 мкг.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1: Аминокислотная последовательность HBs

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPG
CKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLV
PFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPFIFFCLWVYI

SEQ ID NO:2: Аминокислотная последовательность усеченного HBc

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
LCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETV
LEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV

SEQ ID NO:3: Аминокислотная последовательность спейсера, включающего область расщепления 2А вируса ящура

APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:4: Нуклеотидная последовательность, кодирующая спейсер, включающий область расщепления 2А вируса ящура

GCCCCTGTGAAGCAGACCCTGAACCTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGCGACGTGG
AGAGCAATCCCGGCCCT

SEQ ID NO:5: Аминокислотная последовательность HBc-2А-HBs

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
LCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETV
LEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRDRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPR
RRRSQSRESQCAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLT
RILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIF
LFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPGCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPT
DGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMW
YWGPSLYSIVSPFIPLLPFIFFCLWVYI

SEQ ID NO:6: Нуклеотидная последовательность, кодирующая HBc-2А-HBs

ATGGACATCGATCCCTACAAGGAATTTGGCGCCACCGTGGAGCTGCTGAGCTTCC
TGCCCAGCGACTTCTTCCCAGCGTGAGGGACCTCCTGGACACCGCCAGCGCCCT
GTACAGGGAGGCCCTGGAATCTCCCGAGCACTGCAGCCCACACCACACCGCACT
GAGGCAGGCCATCCTGTGCTGGGGAGAGCTGATGACCCTCGCCACCTGGGGTGGG

CAACAACCTGGAGGACCCCGCCAGCAGGGACCTGGTGGTGAACCTACGTCAACAC
 CAACATGGGCCTGAAGATCAGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATCAGCTGCCTGACC
 TTCGGCAGGGAGACCGTGCTGGAGTACCTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGATCAGGA
 CACCTCCCGCCTACAGACCCCCAACGCCCCATCCTGAGCACCTGCCCGAGAC
 CACAGTGGTGAGGAGGAGGGACAGGGGCAGGTCACCCAGGAGGAGGACTCCAA
 GCCCCAGGAGGAGGAGGAGCCAGAGCCCCAGGAGAAGGAGGAGCCAGAGCAGG
 GAGAGCCAGTGCGCCCTGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGG
 CCGGCAGCTGGAGAGCAATCCCGGCCCTATGGAGAACATCACCAGCGGCTTCCT
 GGGCCCCCTGCTGGTGCTGCAGGCAGGCTTCTTCCTGCTGACCAGGATCCTGACC
 ATCCCCCAGAGCCTGGACAGCTGGTGGACCAGCCTGAACTTCCTCGGCGGGAGCC
 CCGTGTGCCTGGGCCAGAACAGCCAGTCTCCACCAGCAATCACAGCCCCACCAG
 CTGCCCCCAATCTGTCCTGGCTACCGGTGGATGTGCCTGAGGAGGTTTCATCATCT
 TCCTGTTTCATCCTGCTCCTGTGCCTGATCTTCCTGCTGGTGCTGCTGGACTACCAG
 GGAATGCTGCCAGTGTGTCCCCTGATCCCCGGCTCAACCACCACTAACACCGGCC
 CCTGCAAAACCTGCACCACCCCGCTCAGGGCAACAGCATGTTCCCAAGCTGCTG
 CTGCACCAAGCCCACCGACGGCAACTGCACCTGCATTCCCATCCCAGCAGCTGG
 GCCTTCGCCAAGTATCTGTGGGAGTGGGCCAGCGTGAGGTTTCAGCTGGCTCAGCC
 TGCTGGTGCCCTTCGTCCAGTGGTTTGTGGGCTGAGCCCCACCGTGTGGCTGAG
 CGCCATCTGGATGATGTGGTACTGGGGCCCCAGCCTGTACTCCATCGTGAGCCCC
 TTCATCCCCCTGCTGCCATTTTCTTCTGCCTGTGGGTGTACATC

SEQ ID NO:7: Аминокислотная последовательность hIi

MHRRRSRSCREDQKPVMDQDRLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILV
 TLLLAGQATTAFLYQQQGRDLKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPKPVSKMRMATPLL
 MQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEHDVHMHLLQNADPLKVYPPLKSFPENLRHLK
 NTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSSGGVTKQDL
 GPVPM

SEQ ID NO:8: Нуклеотидная последовательность, кодирующая hIi

atgcacaggaggaggagcaggagctgcagggaggaccagaagcccgtgatggacgaccagcgcgacctgatcagaacaacga
 gcagctgccaatgtgggcaggaggcccgagcaccgaaagcaagtgcagcagggggcgccctgtacaccggcttcagcatcctg
 gtgacctctgtgtggcgccaggccaccaccgcctatttctgtaccagcagcagggcaggctcgataagctgacctgacctcc
 cagaacctgcagctggagaacctgaggatgaagctgcccagcccccaagcccgtgagcaagatgaggatggccacccccctgc
 tgatgcaggctctgccatgggggcctgcccaggccccatgcagaacgccaccaatacggcaacatgaccgaggaccacgt
 gatgcacctgctgcagaacgccgatctctgaaggtgtaccacccctgaaaggcagcttccccgagaacctcaggcacctgaagaa

caccatggagaccatcgactggaaggtgttcgagagctggatgcaccactggctgctgttcgagatgagccggcacagcctggagca
 gaagcccaccgacgcccctcccaaggagagcctcgagctcgaggaccaagcagcggcctgggctgaccaagcaggacctgg
 gccccgtgccatg

SEQ ID NO:9: Аминокислотная последовательность hIi-HBc-2A-HBs

MHRRRSRSCREDQKPVMDQRDLSNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILV
 TLLLAGQATTAYFLYQQQGRDLKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPKPVSKMRMATPLL
 MQALPMGALPQGPMQNAKYGNMTEHDVHMLLQNAADPLKVYPPPKSFPENLRHLK
 NTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSGGVTKQDL
 GPVPMMDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPHCSPHHT
 ALRQAILCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLT
 FGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVAAPVKQTLNFDLLKLAGDV
 ESNPGPMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNS
 QSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGST
 TTNTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCTKPTDGNCTCIIPSSWAFKYLWEWASVRFS
 WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPFIFFCLWVYI

SEQ ID NO:10: Нуклеотидная последовательность, кодирующая hIi-HBc-2A-HBs

ATGCACAGGAGGAGGAGCAGGAGCTGCAGGGAGGACCAGAAGCCCGTGATGGA
 CGACCAGCGCGACCTGATCAGCAACAACGAGCAGCTGCCAATGCTGGGCAGGAG
 GCCCGGAGCACCCGAAAGCAAGTGCAGCAGGGGCGCCCTGTACACCGGCTTCAG
 CATCCTGGTGACCCTCCTGCTGGCCGGCCAGGCCACCACCGCCTATTTCTGTACC
 AGCAGCAGGGCAGGCTCGATAAGCTGACCGTGACCTCCCAGAACCTGCAGCTGG
 AGAACCTGAGGATGAAGCTGCCCAAGCCCCCAAGCCCGTGAGCAAGATGAGGA
 TGGCCACCCCCCTGCTGATGCAGGCTCTGCCCATGGGGGCCCTGCCCCAGGGCCC
 CATGCAGAACGCCACCAAATACGGCAACATGACCGAGGACCACGTGATGCACCT
 GCTGCAGAACGCCGATCCTCTGAAGGTGTACCCACCCCTGAAAGGCAGCTTCCCC
 GAGAACCTCAGGCACCTGAAGAACACCATGGAGACCATCGACTGGAAGGTGTTC
 GAGAGCTGGATGCACCACTGGCTGCTGTTCGAGATGAGCCGGCACAGCCTGGAG
 CAGAAGCCCACCGACGCCCTCCCAAGGAGAGCCTCGAGCTCGAGGACCCAAGC
 AGCGGCCTGGGCGTGACCAAGCAGGACCTGGGCCCCGTGCCCATGGACATTGAC
 CCTACAAGGAGTTCGGCGCCACCGTCGAACTGCTGAGCTTCTCCCCAGCGACT
 TCTTCCCCTCCGTGAGGGATCTGCTGGACACAGCTAGCGCCCTGTACAGGGAGGC
 CCTGGAGAGCCCCGAGCACTGCAGCCCCCACCACACAGCCCTGAGGCAGGCCAT
 CCTCTGTTGGGGCGAGCTGATGACCCTGGCCACCTGGGTGGGCAATAACCTGGAG

GACCCCGCCAGCAGGGACCTGGTGGTCAACTACGTGAACACCAACATGGGCCTG
 AAGATCAGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATCAGCTGCCTGACCTTTGGCAGGGAGA
 CCGTCCTGGAGTACCTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGATCAGGACTCCCCAGCCTA
 CAGGCCCCCTAACGCCCCCATCCTGTCTACCCTGCCCGAGACCACCGTGGTGAGG
 AGGAGGGACAGGGGCAGAAGCCCCAGGAGAAGGACCCCTAGCCCCAGGAGGAG
 GAGGAGCCAGAGCCCCAGGAGGAGGAGGAGCCAGAGCCGGGAGAGCCAGTGCG
 CCCCTGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGCGACGTGGA
 GAGCAATCCCGGCCCTATGGAAAACATCACCAGCGGCTTCCTGGGCCCCCTGCTG
 GTGCTGCAGGCCGGCTTCTTCTGCTGACCAGGATCCTGACCATTCCCCAGTCACT
 GGACAGCTGGTGGACCAGCCTGAACTTCCTCGGCGGGAGCCCCGTGTGCCTGGGC
 CAGAATAGCCAGAGCCCCACCAGCAACCACTCTCCACTTCCTGCCCCCTATCT
 GCCCCGGCTACAGGTGGATGTGCCTGAGGAGGTTTCATCATCTTCTGTTTCATCCTG
 CTGCTGTGCCTGATCTTCTGCTGGTGTGCTGGACTACCAGGGAATGCTGCCCGT
 GTGTCCCCTGATCCCCGGAAGCACCACCACCAACACCGGCCCTGCAAGACCTGC
 ACCACCCCCGCCAGGGCAACTCTATGTTCCCCAGCTGCTGCTGCACCAAGCCCA
 CCGACGGCAACTGCACTTGCATTCCCATCCCCAGCAGCTGGGCCTTCGCCAAATA
 TCTGTGGGAGTGGGCCAGCGTGAGGTTTAGCTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCTTC
 GTGCAGTGGTTTGTGGGCCTGAGCCCCACCGTGTGGCTGAGCGCCATCTGGATGA
 TGTGGTACTGGGGCCCCTCCCTGTACAGCATCGTGAGCCCCTTCATCCCCCTCCTG
 CCCATCTTCTTCTGCCTGTGGGTGTACATC

SEQ ID NO:11: Аминокислотная последовательность HBc

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
 LCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETV
 LEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRDRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPR
 RRRSQSRESQC

SEQ ID NO:12: Аминокислотная последовательность альтернативного варианта hIi

MHRRRSRSCREDQKPVMDQRD LISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILV
 TLLLAGQATTAYFLYQQQGRLDKLT VTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPL
 LMQUALPMGALPQGPMQNATKYGNMTE DHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRH
 LKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTD APPKESLELEDPSGLGVTK
 QDLGPVP

SEQ ID NO:13: Нуклеотидная последовательность, кодирующая альтернативный вариант hIi

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCATGGAT
GACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGGCCGGCGCC
CTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCGGAGCCCTGTACACAGGCTTTTCCAT
CCTGGTGA CTCTGCTCCTCGCTGGCCAGGCCACCACCGCCTACTTCCTGTACCAGC
AGCAGGGCCGGCTGGACAAACTGACAGTCACCTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGA
ACCTGCGCATGAAGCTTCCCAAGCCTCCCAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGC
CACCCCGCTGCTGATGCAGGCGCTGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGGCCCATG
CAGAATGCCACCAAGTATGGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTC
CAGAATGCTGACCCCCTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCGGAG
AACCTGAGACACCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGTCTTTGAG
AGCTGGATGCACCATTGGCTCCTGTTTGAAATGAGCAGGCACTCCTTGGAGCAA
AGCCCACTGACGCTCCACCGAAAGAGTCACTGGA ACTGGAGGACCCGTCTTCTGG
GCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCCAGTCCCC

SEQ ID NO:14: Альтернативная нуклеотидная последовательность hIi-HBc-2A-HBs

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCATGGAT
GACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGGCCGGCGCC
CTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCGGAGCCCTGTACACAGGCTTTTCCAT
CCTGGTGA CTCTGCTCCTCGCTGGCCAGGCCACCACCGCCTACTTCCTGTACCAGC
AGCAGGGCCGGCTGGACAAACTGACAGTCACCTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGA
ACCTGCGCATGAAGCTTCCCAAGCCTCCCAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGC
CACCCCGCTGCTGATGCAGGCGCTGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGGCCCATG
CAGAATGCCACCAAGTATGGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTC
CAGAATGCTGACCCCCTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCGGAG
AACCTGAGACACCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGTCTTTGAG
AGCTGGATGCACCATTGGCTCCTGTTTGAAATGAGCAGGCACTCCTTGGAGCAA
AGCCCACTGACGCTCCACCGAAAGAGTCACTGGA ACTGGAGGACCCGTCTTCTGG
GCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCCAGTCCCCATGGACATTGACCCTTAT
AAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCC
TTCCGTCAGAGATCTCCTAGACACCGCCTCAGCTCTGTATCGAGAAGCCTTAGAG
TCTCCTGAGCATTGCTCACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCCATTCTCTGCTG
GGGGGAATTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCA
TCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAACATGGGTTTAAAGATCAGGC
AACTATTGTGGTTTTCATATATCTTGCCTTACTTTTGGAAGAGAGACTGTACTTGAA

TATTTGGTCTCTTTTCGGAGTGTGGATTCGCACTCCTCCAGCCTATAGACCACCAA
TGCCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACTGTTGTTAGACGACGGGACCGA
GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGCAGATCTCAATCGC
CGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTGCCCTGTGAAGCAGAC
CCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGCGACGTGGAGAGCAATCCCGGCCCT
ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGT
TTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATAACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGAC
TTCTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCC
CAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGG
ATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC
TTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTTAATTCAGG
ATCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGG
CAACTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTGCACCT
GTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTC
AGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGC
TTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGT
CTGTACAGCATCGTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTCTGG
GTATACATT

SEQ ID NO:15: Альтернативная аминокислотная последовательность hIi-HBc-2A-HBs
MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILV
TLLLAGQATTAYFLYQQQGRDLKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPL
LMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEHDVHMHLQADPLKVYPPLKGSFPENLRH
LKNTMETIDWKVFESWMHHLWFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSSGLGVTK
QDLGPVPMIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPHCSPHH
TALRQAILCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCL
TFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT VRRRRDRGRSPRRRTPSPRR
RRSQSPRRRRSQSRESQCAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPMENITSGFLGPLLVLQ
AGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWM
CLRRFIIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPCKTCTTPAQGNSMFP
CCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLS
AIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

Al-Mahtab M, Akbar SM, Aguilar JC, Uddin MH, Khan MS, Rahman S. Therapeutic potential of a combined hepatitis B virus surface and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2013;7(4):981-9.

Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289-93.

Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut.* 2012;61(12):1754-64.

Block TM, Locarnini S, McMahon BJ, Rehermann B, Peters MG. Use of Current and New Endpoints in the Evaluation of Experimental Hepatitis B Therapeutics. *Clin Infect Dis.* 2017;64(9):1283-1288.

Boni C, Laccabue D, Lampertico P, *et al.* Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 2012;143(4):963-73.e9.

Borghese F, Clanchy FI. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2011;15(3):237-51.

Buchmann P, Dembek C, Kuklick L, *et al.* Novel therapeutic hepatitis B vaccine induces cellular and humoral immune responses and breaks tolerance in hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. *Vaccine.* 2013;31(8):1197-203.

Cavanaugh JS, Awi D, Mendy M, *et al.* Partially Randomized, Non-Blinded Trial of DNA and MVA Therapeutic Vaccines Based on Hepatitis B Virus Surface Protein for Chronic HBV Infection. *PLoS ONE.* 2011;6:1-14.

Capone S, Naddeo M, D'Alise AM, *et al.* Fusion of HCV nonstructural antigen to MHC class II-associated invariant chain enhances T-cell responses induced by vectored vaccines in nonhuman primates. *Mol Ther.* 2014;22(5):1039-47.

Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HL, Chan HL. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *J Hepatol.* 2017;66(2):398-411.

Di Lullo, G., E. Soprana, M. Panigada, A. Palini, A. Agresti, C. Comunian, A. Milani, I. Capua, V. Erfle and A. G. Siccardi (2010). The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified vaccinia

virus Ankara vaccine production for human use. *Journal of Virological Methods* 163(2): 195-204

Dion S, Bourguine M, Godon O, Levillayer F, Michel ML. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules. *J Virol.* 2013;87(10):5554-63.

Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol.* 2001 May;82 (Pt 5):1013-25

Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol* 2016;64:S117–S131.

EASL 2017. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;67(2),370-398.

Fontaine H, Kahi S, Chazallon C, *et al.* Anti-HBV DNA vaccination does not prevent relapse after discontinuation of analogues in the treatment of chronic hepatitis B: a randomised trial—ANRS HB02 VAC-ADN. *Gut.* 2015;64:139–147.

Hilgers *et al.*, Synergistic Effects of Synthetic Adjuvants on the Humoral Immune Response. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 1986, 79(4):392-6;

Hilgers *et al.*, Novel adjuvants for humoral immune responses. *Immunology*, 1987, 60(1):141-6

Jung MC, Grüner N, Zachoval R, *et al.* Immunological monitoring during therapeutic vaccination as a prerequisite for the design of new effective therapies: induction of a vaccine-specific CD4+ T-cell proliferative response in chronic hepatitis B carriers. *Vaccine.* 2002;20(29-30):3598-612.

Kensil C R *et al.* Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunology* (1991) 146: 431-437.

Kensil C R, Saponins as Vaccine Adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, 13:1-55;

Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, *et al.* Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;55(6):413-31.

Kranidioti H, Manolakopoulos S, Khakoo SI. Outcome after discontinuation of nucleot(s)ide analogues in chronic hepatitis B: relapse rate and associated factors. *Ann Gastroenterol.* 2015;28(2):173-181.

Lau GK, Suri D, Liang R, *et al.* Resolution of Chronic Hepatitis B and Anti-HBs Seroconversion in Humans by Adoptive Transfer of Immunity to Hepatitis B Core Antigen. *Gastroenterology* 2002;122:614-24.

Lacaille-Dubois, M and Wagner H, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386 (1996).

Li J, Han Y, Jin K, *et al.* Dynamic changes of cytotoxic T lymphocytes (CTLs), natural killer (NK) cells, and natural killer T (NKT) cells in patients with acute hepatitis B infection. *Virology* 2011;8:199.

Liang M, Ma S, Hu X, *et al.* Cellular immune responses in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance induced by antiviral therapy. *Virology* 2011;8:69.

Liaw YF. Impact of therapy on the long-term outcome of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis.* 2013;17:413–423.

Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009;373,582–592.

Lok AS, Pan CQ, Han SH, *et al.* Randomized phase II study of GS-4774 as a therapeutic vaccine in virally suppressed patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2016;65(3):509-16.

Lorin C, Vanloubbeeck Y, Baudart S, *et al.* Heterologous prime-boost regimens with a recombinant chimpanzee adenoviral vector and adjuvanted F4 protein elicit polyfunctional HIV-1-specific T-Cell responses in macaques. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122835.

Maini M, Gehring A, The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. *J Hepatol* 2016;64;S60–S70.

Martin P, Furman RR, Rutherford S, *et al.* Phase I study of the anti-CD74 monoclonal antibody milatuzumab (hLL1) in patients with previously treated B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2015;12:1-6.

Mayr A, Stickl H, Muller HK, Danner K, Singer, H. The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe B: Hygiene, Betriebshygiene, präventive Medizin.* 1978;167:375-90.

Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). *Infection* 3, 6-14.

McInnes KJ, Smith LB, Hunger NI, Saunders PT, Andrew R, Walker BR. Deletion of the androgen receptor in adipose tissue in male mice elevates retinol binding protein 4 and reveals independent effects on visceral fat mass and on glucose homeostasis. *Diabetes*. 2012;61(5):1072-81.

Mohamadnejad M, Tavangar SM, Sotoudeh M, *et al*. Histopathological Study of Chronic Hepatitis B: A Comparative Study of Ishak and METAVIR Scoring Systems. *Int J Organ Transplant Med*. 2010;1(4):171-6.

Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, *et al*. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55(6):433-49.

Neumann AU, Phillips S, Levine I, *et al*. Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells. *Hepatology*. 2010;52(3):875-85.

Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012;30:2212-19.

Rammeh S, Khadra HB, Znaidi NS, *et al*. Inter-observer agreement of Ishak and Metavir scores in histological evaluation of chronic viral hepatitis B and C. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014;72(1):57-60.

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215-29.

Riedl P, Reiser M, Stifter K, Krieger J, Schirmbeck R. Differential presentation of endogenous and exogenous hepatitis B surface antigens influences priming of CD8(+) T cells in an epitope-specific manner. *Eur J Immunol*. 2014;44(7):1981-91.

Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, *et al*. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*. 2003;55(2-3):91-106.

Spencer AJ, Cottingham MG, Jenks JA, *et al*. Enhanced vaccine-induced CD8+ T cell responses to malaria antigen ME-TRAP by fusion to MHC class II invariant chain. *PLoS One*. 2014;9(6):e100538.

Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, *et al*. AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B. *Hepatology*. 2015;DOI:10.1002/hep.28156.

World Health Organization (WHO). Global Hepatitis report, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>. Accessed November 2017.

Yang FQ, Yu YY, Wang GQ, *et al.* A pilot randomized controlled trial of dual-plasmid HBV DNA vaccine mediated by in vivo electroporation in chronic hepatitis B patients under lamivudine chemotherapy. *J Viral Hepat.* 2012;19:581-593.

Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HL. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J Infect Dis.* 2011;204(3):415-8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), полинуклеотид, кодирующий коровый антиген вируса гепатита В (HBc), и полинуклеотид, кодирующий инвариантную цепь человека (hIi), слитую с HBc.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой вектор ChAd выбран из группы, состоящей из ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 и Pan 9.

3. Иммуногенная композиция по п. 1 или п. 2, в которой вектор ChAd представляет собой ChAd155 и содержит полинуклеотид, кодирующий hIi, HBc, 2A и HBs.

4. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, в которой вектор содержит полинуклеотиды, кодирующие HBc, содержащий SEQ ID NO: 11, или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, слитый с полинуклеотидом, кодирующим hIi, содержащим SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, или SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, и HBs, содержащий SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, где полинуклеотиды, кодирующие hIi-HBc и HBs, разделены полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, которая включает в себя область расщепления 2A вируса ящура.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, в которой вектор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, в которой вектор содержит полинуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, или полинуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

7. Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и полинуклеотид, кодирующий коровый антиген вируса гепатита В (HBc).

8. Иммуногенная композиция по п. 7, в которой полинуклеотиды, кодирующие HBs и HBc, разделены полинуклеотидом, кодирующим область расщепления 2A вируса ящура (FMDV).

9. Иммуногенная композиция по п. 7 или п. 8, где вектор содержит полинуклеотиды, кодирующие HBc, содержащий SEQ ID NO: 11, или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, и HBs, содержащий SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, где полинуклеотиды, кодирующие HBc и HBs, разделены полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, гомологичную ей по меньшей мере на 98%, включающую в себя область расщепления 2A вируса ящура.

10. Иммуногенная композиция по любому из пп. 7-9, в которой вектор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

11. Иммуногенная композиция по любому из пп. 7-10, в которой вектор содержит полинуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

12. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), усеченный на С-конце рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант, содержащий MPL и QS-21.

13. Иммуногенная композиция по п. 12, в которой усеченный рекомбинантный HBc содержит аминокислоты 1-145, 1-146, 1-147, 1-148 или аминокислоты 1-149 белка корового антигена гепатита В дикого типа.

14. Иммуногенная композиция по п. 12 или п. 13, содержащая рекомбинантный HBc и рекомбинантный HBs в соотношении 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1 или более (например, от 3:1 до 5:1, например, 4:1).

15. Иммуногенная композиция по любому из пп. 12-14, содержащая рекомбинантный HBs (SEQ ID NO: 1), аминокислоты 1-149 HBc (SEQ ID NO: 2) и адъювант, содержащий MPL, QS-21 и липосомы, состоящие из диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и холестерина в забуференном фосфатом физиологическом растворе.

16. Иммуногенная комбинация, содержащая:

а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант.

17. Иммуногенная комбинация по п. 16, где композиция компонента а) комбинации представляет собой композицию по любому из пп. 1-6, композиция компонента б) комбинации представляет собой композицию по любому из пп. 7-11, и композиция компонента в) комбинации представляет собой композицию по любому из пп. 12-15.

18. Набор, содержащий следующие компоненты:

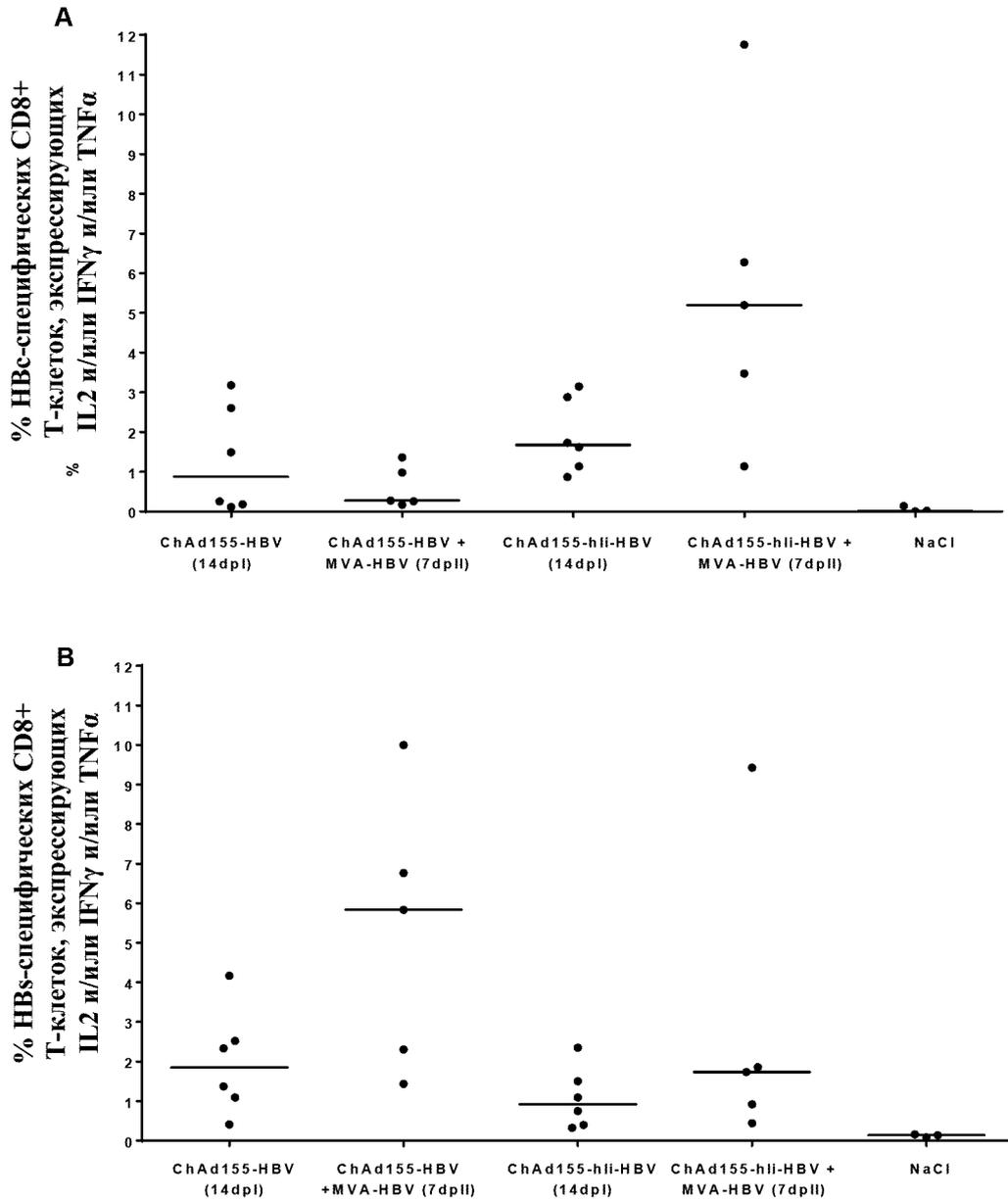
а) композицию, содержащую вектор на основе дефектного по репликации аденовируса шимпанзе (ChAd), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc);

б) композицию, содержащую вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащий полинуклеотид, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), и нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В (HBc); и

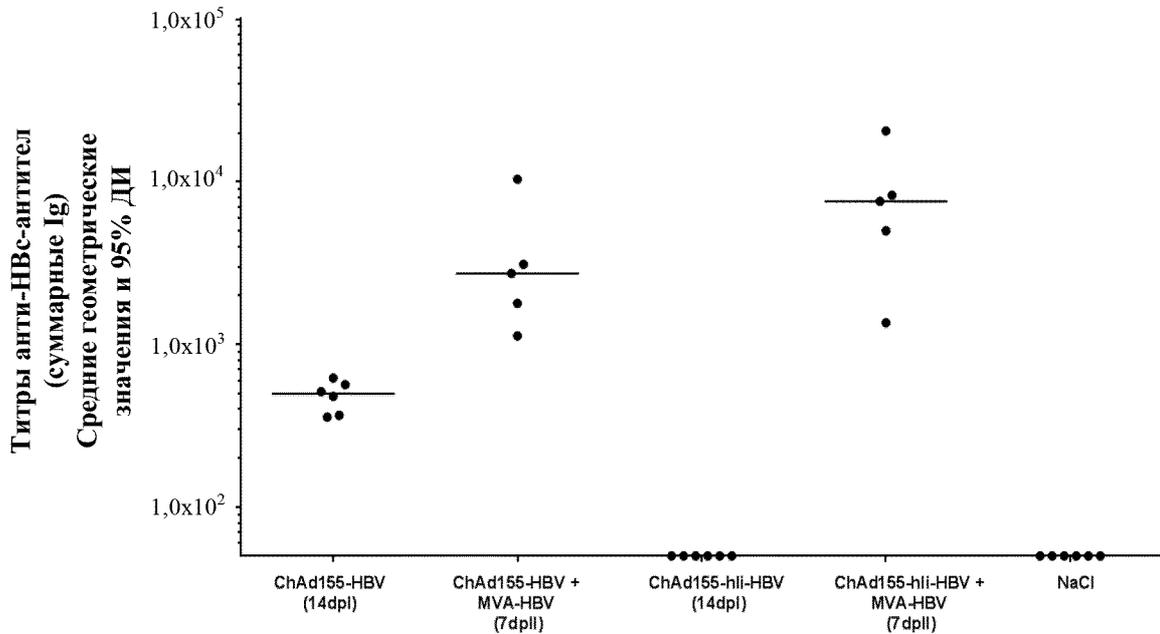
в) композицию, содержащую рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs), рекомбинантный коровый антиген вируса гепатита В (HBc) и адъювант,

с инструкциями для введения компонентов последовательно или одновременно для лечения ХГВ.

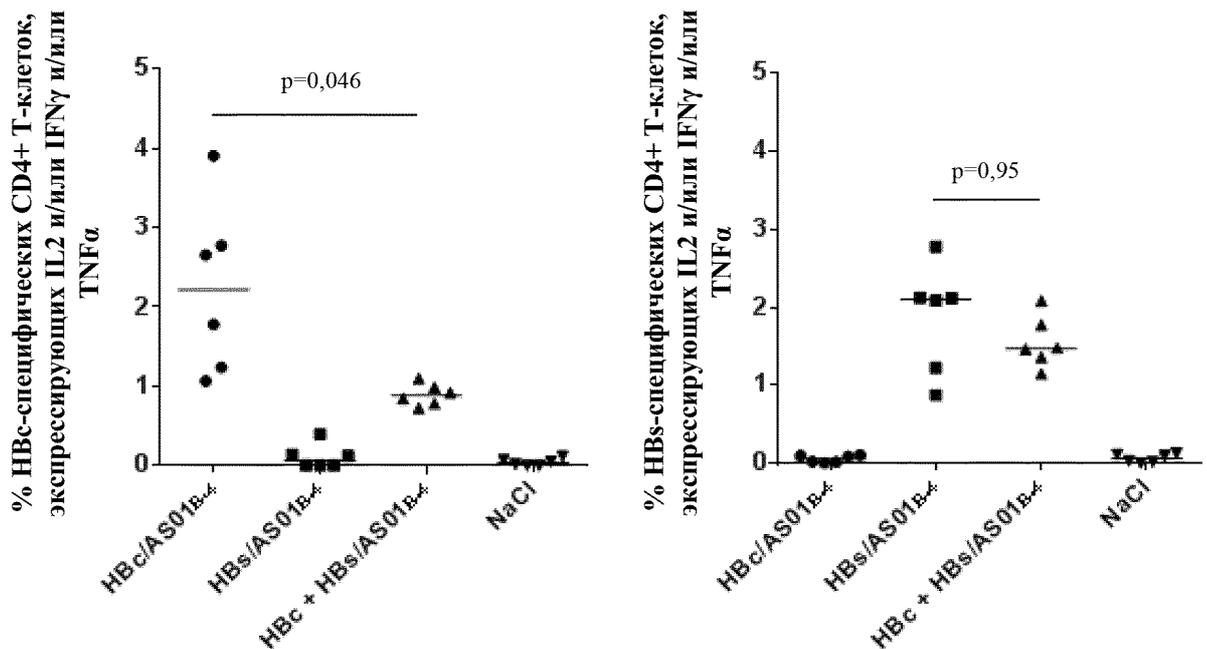
Фиг. 1 HBs-специфический (А) и HBs-специфический (В) CD8⁺ Т-клеточные ответы через 14 дней после первичной иммунизации ChAd155-HBV (с и без hIi) и через 7 дней после бустерной иммунизации MVA-HBV (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)



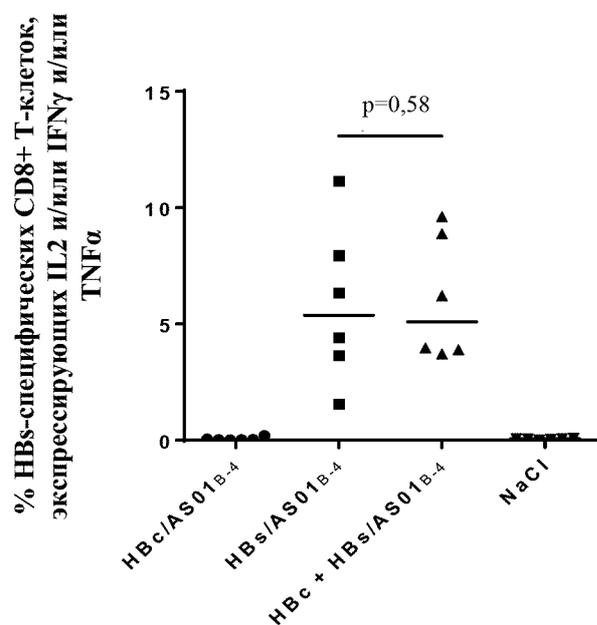
Фиг. 2 HBc-специфические гуморальные ответы через 14 дней после первичной иммунизации ChAd155-HBV (с и без hIi) и 7 дней после бустерной иммунизации MVA-HBV (показаны значения у отдельных животных и средние геометрические значения и 95% ДИ)



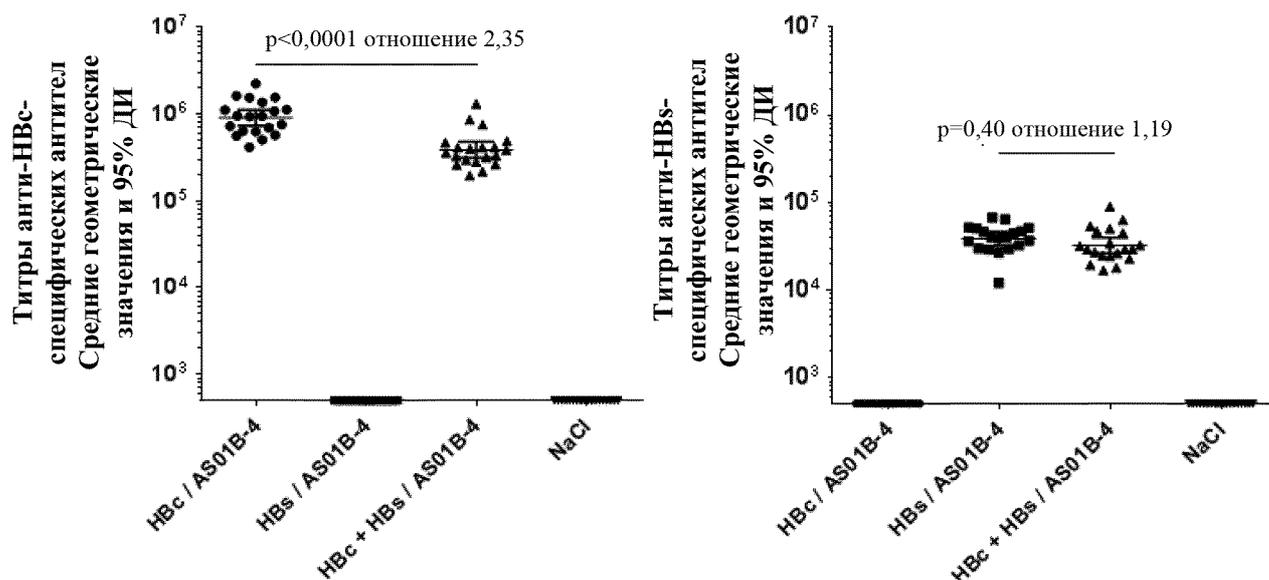
Фиг. 3 HBc и HBs-специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы через 7 дней после третьего введения (показаны значения в пулах из 5 животных/группу и медианные значения)



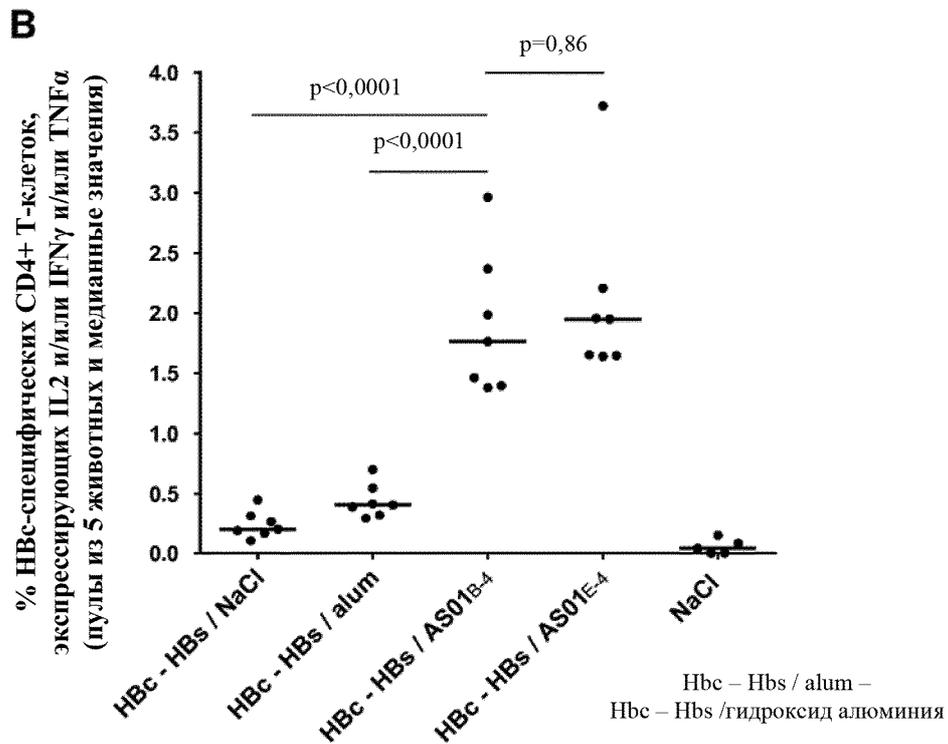
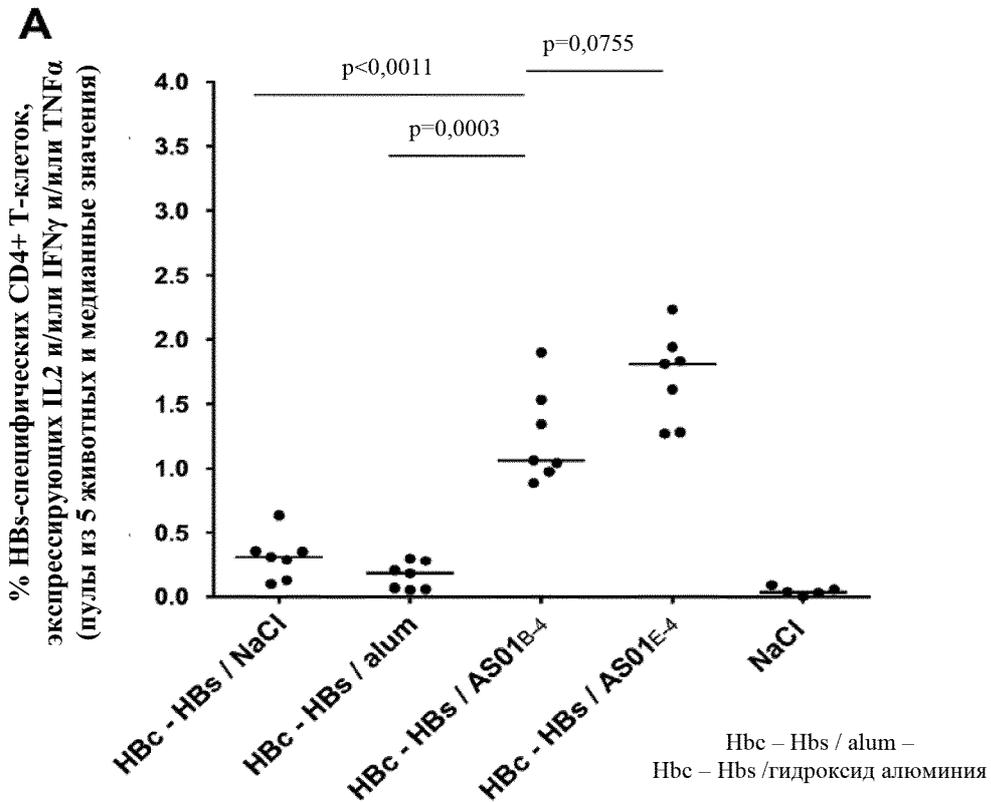
Фиг. 4 HBs специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ через 7 дней после третьего введения (показаны значения в пулах из 5 животных/группу и медианные значения)



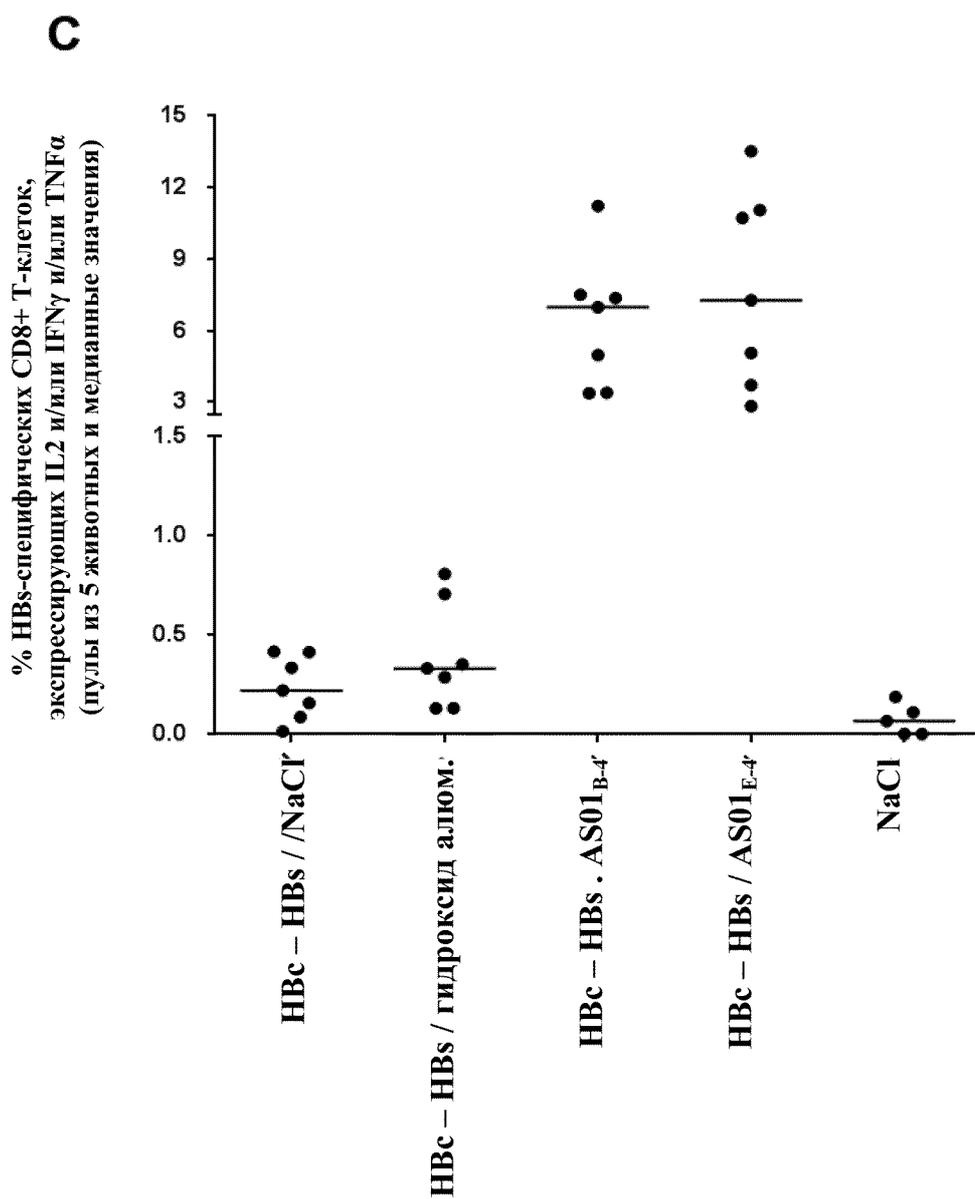
Фиг. 5 Анти-HBc и анти-HBs гуморальные ответы через 14 дней после третьего введения (показаны значения у отдельных животных, средние геометрические и 95% ДИ)



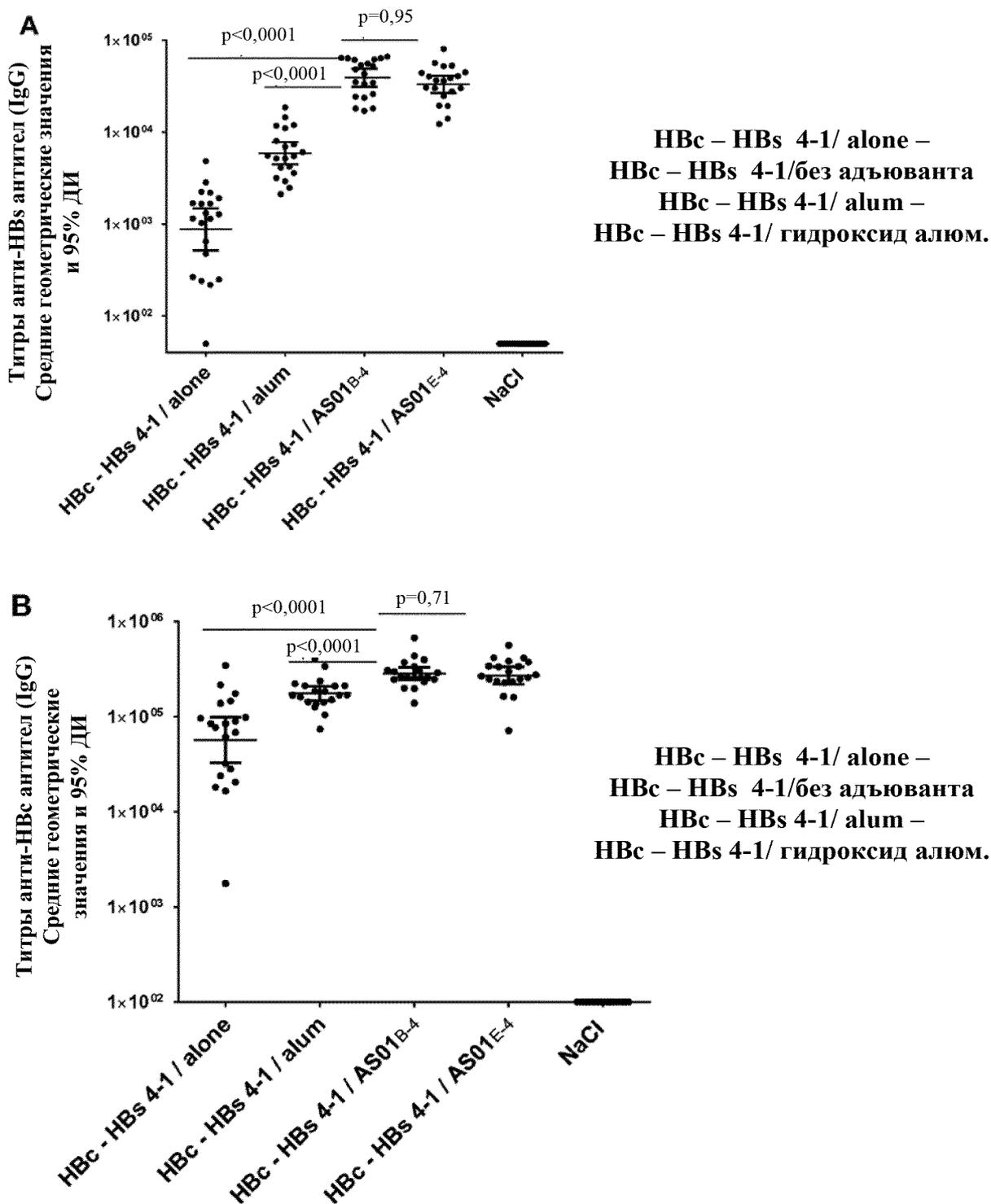
Фиг. 6 HBs- (А) и HBc- (В) специфические CD4+ и HBs-специфические CD8+ (С) Т-клеточные ответы через 7 дней после третьего введения (показаны значения в пулах из 5 животных/группу и медианные значения)



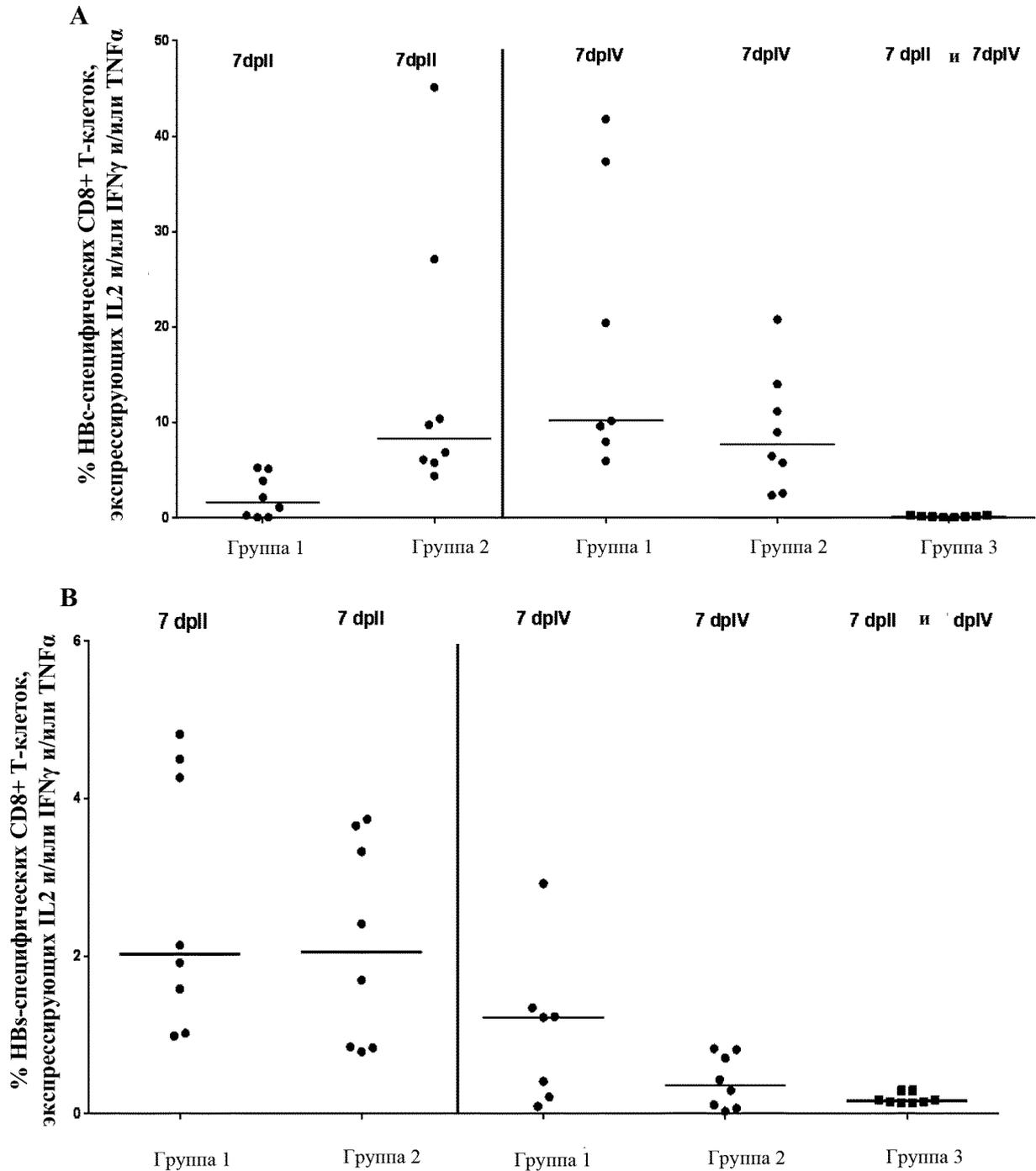
Фиг. 6 продолж. HBs- (А) и HBc- (В) специфический CD4+ и HBs-специфический CD8+ (С) Т-клеточные ответы через 7 дней после третьего введения (показаны значения в пулах из 5 животных/группу и медианные значения)



Фиг. 7 HBs- (A) и HBc- (B) специфические гуморальные ответы через 14 dpIII (показаны значения у отдельных животных, средние геометрические значения и 95% ДИ)



Фиг. 8 HBs- (А) и HBs- (В) специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы через 7 дней после второго и четвертого введения (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

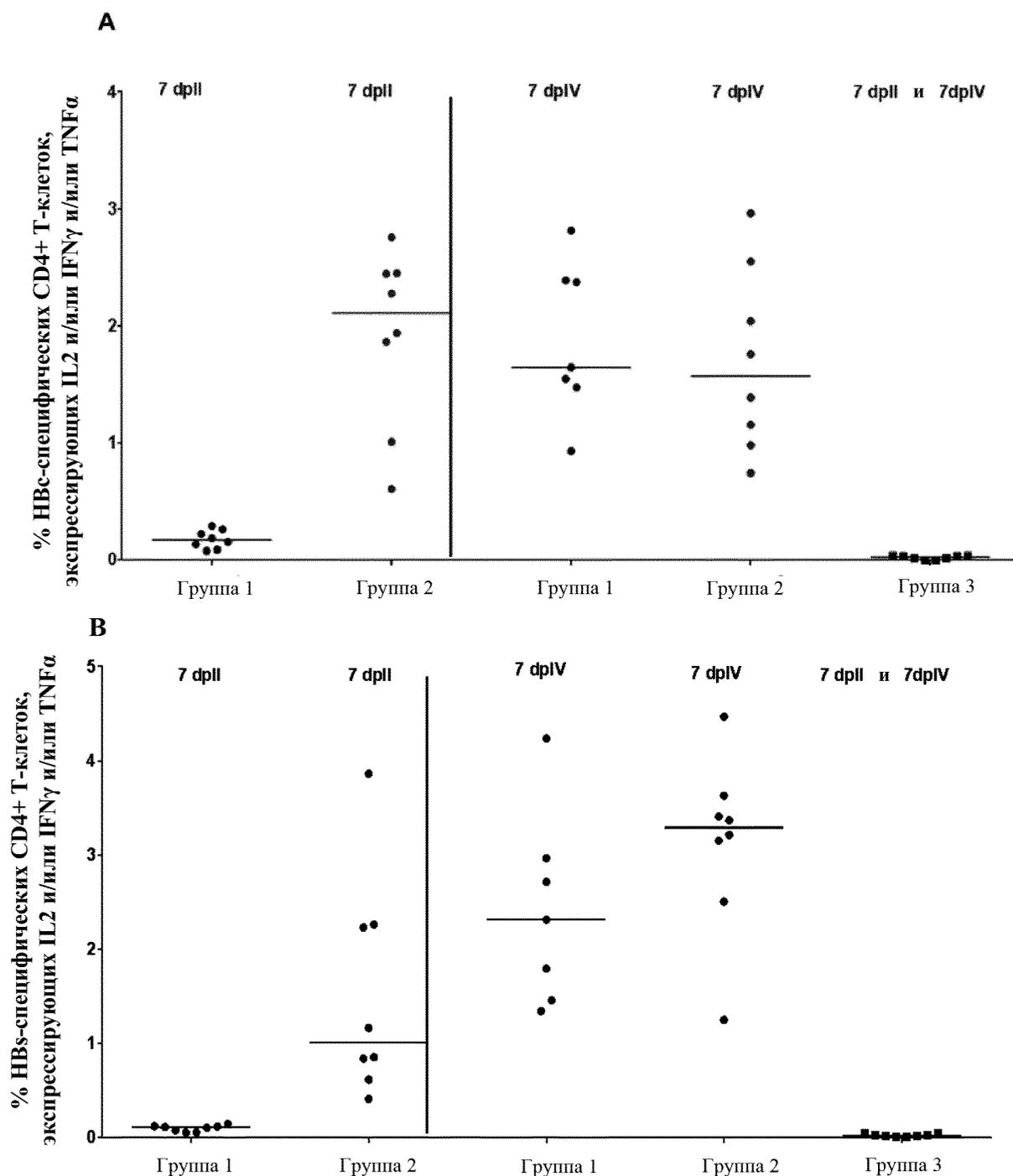


Группа 1: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV в День 28, HBs-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 42 и 56. Одна экспериментальная точка 7dpIV отсутствует из-за технического сбоя.

Группа 2: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV + HBs/HBs 4-1/AS01_{B-4} в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV+ HBs-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 28, 42 и 56

Группа 3: мыши, получавшие инъекцию NaCl в Дни 0, 28, 42 и 56.

Фиг. 9 HBc- (А) или HBs- (В) специфические CD4⁺ Т-клеточные ответы через 7dpiII и 7dpiIV (показаны значения у отдельных животных и медианные значения)

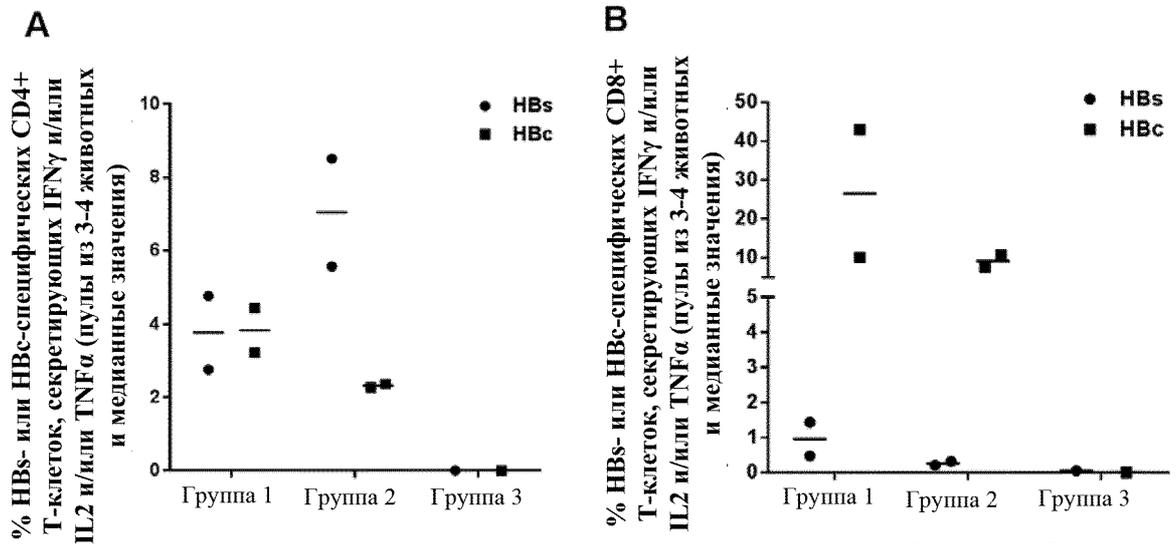


Группа 1: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV в День 28, HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 42 и 56. Одна экспериментальная точка 7dpiIV отсутствует из-за технического сбоя.

Группа 2: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV + HBc/HBs 4-1/AS01_{B-4} в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV + HBc-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 28, 42 и 56

Группа 3: мыши, получавшие инъекцию NaCl в Дни 0, 28, 42 и 56.

Фиг. 10 HBs- и HBs-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки в инфильтрирующих печень лимфоцитах через 7 дней после четвертого введения (показаны значения в пулах из 3-4 животных/группу и медианные значения)

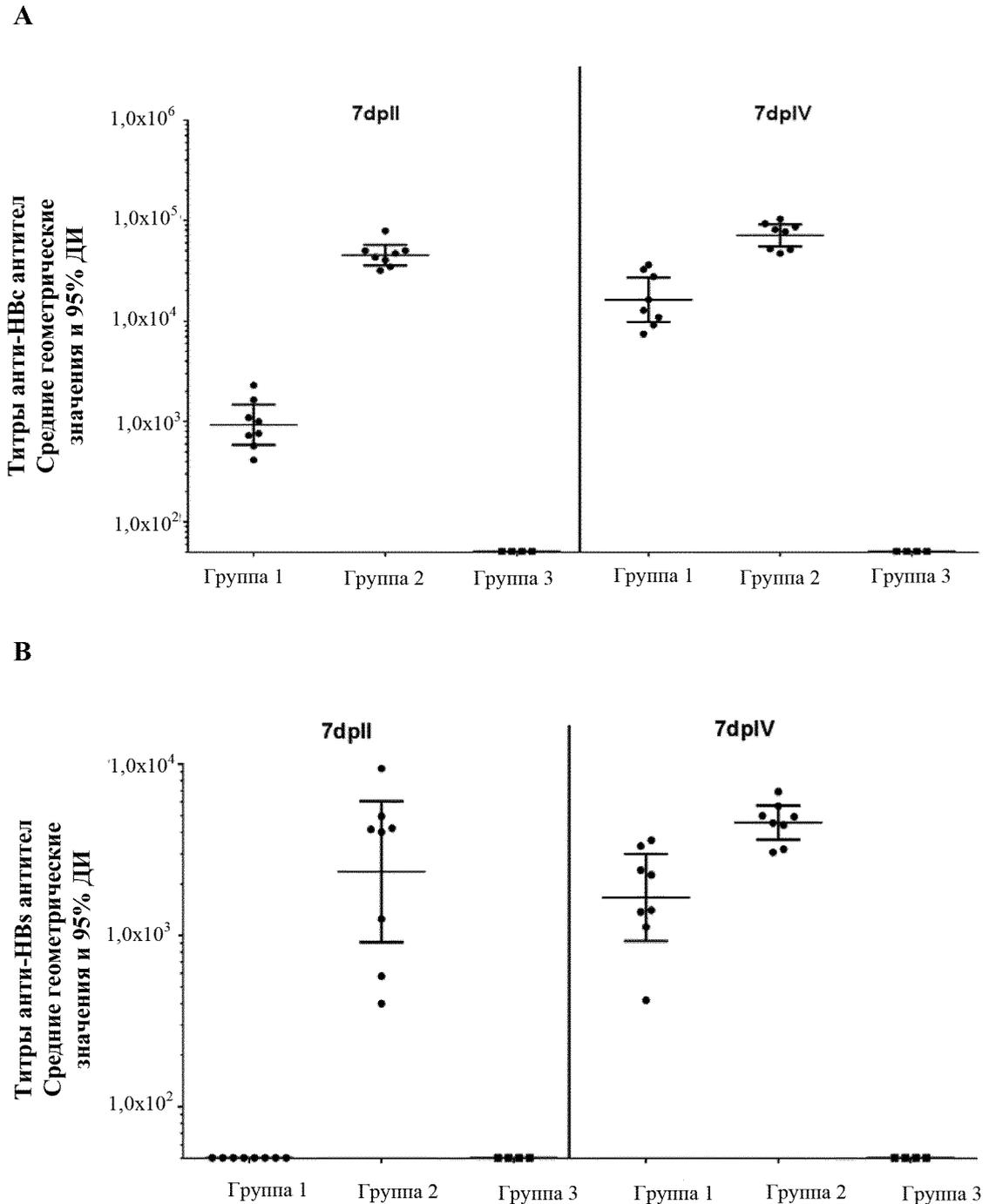


Группа 1: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV в День 28, HBs-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 42 и 56. Одна экспериментальная точка 7dpIV отсутствует из-за технического сбоя.

Группа 2: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV + HBs/HBs 4-1/AS01_{B-4} в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV + HBs-HBs 4-1/AS01_{B-4} в Дни 28, 42 и 56

Группа 3: мыши, получавшие инъекцию NaCl в Дни 0, 28, 42 и 56.

Фиг. 11 НВс-специфический гуморальный ответ после вакцинации по схеме прайм-буст (показаны значения у отдельных животных и средние геометрические значения)

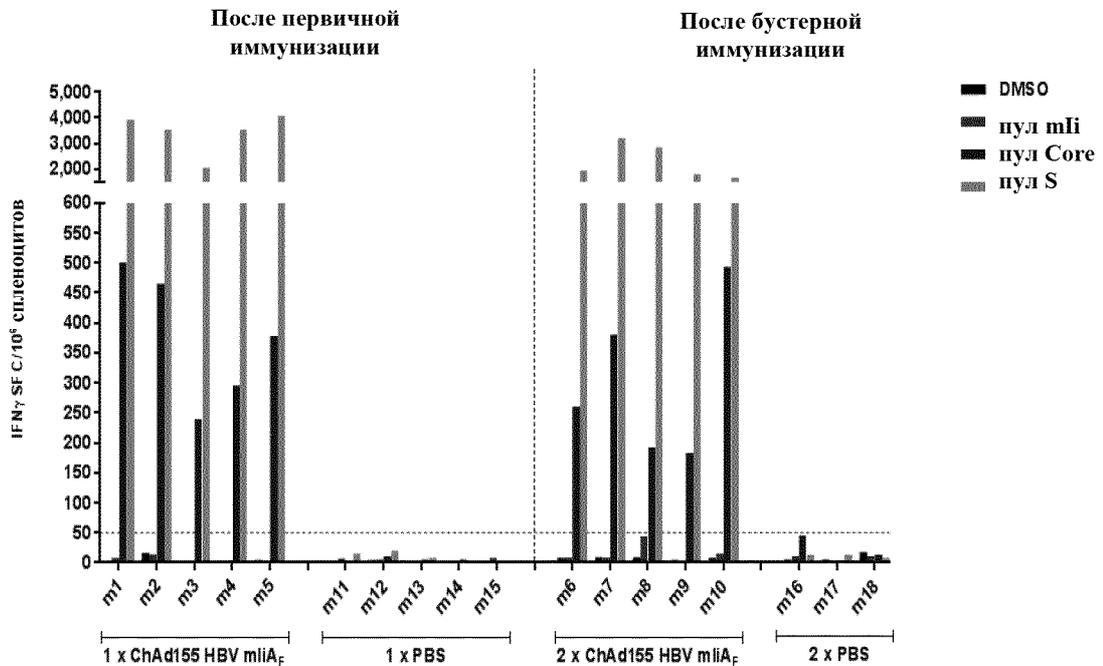


Группа 1: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV в День 28, НВс-НВс 4-1/AS01_{B-4} в Дни 42 и 56.

Группа 2: мыши, иммунизированные 10^8 вч ChAd155-hIi-HBV + НВс/НВс 4-1/AS01_{B-4} в День 0, 10^7 БОЕ MVA-HBV + НВс-НВс 4-1/AS01_{B-4} в Дни 28, 42 и 56.

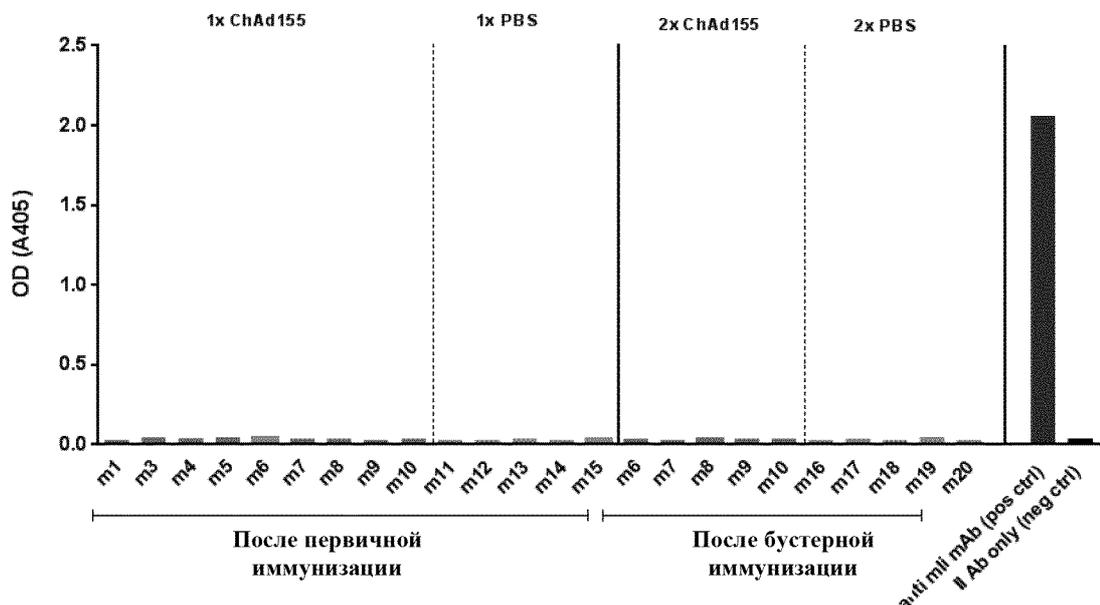
Группа 3: мыши, получавшие инъекцию NaCl в Дни 0, 28, 42 и 56.

Фиг. 12 mIi-, HBc- и HBs-специфические ответы по результатам определения IFN γ методом ELISpot через 2 недели после первой и второй инъекций



mIi-, HBc- и HBs-специфические ответы на 2 введения ChAd155-mIi-HBV (10⁹ вч) по результатам определения IFN- γ методом ELISpot у мышей CB6F1 через 2 недели после первой и второй инъекций (5 животных/группу/моменты времени). Красная пунктирная линия обозначает порог чувствительности метода.

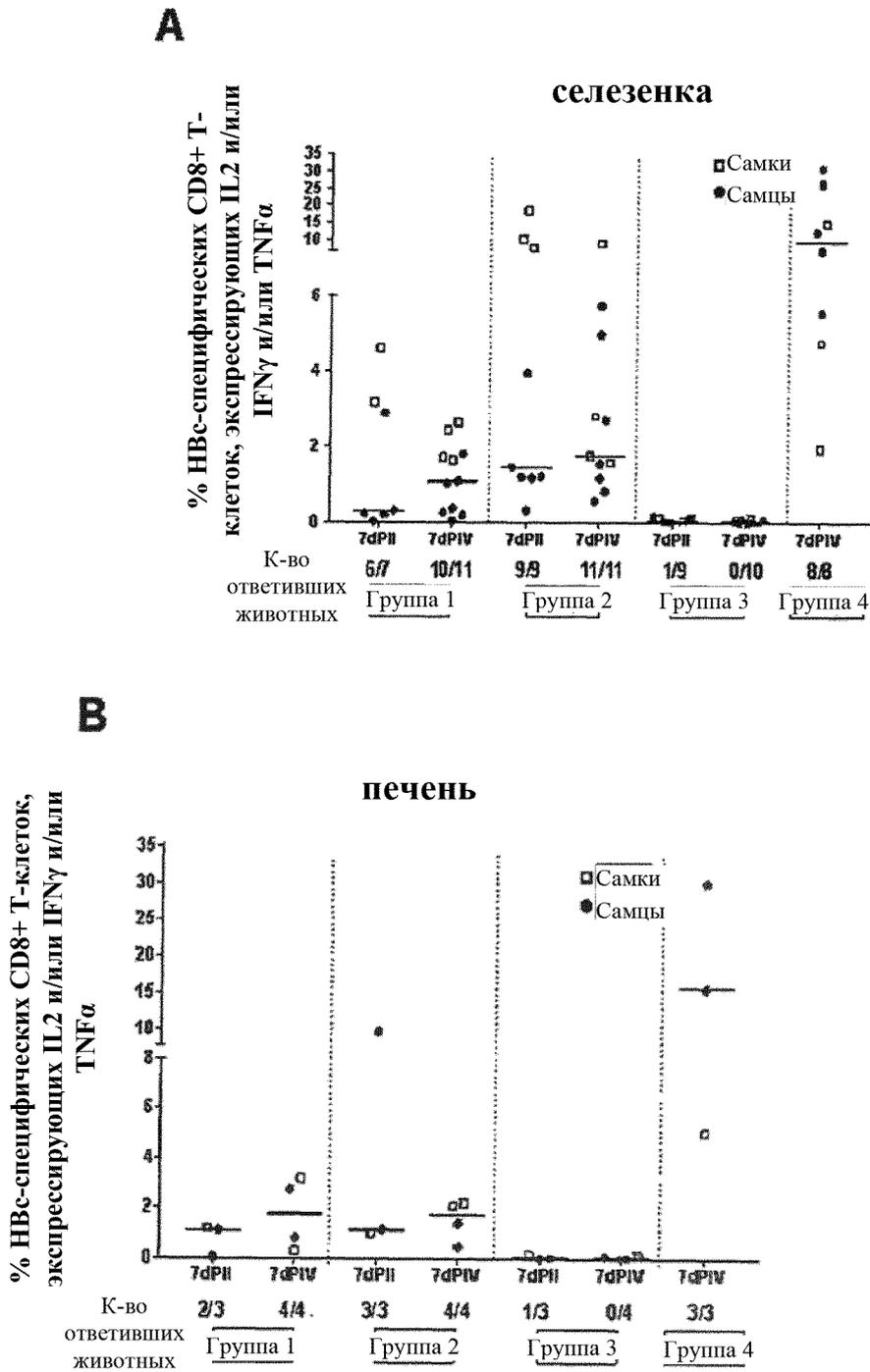
Фиг. 13 Анти-mIi гуморальные ответы (ELISA), вызванные 2 введениями ChAd155-mIi-HBV (10⁹ вч) у мышей CB6F1 через 2 недели после первой и второй инъекций



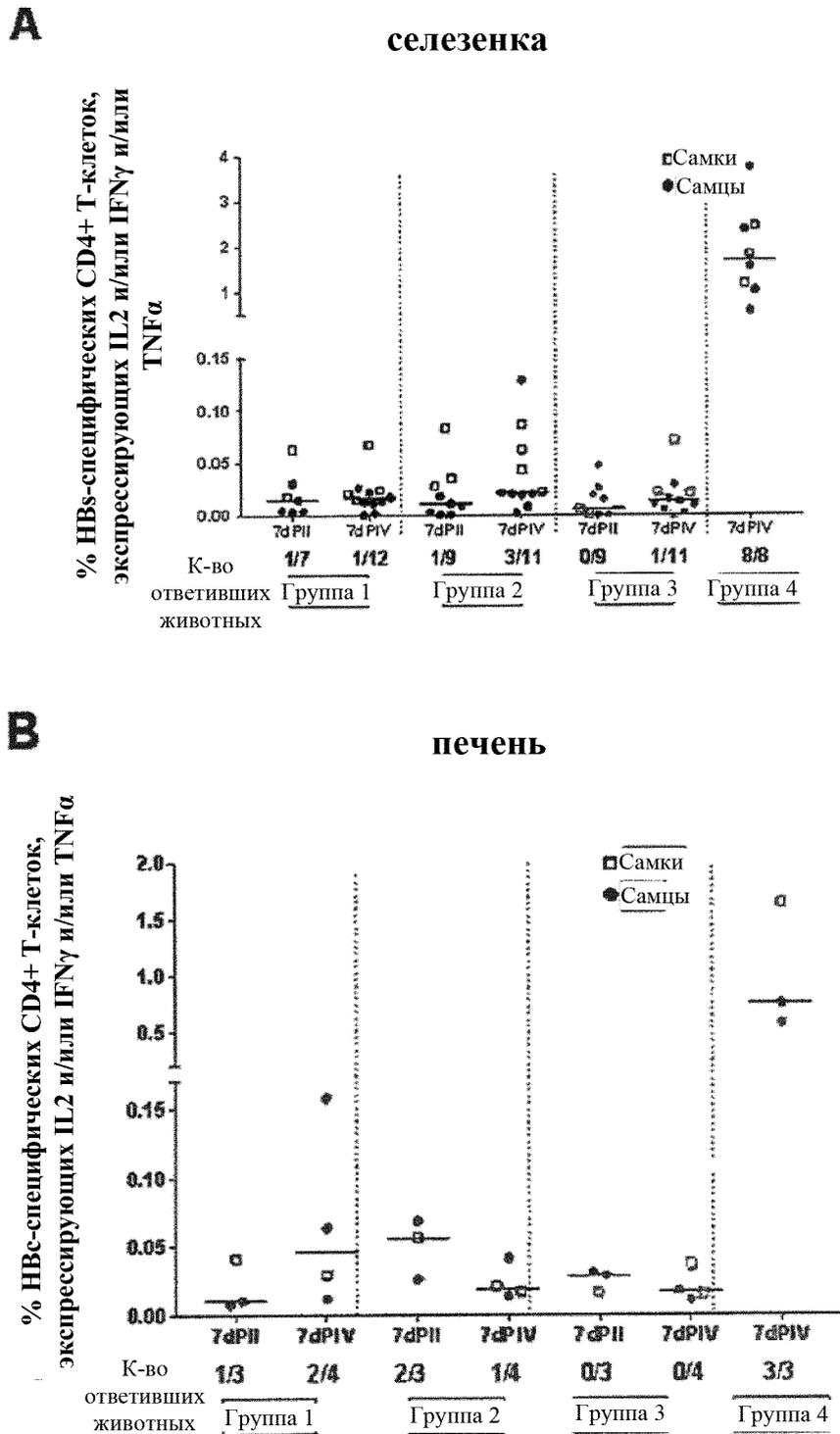
Образование анти-mIi антител (ELISA) в ответ на 2 введения ChAd155-mIi-HBV (10⁹ вч) у мышей CB6F1 через 2 недели после первой и второй инъекций (показаны данные для 10 животных после первой инъекции и 5 животных после второй инъекции).

Anti mIi mAb (pos ctrl) - монокл. а/т к mIi (полож. контр); Ab only (neg ctrl) - только втор. а/т (отиц. контроль)

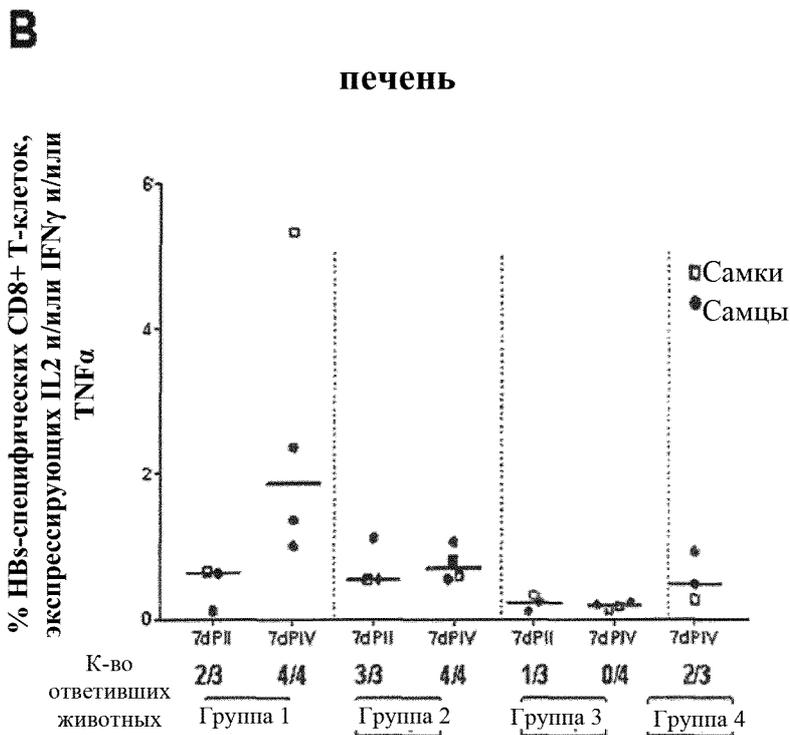
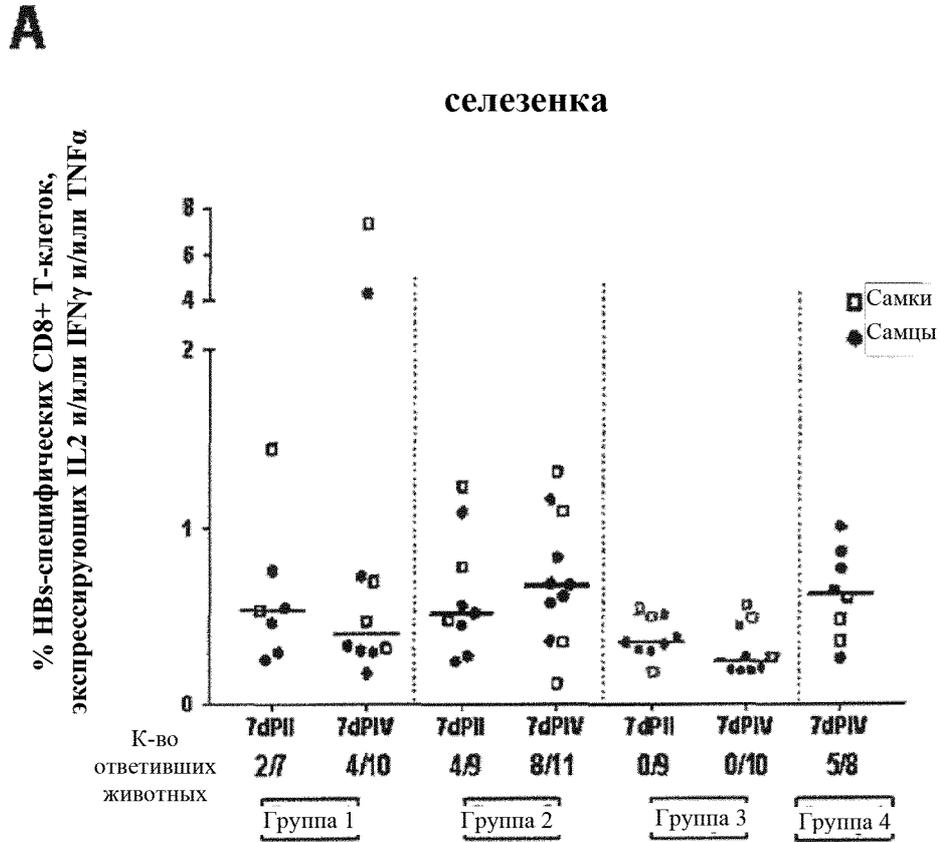
Фиг. 14 HBs-специфические CD8+T клетки в селезенке (А) или печени (В) на 7dpII и 7dpIV



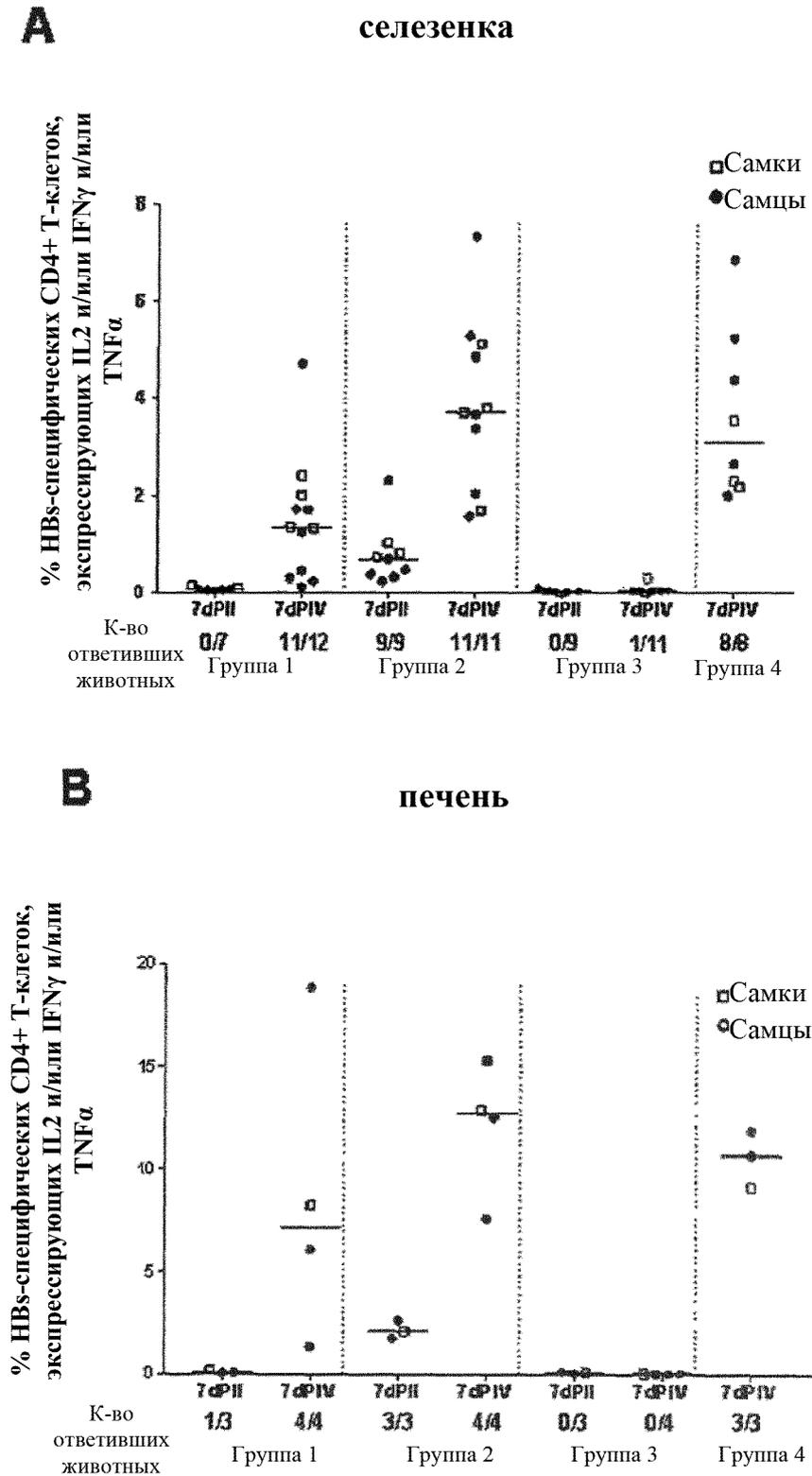
Фиг. 15 HBs-специфические CD4+ Т клетки селезенки (А) или печени (В) на 7dpII и 7dpIV



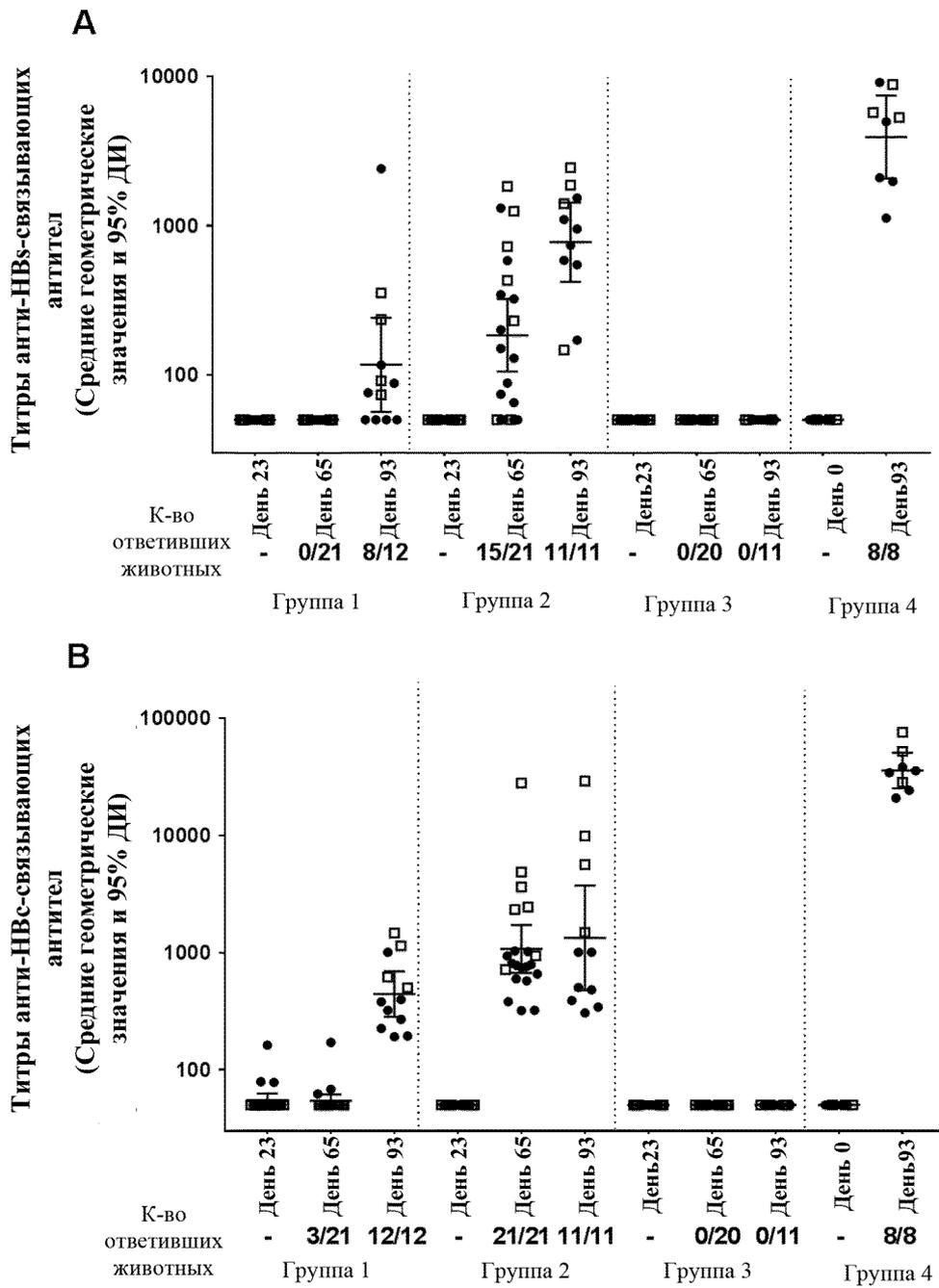
Фиг. 16 HBs-специфические CD8+ Т клетки селезенки (А) или печени (В) на 7dpII и 7dpIV



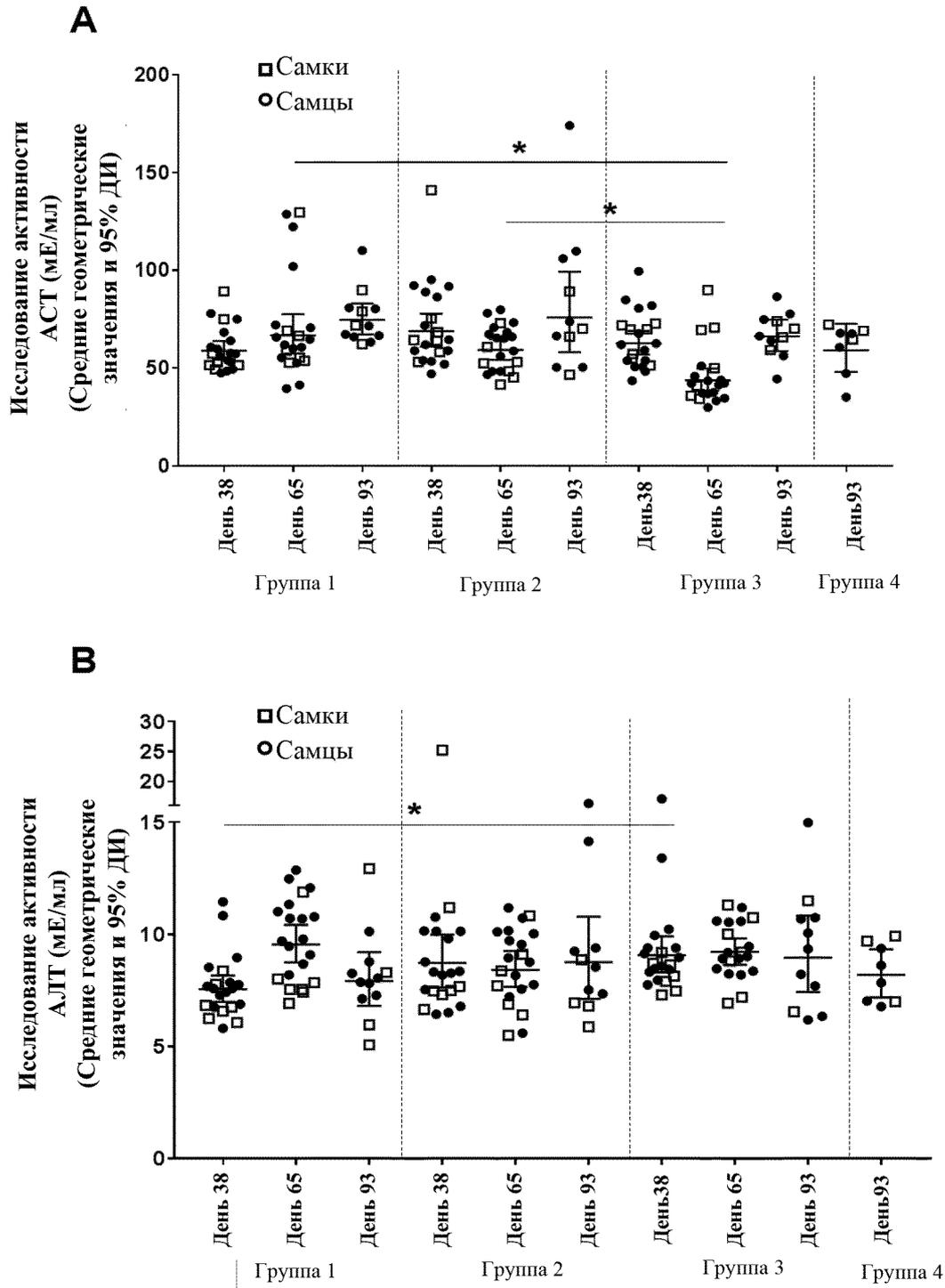
Фиг. 17 HBs-специфические CD4+ Т-клетки селезенки (А) или печени (В) на 7dpII и 7dpIV



Фиг. 18 Анти-НВs и анти-НВс связывающие антитела в Дни 23, 65 и 93



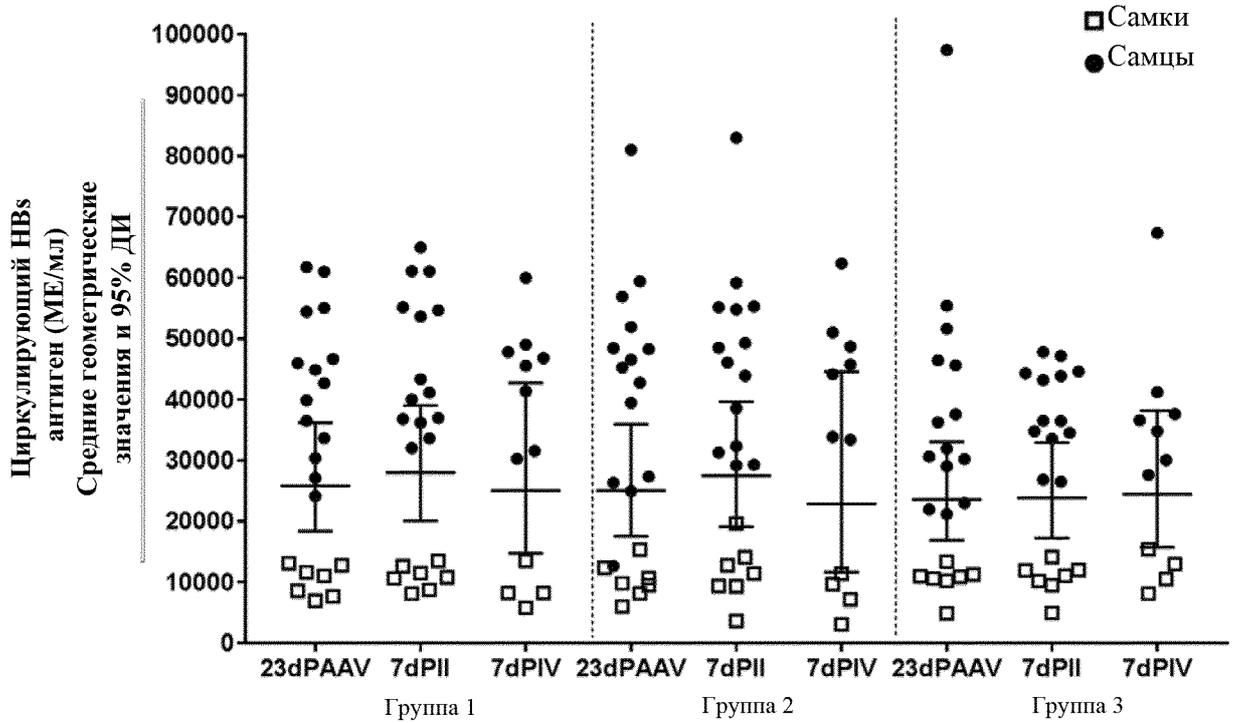
Фиг. 19 Уровни АСТ и АЛТ, измеренные в сыворотке мышей (группы 1, 2, 3 и 4) в Дни 38, 65 и/или 93



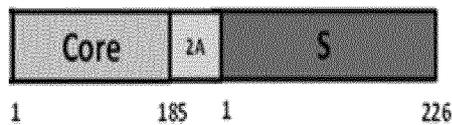
Определяли уровни АЛТ и АСТ в Дни 38 и 65 у 21 животных/группу в День 93, у 12 животных из группы 1, у 11 животных из групп 2 и 3 и у 8 животных из группы 4.

* означает статистическую значимость.

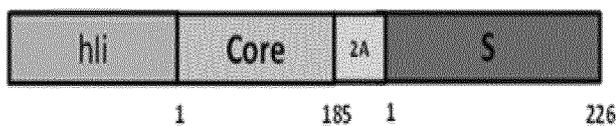
Фиг. 20 Уровни HBs антигена в сыворотке мышей, получавших инъекции AAV2/8-HBV



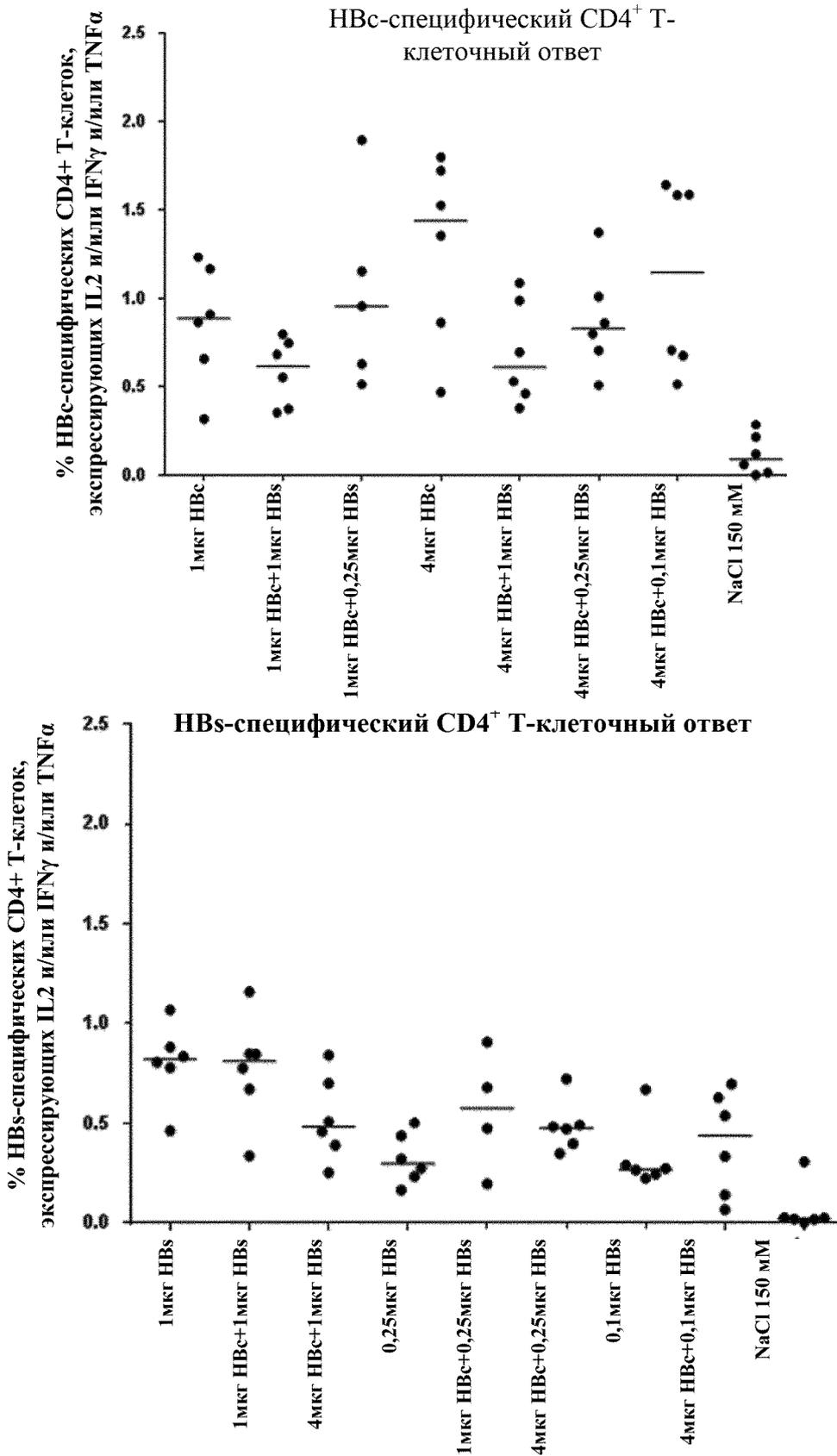
Фиг. 21 Структура конструкции HBc-2A-HBs, встроенной в вектор



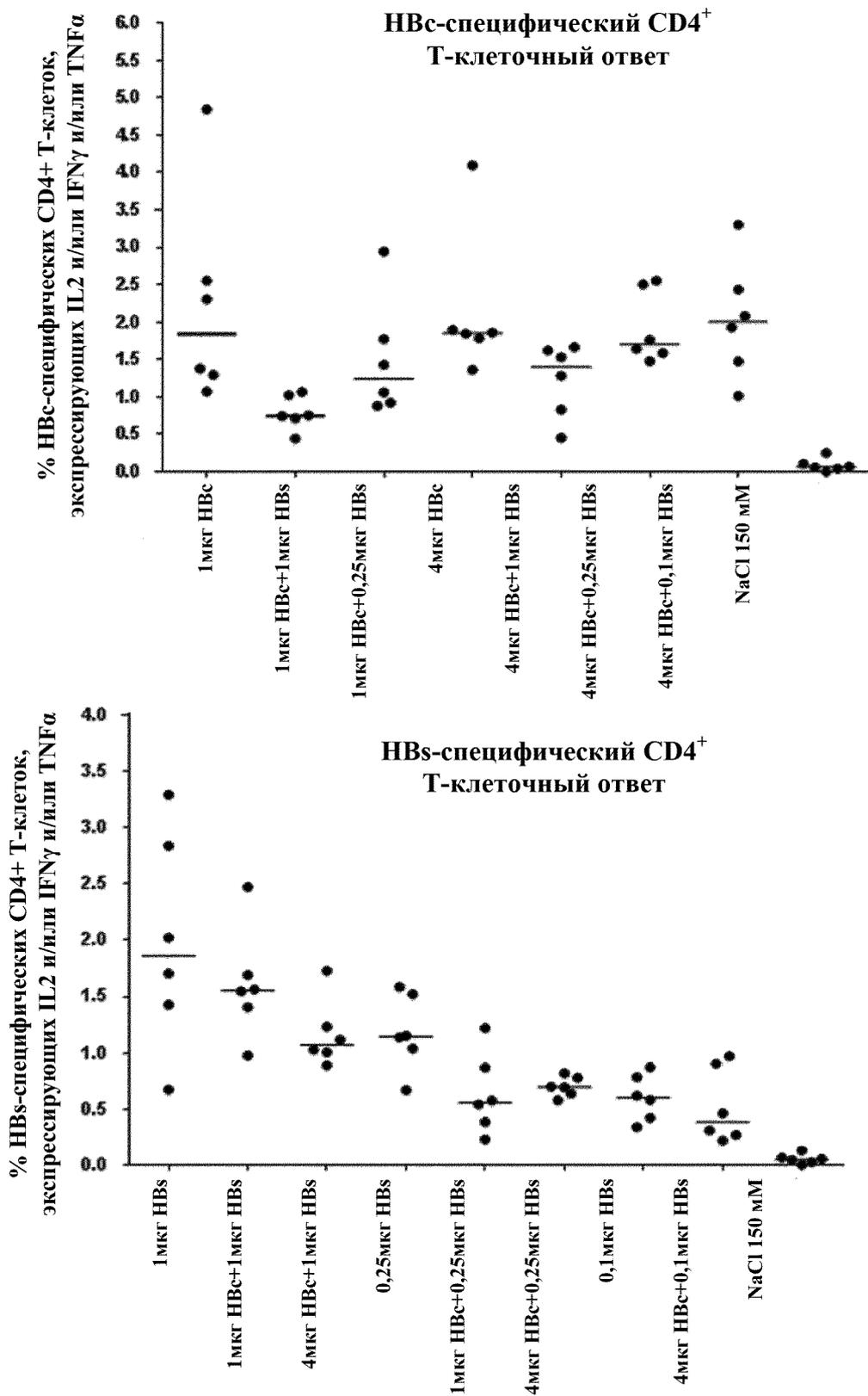
Фиг. 22 Структура конструкции hIi-HBc-2A-HBs, встроенной в вектор



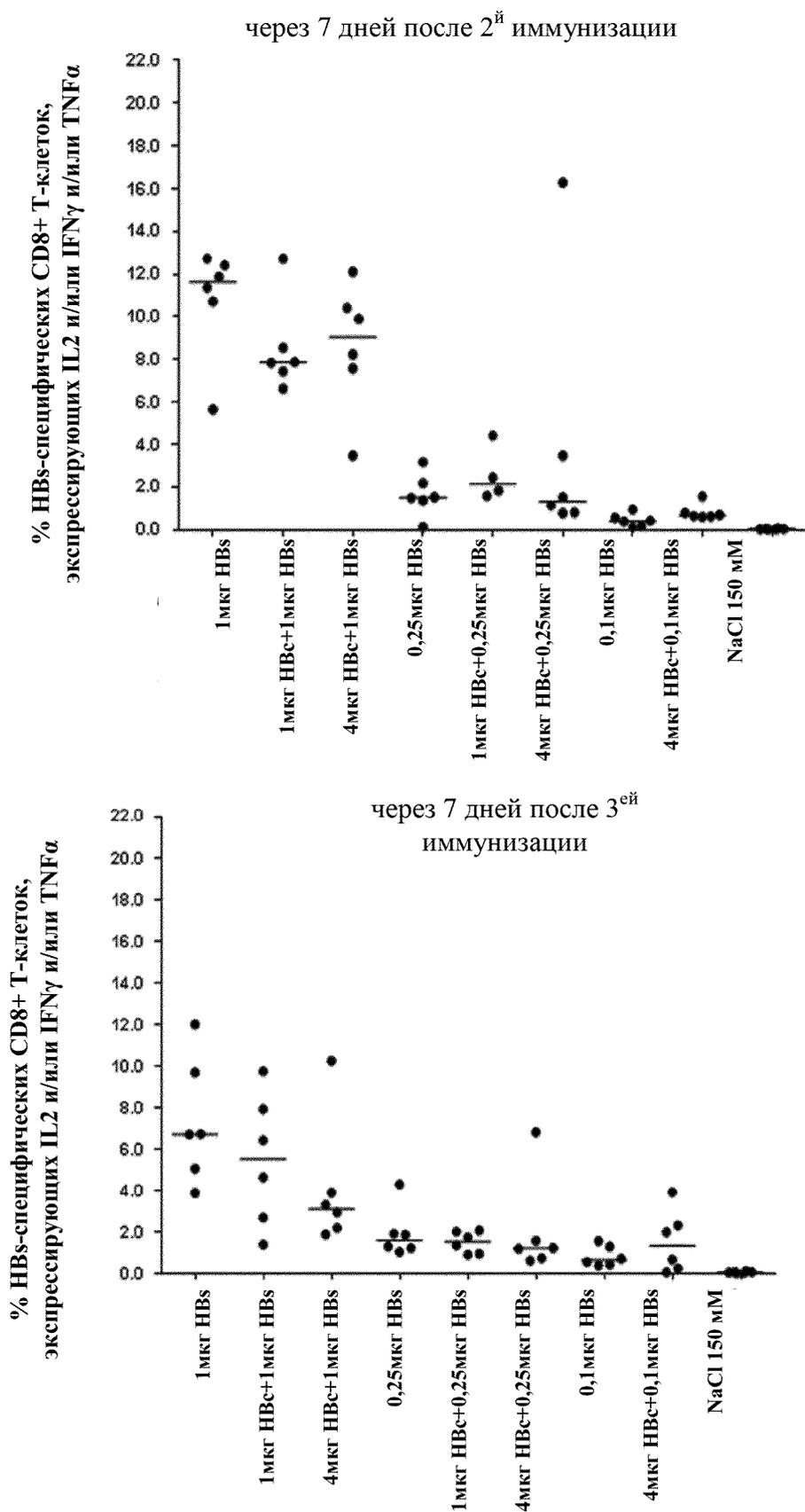
Фиг. 23 Процентное содержание HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток среди лейкоцитов мышей СВ6F1 через 7 дней после 2^й иммунизации



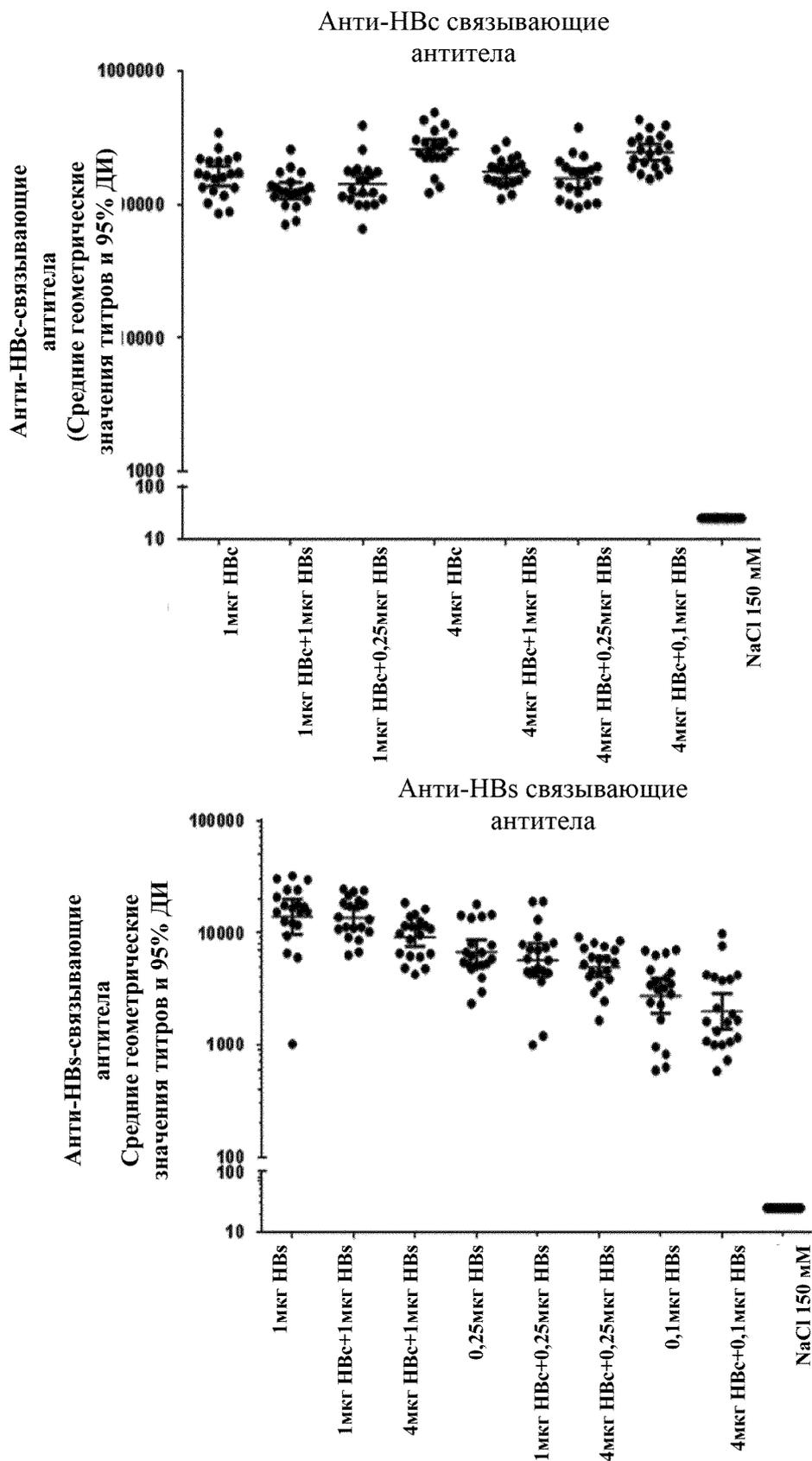
Фиг. 24 Процентное содержание HBc- и HBs-специфических CD4⁺ Т-клеток среди лейкоцитов мышей СВ6F1 через 7 дней после 3^{ей} иммунизации



Фиг. 25 Процентное содержание HBs-специфических CD8⁺ Т-клеток среди лейкоцитов мышей СВ6F1 через 7 дней после 2^й и 3^{ей} иммунизации



Фиг. 26 Анти-НВс и НВс-гуморальные ответы, вызванные у мышей СВ6F1 через 14 дней после 2^й иммунизации



Фиг. 27 Анти-НВс и НВс-гуморальные ответы, вызванные у мышей СВ6F1 через 14 дней после 3^{ей} иммунизации

