

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091178** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.09.01

(51) Int. Cl. *C07K 14/05* (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.14

(54) **АНТИГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР**

(31) **62/608,038**

(32) **2017.12.20**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2018/060101**

(87) **WO 2019/123169 2019.06.27**

(71) Заявитель:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:

**Капоне Стефаниа, Фольгори
Антонелла, Лахм Армин (IT), Визел
Бенджамин (US)**

(74) Представитель:

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

(57) В изобретении предложены антигенные полинуклеотиды, полипептиды и векторы на основе вируса Эпштейна-Барр; а также содержащие их иммуногенные композиции. Изобретение включает применение антигенных конструкций на основе вируса Эпштейна-Барр для получения вакцин для лечения и профилактики инфекций, вызванных вирусом Эпштейна-Барр, и обусловленных вирусом Эпштейна-Барр заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и системная красная волчанка.

A1

202091178

202091178

A1

АНТИГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР

ДЕКЛАРАЦИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО ИНТЕРЕСА

Данное изобретение было создано в рамках Соглашения о сотрудничестве в области научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ с Национальными институтами здравоохранения, агентством Министерства здравоохранения и социального обеспечения. Правительство Соединенных Штатов Америки обладает определенными правами на данное изобретение.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который предоставлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 5 декабря 2018 г., названа VU66487_WO_SL.txt и имеет размер 419 960 байт.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к области лечения и профилактики вирусных инфекций. В частности, настоящее изобретение относится к конструкциям, содержащим антиген вируса Эпштейна — Барр. Изобретение включает применение конструкций, содержащих антиген вируса Эпштейна - Барр, для лечения и профилактики инфицирования вирусом Эпштейна - Барр и заболеваний, обусловленных вирусом Эпштейна - Барр.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус Эпштейна — Барр (Epstein-Barr Virus, EBV), также известный как вирус герпеса человека 4 типа (HHV-4), является одним из самых распространенных вирусов человека, которым инфицировано по меньшей мере 90% взрослых. У большинства инфицированных лиц устанавливается латентная инфекция EBV, но также известно, что он является первичным возбудителем инфекционного мононуклеоза.

Более значимо, что инфицированием EBV обусловлены определенные типы злокачественных новообразований (например, карцинома желудка, карцинома носоглотки, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта), а также повышенный риск рассеянного склероза (РС), системной красной волчанки (СКВ), ревматоидного артрита (РА) и синдрома Шегрена.

Как и другие представители семейства герпесвирусов, EBV содержит двунитевой ДНК-геном размером около 192 т.п.о, кодирующий около 85 генов. Геном EBV заключен в белковый нуклеокапсид, окруженный тегументом вируса. Слой внешней оболочки содержит липиды и поверхностные гликопротеины, которые считают вовлеченными в нацеливание вируса на первичные клетки-хозяева В-лимфоциты и эпителиальные клетки.

Цикл вирусной репликации EBV хорошо охарактеризован. После начального инфицирования клеток-хозяев EBV вступает в стадию активной продукции инфекционных вирионов, называемую литической стадией репликации (или литической стадией). В ходе литической стадии экспрессия генов EBV характеризуется экспрессией одного или более продуктов литических генов, включающих ZEBRA, BRLF1, BNLF2, BCRF1, и антигенов вирусного капсида (VCA); а также гликопротеинов оболочки, таких как gp350 и gp110.

После окончания периода литической репликации EBV переходит в состояние стойкой вирусной инфекции без активной продукции вируса, называемое латентностью (или латентной фазой). Латентная инфекция EBV сопровождается программой экспрессии характеристических генов, включая экспрессию продуктов одного или более латентных генов, таких как EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, лидерный белок EBNA (EBNA-LP), LMP1 и/или LMP2. В латентно-инфицированных клетках продукция литического вируса может повторно активироваться пока неизвестными пусковыми механизмами.

Ряд вакцин-кандидатов против EBV прошел оценку в биологических моделях и клинических исследованиях. Большинство профилактических вакцин-кандидатов выполнено на основе основного гликопротеина оболочки EBV в качестве иммуногена. Gu et al. сообщили, что рекомбинантный живой вирус осповакцины, экспрессирующий gp350 EBV, вызывал выработку нейтрализующих антител и умеренную защиту у детей, но не обеспечивал ее у взрослых. Gu et al., *Dev. Biol. Stand.* 1995; 84: 171–177. Было обнаружено, что рекомбинантная вакцина gp350 не обеспечивает защиту против инфекции EBV, но приводит к уменьшению частоты развития инфекционного мононуклеоза. Sokal et al., *J. Infect. Dis.* 2007;196(12):1749–1753.

Терапевтические вакцины-кандидаты против EBV в основном нацелены на Т-клеточные эпитопы ядерного антигена-1 EBV (EBNA1) и LMP2. Например, Taylor et al. описали модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), экспрессирующий пептидный фрагмент EBNA1, слитый с полноразмерным белком LMP2. Было описано, что в ранних клинических исследованиях так называемая вакцина MVA-EL индуцирует

антигенспецифические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Taylor et al., J. Virol. Jan. 2004, p. 768–778. Было описано, что рекомбинантный аденовирусный вектор человека, экспрессирующий полноразмерный белок LMP2, аналогичным образом индуцировал антигенспецифические ответы Т-лимфоцитов *in vitro* и у мышей. Pan et al., Biochem Biophys Res Commun. 2006 Sep 1;347(3):551–7.

Несмотря на очевидную потребность в данной области техники, до сих пор ни одна вакцина против EBV не зарегистрирована для медицинского применения. Таким образом, существует необходимость в вакцине EBV для применения в профилактике инфекции, вызванной EBV, а также в лечении обусловленных EBV злокачественных новообразований и обусловленных EBV заболеваний, таких как рассеянный склероз.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения предлагают антигенные полипептиды EBV, полинуклеотиды и векторы, полезные в качестве компонентов иммуногенных композиций для индукции у субъекта иммунного ответа против инфекции, вызванной вирусом Эпштейна - Барр (EBV); способы их применения в профилактике и лечении вызванной EBV инфекции и обусловленных EBV заболеваний; и способы их изготовления.

Предложен полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, содержащий:

- (а) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 1,
- (б) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 6,
- (в) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 11, и
- (г) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 13;

где полинуклеотид функционально связан с одной или более последовательностями, управляющими экспрессией указанного полипептида в клетке-хозяине. В некоторых воплощениях изобретения полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 21.

Также предложен полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, содержащий:

(а) по меньшей мере два фрагмента LMP1 (латентный мембранный белок 1) из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 1, где фрагменты LMP1 не примыкают друг к другу,

(б) по меньшей мере два фрагмента LMP2 (латентный мембранный белок 2) из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 6, где фрагменты LMP2 не примыкают друг к другу,

(в) по меньшей мере два фрагмента EBNA1 (ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барр) из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 11, где фрагменты EBNA1 не примыкают друг к другу,

(г) по меньшей мере два фрагмента EBNA3A (ядерный антиген 3 вируса Эпштейна-Барр) из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 13, где фрагменты EBNA3A не примыкают друг к другу, и/или

(д) по меньшей мере два фрагмента ZEBRA (кодируемый BamHI Z активатор репликации вируса Эпштейна-Барр) из по меньшей мере 8 аминокислот SEQ ID NO: 21, где фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу;

где полинуклеотид функционально связан с одной или более последовательностями, управляющими экспрессией указанного полипептида в клетке-хозяине.

Также предложен полинуклеотид, как описано выше, где антигенный полипептид EBV содержит:

- (а) первый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 2,
- (б) второй фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 3,
- (в) третий фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 4,
- (г) четвертый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 5,
- (д) первый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 7,
- (е) второй фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 8,
- (ж) третий фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 9,
- (з) четвертый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 10,
- (и) первый фрагмент EBNA1, состоящий из SEQ ID NO: 12,
- (к) первый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 14,
- (л) второй фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 15,
- (м) третий фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 16,
- (н) четвертый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 17,
- (о) пятый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 18,

(п) шестой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 19, и

(р) седьмой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 20,

где первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP1 не примыкают друг к другу; первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP2 не примыкают друг к другу; и первый, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой фрагменты EBNA3A не примыкают друг к другу. Возможно, полипептид дополнительно содержит: (а) первый фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 22, и (б) второй фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 23, где первый и второй фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу.

Также предложен полинуклеотид, как описано выше, где антигенный полипептид EBV по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

Также предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, как описано в настоящем документе, включая, например, аденовирусные векторы (например, векторы на основе аденовирусов обезьян, отличающихся от человека) и векторы на основе вируса осповакцины (например, векторы на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA)).

Также предложены антигенные полипептиды EBV, кодируемые полинуклеотидами и векторами, как описано в настоящем документе, такие как полипептиды, по меньшей мере на 80% идентичные SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

Также предложены композиции, содержащие полинуклеотиды, векторы и полипептиды, описанные в настоящем документе; и фармацевтически приемлемый эксципиент. Такие композиции возможно содержат один или более адьювантов.

Также предложены виды применения полинуклеотидов, векторов, полипептидов и композиций, как описано в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного инфицированием вирусом Эпштейна — Барр.

Также описаны способы индукции иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту полинуклеотидов, векторов, полипептидов и композиций, как описано в настоящем документе.

Также предложены способы лечения или профилактики обусловленного EBV заболевания у субъекта, включающие введение субъекту полинуклеотидов, векторов, полипептидов и композиций, как описано в настоящем документе. Обусловленные EBV заболевания включают, например, такие обусловленные EBV заболевания как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и системная красная волчанка.

Также предложены полинуклеотиды, векторы, полипептиды и композиции, как описано в настоящем документе, для применения в лечении или профилактике заболевания, вызванного инфицированием вирусом Эпштейна - Барр.

Также предложены способы индукции иммунного ответа у субъекта, включающие:

(а) введение аденовируса, содержащего полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, как описано в настоящем документе, и

(б) введение вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, как описано в настоящем документе;

где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке.

Также предложен способ лечения или профилактики обусловленного EBV заболевания у субъекта, включающий:

(а) введение аденовируса, содержащего полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, как описано в настоящем документе, и

(б) введение вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV, как описано в настоящем документе;

где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: Схематическое изображение латентных (LMP1, LMP2, EBNA1 и EBNA3A) и литических (ZEBRA) белков. Пронумерованные участки показывают иммуногенные фрагменты, используемые для конструирования поливалентных антигенных полипептидов EBV. Буквенные идентификаторы (например, a1, a2, b1, b2) соответствуют фрагментам, представленным в поливалентных конструкциях, представленных на ФИГ. 2A–B.

ФИГ. 2A–B: Схематическое изображение поливалентных антигенных конструкций на основе EBV. А) Конструкция, содержащая латентные антигены EBV (EBV-L), включающая иммуногенные фрагменты, образованные от LMP1 (идентифицированы как a1–a4), LMP2 (идентифицированы как b1–b4), EBNA1 (идентифицирован как c1) и EBNA3A (идентифицирован как d1–d7). В) Конструкция, содержащая латентные и литические антигены EBV (EBV-LLy), включающая иммуногенные фрагменты, образованные от LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA3A (все идентифицированы как на ФИГ. 2A) и ZEBRA (идентифицированы как e1–e2). Участки поливалентных антигенов с одинаковыми буквенными префиксами (т. е. a, b, c, d, e) образованы от одного и того же белка EBV.

ФИГ. 3: Схематическое изображение латентных (C1, C7 и ORF39) и литических (ORF43) белков CalHV3. Пронумерованные участки показывают иммуногенные фрагменты, используемые для конструирования поливалентных антигенных полипептидов CalHV3. Буквенные идентификаторы (например, a1, a2, b1, b2) соответствуют фрагментам, представленным в поливалентных конструкциях, представленных на ФИГ. 4А–С. Антигены C1, C7, ORF39 и ORF43 были выбраны в связи с тем, что они являются предполагаемыми ортологами вируса герпеса игрунки (*Callithrix jacchus*) для белков EBV LMP1, LMP2, EBNA1 и ZEBRA соответственно.

ФИГ. 4А–С: Схематическое изображение поливалентных антигенных конструкций на основе CalHV3. А) Конструкция, содержащая латентные антигены CalHV3 (CalHV3-L), включающая иммуногенные фрагменты, образованные из C1, C7 и ORF39. В) Конструкция, содержащая латентные и литические антигены CalHV3 (CalHV3-LLy), включающая иммуногенные фрагменты, образованные из C1, C7, ORF39 и ORF43. С) Конструкция, содержащая CalHV3-LLy из (б), слитые с инвариантной цепью (Ii), ассоциированной с ГКГ II класса. Участки поливалентных антигенов с одинаковыми буквенными префиксами (т. е. a, b, c, d) образованы от одного и того же белка CalHV3.

ФИГ. 5А: Ответы Т-лимфоцитов у мышей, иммунизированных аденовирусными векторами, кодирующими антигенные конструкции на основе EBV, в дозах 10^6 , 10^7 и 10^8 вирусных частиц (вч). ChAd155-EBV-L и ChAd155-EBV-LLy вызывали дозозависимую секрецию интерферона гамма (ИФН γ) из спленоцитов. Для каждого из латентных антигенов EBV у мышей, иммунизированных как EBV-L, так и EBV-LLy, наблюдалась активация Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию пулами пептидов, охватывающими LMP1, LMP2, EBNA1 и EBNA3A. Ответы Т-лимфоцитов на литический белок EBV ZEBRA были выявлены только у мышей, иммунизированных EBV-LLy. Ответов на соединительные пептиды (Ej) EBV или на разбавитель пула пептидов диметилсульфоксид (ДМСО), используемый в качестве отрицательного контроля, не выявлено.

ФИГ. 5В: Ответы Т-лимфоцитов у мышей, иммунизированных аденовирусными векторами, кодирующими антигенные конструкции на основе CalHV3, в дозах 10^6 , 10^7 и 10^8 вирусных частиц (вч). ChAd155-CalHV3-L и ChAd155-CalHV3-LLy вызывали дозозависимую секрецию ИФН γ из спленоцитов. Ответы Т-лимфоцитов на пулы пептидов, охватывающие латентные антигены CalHV3 C1, C7 и ORF39, были выявлены у мышей, иммунизированных как CalHV3-L, так и CalHV3-LLy. Тем не менее, ответы Т-лимфоцитов на литический белок ORF43 CalHV3 были выявлены только у мышей,

иммунизированных CalHV3-LLy. Ответов на соединительные пептиды (Cj) CalHV3 или на отрицательный контроль ДМСО не выявлено.

ФИГ. 6А–В: Влияние дозирования в режиме примирования–стимуляции на иммуногенность EBV-LLy у мышей. Иммунизация ChAd155-EBV-LLy на 0-й день с последующей стимулирующей иммунизацией MVA-EBV-LLy на 21-й день (3-я неделя) приводила к значимому увеличению EBV-специфичного высвобождения интерферона гамма по сравнению с мышами, не получившими стимулирующую иммунизацию, или с мышами, получившими стимулирующую инъекцию вектора MVA, кодирующего антиген, не связанный с EBV. На ФИГ. 6А представлены совокупные ответы Т-лимфоцитов на все антигены (LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA3A и ZEBRA), и на ФИГ. 6В показаны ответы на отдельные антигены и на отрицательный контроль ДМСО.

ФИГ. 7: Влияние дозирования в режиме примирования–стимуляции на иммуногенность CalHV3-LLy у мышей. Иммунизация ChAd155-CalHV3-LLy (примирование) на 0-й день с последующей стимулирующей иммунизацией либо той же антигенной конструкцией (ChAd155-CalHV3-LLy), либо MVA-CalHV3-LLy на 42-й день (6-я неделя) приводила к значимому увеличению CalHV3-специфичного высвобождения интерферона гамма, измеренного на 7-й неделе, по сравнению с мышами, не получившими стимулирующую иммунизацию, или с мышами, получившими стимулирующую инъекцию вектора MVA, кодирующего антиген, не родственной CalHV3.

ФИГ. 8: Совокупные ответы Т-лимфоцитов у мышей через две недели после иммунизации слитым белком инвариантная цепь-CalHV3-LLy (ChAd155-Ii-CalHV3-LLy). При более низкой дозе антигена (5×10^6 вч) ChAd155-Ii-CalHV3-LLy вызывала значимо большее высвобождение ИФН γ и более высокую долю (100%) отвечающих мышей, чем ChAd155-CalHV3-LLy. При более высокой исследуемой дозе антигена (5×10^7 вч) различий не наблюдали.

ФИГ. 9: Совокупные ответы Т-лимфоцитов у игрунок, инфицированных CalHV3. Перед иммунизацией (нед. 0) у животных проявлялись базовые CalHV3-специфичные ответы Т-лимфоцитов, что согласуется с тем фактом, что животные являются носителями вируса. Через три недели после иммунизации ChAd155-CalHV3-LLy (нед. 3 п/п) у животных, иммунизированных CalHV3, проявлялась значимая экспансия ранее существующих CalHV3-специфичных ответов Т-лимфоцитов. Ответы Т-лимфоцитов продолжали усиливаться по сравнению с исходным уровнем через 1 неделю после

стимулирования (нед. 1 п/с) MVA-CalHV3-LLy, и после его прекращения по-прежнему превышали исходный уровень через 7 недель после стимуляции.

ФИГ. 10: Было определено, что усиленный совокупный ответ Т-лимфоцитов на конструкцию ChAd155-CalHV3-LLy, показанную на ФИГ. 9, является полиспецифическим, т. е. направлен против антигенов С1, С7, ORF39 и ORF 43 CalHV3-LLy.

ФИГ. 11: Пулы пептидов EBV, соответствующих антигенам, кодируемым вакцинами на основе ChAd155 и MVA, содержащими латентные и литические гены EBV, вызывают высвобождение ИФН γ в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от здоровых доноров.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 белок EBV LMP1 (Genbank №P03230)

SEQ ID NO: 2 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP1

SEQ ID NO: 3 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP1

SEQ ID NO: 4 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP1

SEQ ID NO: 5 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP1

SEQ ID NO: 6 белок EBV LMP2 (Genbank №P13285)

SEQ ID NO: 7 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP2

SEQ ID NO: 8 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP2

SEQ ID NO: 9 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP2

SEQ ID NO: 10 иммуногенный фрагмент белка EBV LMP2

SEQ ID NO: 11 белок EBV EBNA1 (Genbank №P03211)

SEQ ID NO: 12 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA1

SEQ ID NO: 13 белок EBV EBNA3A (Genbank №YP401669)

SEQ ID NO: 14 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 15 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 16 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 17 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 18 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 19 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 20 иммуногенный фрагмент белка EBV EBNA3A

SEQ ID NO: 21 белок EBV ZEBRA (Genbank №P03206)

SEQ ID NO: 22 иммуногенный фрагмент белка EBV ZEBRA

- SEQ ID NO: 23 иммуногенный фрагмент белка EBV ZEBRA
- SEQ ID NO: 24 антигенный полипептид EBV-L
- SEQ ID NO: 25 ДНК, кодирующая антигенный полипептид EBV-L
- SEQ ID NO: 26 антигенный полипептид EBV-LLy
- SEQ ID NO: 27 ДНК, кодирующая антигенный полипептид EBV-LLy
- SEQ ID NO: 28 белок CalHV3 C1 (Genbank №NP_733852)
- SEQ ID NO: 29 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C1
- SEQ ID NO: 30 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C1
- SEQ ID NO: 31 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C1
- SEQ ID NO: 32 белок CalHV3 C7 (Genbank №NP_733851)
- SEQ ID NO: 33 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C7
- SEQ ID NO: 34 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C7
- SEQ ID NO: 35 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 C7
- SEQ ID NO: 36 белок CalHV3 ORF39 (Genbank №NP_733892)
- SEQ ID NO: 37 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 ORF39
- SEQ ID NO: 38 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 ORF39
- SEQ ID NO: 39 иммуногенный фрагмент белка CalHV3 ORF39
- SEQ ID NO: 40 белок CalHv3 ORF43 (Genbank №NP_733896)
- SEQ ID NO: 41 иммуногенный фрагмент белка CalHv3 ORF43
- SEQ ID NO: 42 иммуногенный фрагмент белка CalHv3 ORF43
- SEQ ID NO: 43 инвариантная полипептидная цепь игрушки
- SEQ ID NO: 44 антигенный полипептид CalHv3_L
- SEQ ID NO: 45 ДНК, кодирующая антигенный полипептид CalHV3_L
- SEQ ID NO: 46 антигенный полипептид CalHV3_LLy
- SEQ ID NO: 47 ДНК, кодирующая антигенный полипептид CalHV3_LLy
- SEQ ID NO: 48 антигенный полипептид Ii_CalHV3_LLy
- SEQ ID NO: 49 ДНК, кодирующая антигенный полипептид Ii_CalHV3_LLy
- SEQ ID NO: 50 экспрессионный вектор pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E4$ _Ad5E4 orf6) TetO hCMV-EBV-L
- SEQ ID NO: 51 экспрессионный вектор pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4$ _Ad5E4 orf6) TetO hCMV-EBV-LLy
- SEQ ID NO: 52 экспрессионный вектор pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E4$ _Ad5E4 orf6) TetO hCMV-CalHV3-L

SEQ ID NO: 53 экспрессионный вектор pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6)
TetO hCMV-CalHV3-LLy

SEQ ID NO: 54 экспрессионный вектор pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6)
TetO hCMV-mIi-CalHV3-LLy

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антигенные полипептиды вируса Эпштейна — Барр

Антигенные полипептиды EBV по изобретению включают полипептиды, содержащие иммуногенные фрагменты одного или более латентных и/или литических белков EBV. Латентные белки EBV включают, например, латентные мембранные белки (LMP1 и LMP2) и ядерные антигены EBV (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B и EBNA3C). Литические белки EBV включают, например, ZEBRA (кодируемый геном *BZLF1*).

«Иммуногенный фрагмент» белка EBV при использовании в настоящем документе означает фрагмент меньшего размера, чем полноразмерный белок EBV, который способен к индукции иммунного ответа, например гуморального (например, антитело) и/или клеточно-опосредованного (например, цитотоксические Т-лимфоциты) ответа. Иммуногенные фрагменты включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот полноразмерного белка. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты состоят из примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот полноразмерного белка. Один аспект изобретения состоит в разработке антигенных полипептидов EBV, способных к индукции ответов Т-лимфоцитов против В-лимфоцитов, несущих латентную инфекцию EBV. Таким образом, в некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты белков EBV содержат один или более Т-клеточных эпитопов, способных к индукции антигенспецифического ответа Т-лимфоцитов.

Иммуногенные фрагменты могут иметь одну или более замен, делеций или вставок относительно полноразмерного белка, от которого образован этот фрагмент. Таким образом, иммуногенные фрагменты включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку полноразмерного белка.

В одном воплощении изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит антиген латентного мембранного белка 1 (LMP1). LMP1 представляет собой белок из 386 аминокислот, экспрессируемый на латентной стадии вирусного жизненного цикла EBV. Иммуногенные фрагменты LMP1, подходящие для использования в антигенных полипептидах EBV, включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты LMP1 состоят из примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты LMP1 включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенный фрагмент LMP1 содержит один или более Т-клеточных эпитопов. В предпочтительных воплощениях изобретения иммуногенные эпитопы LMP1 включают без ограничений SEQ ID NO: 2–5 и фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные SEQ ID NO: 2–5.

В одном воплощении изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит антиген латентного мембранного белка 2 (LMP2). LMP2 представляет собой белок из 497 аминокислот, экспрессируемый на латентной стадии вирусного жизненного цикла EBV. Иммуногенные фрагменты LMP2, подходящие для использования в антигенных полипептидах EBV, включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты LMP2 состоят из

примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты LMP2 включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенный фрагмент LMP2 содержит один или более Т-клеточных эпитопов. В предпочтительных воплощениях изобретения иммуногенные эпитопы LMP2 включают без ограничений SEQ ID NO: 7–10 и фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные SEQ ID NO: 7–10.

В одном воплощении изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит антиген ядерного антигена 1 вируса Эпштейна — Барр (EBNA1). EBNA1 представляет собой белок из 641 аминокислот, экспрессируемый на латентной стадии вирусного жизненного цикла EBV. Иммуногенные фрагменты EBNA1, подходящие для использования в антигенных полипептидах EBV, включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты EBNA1 состоят из примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты EBNA1 включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку SEQ ID NO: 11.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенный фрагмент EBNA1 содержит один или более Т-клеточных эпитопов. В предпочтительных воплощениях изобретения иммуногенные эпитопы EBNA1 включают без ограничений SEQ ID NO: 12 и фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные SEQ ID NO: 12.

В одном воплощении изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит антиген ядерного антигена 3А вируса Эпштейна - Барр (EBNA3А). EBNA3А представляет собой белок из 944 аминокислот, экспрессируемый на латентной стадии вирусного жизненного цикла EBV. Иммуногенные фрагменты EBNA3А, подходящие для использования в антигенных полипептидах EBV, включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 13. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты EBNA3А состоят из примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот SEQ ID NO: 13. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты EBNA3А включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенный фрагмент EBNA3А содержит один или более Т-клеточных эпитопов. В предпочтительных воплощениях изобретения иммуногенные эпитопы EBNA3А включают без ограничений SEQ ID NO: 14-20 и фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные SEQ ID NO: 14-20.

В одном воплощении изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит антиген ZEBRA. ZEBRA представляет собой белок из 245 аминокислот, экспрессируемый на литической стадии вирусного жизненного цикла EBV. Иммуногенные фрагменты ZEBRA, подходящие для использования в антигенных полипептидах EBV, включают фрагменты из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты ZEBRA состоят из примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно

14, примерно 15, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 и примерно 100 аминокислот SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные фрагменты ZEBRA включают фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные соответствующему участку SEQ ID NO: 21.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенный фрагмент ZEBRA содержит один или более Т-клеточных эпитопов. В предпочтительных воплощениях изобретения иммуногенные эпитопы ZEBRA включают без ограничений SEQ ID NO: 22–23 и фрагменты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные SEQ ID NO: 22–23.

В некоторых воплощениях изобретения антигенный полипептид EBV представляет собой поливалентный антигенный полипептид EBV. Под «поливалентным» подразумевают полипептид, содержащий иммуногенные фрагменты двух, трех, четырех, пяти или более белков EBV. Под «фрагментом» подразумевают фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот полноразмерного белка.

Таким образом, в одном воплощении изобретения предложен полипептид, содержащий:

(а) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 1,

(б) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6,

(в) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по

меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 11, и

(г) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 13.

Возможно, полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 21.

В некоторых воплощениях изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов одного или более белков EBV. Таким образом, в одном воплощении изобретения предложен поливалентный антиген EBV, содержащий:

(а) по меньшей мере два фрагмента из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 1,

(б) по меньшей мере два фрагмента из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6,

(в) по меньшей мере два фрагмента из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по

меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6,

(в) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 11,

(г) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 13, или

(д) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 21.

В некоторых воплощениях изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два иммуногенных фрагмента, образованных из одного и того же белка EBV, где эти по меньшей мере два иммуногенных фрагмента в поливалентном антигенном полипептиде EBV не примыкают друг к другу. Понятие «не примыкают» подразумевает, что по меньшей мере два иммуногенных фрагмента в антигенном полипептиде EBV не образуют непрерывную аминокислотную последовательность. Не примыкающие друг к другу иммуногенные фрагменты отделены друг от друга по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, десятью или более аминокислотами не из того же белка EBV, из которого образованы иммуногенные фрагменты.

Например, в одном воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по

меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов LMP1 (SEQ ID NO: 1), где фрагменты LMP1 не примыкают друг к другу.

В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов LMP2 (SEQ ID NO: 6), где фрагменты LMP2 не примыкают друг к другу.

В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов EBNA1 (SEQ ID NO: 11), где фрагменты EBNA1 не примыкают друг к другу.

В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов EBNA3A (SEQ ID NO: 13), где фрагменты EBNA3A не примыкают друг к другу.

В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять фрагментов ZEBRA (SEQ ID NO: 21), где фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу.

В одном воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит:

(а) первый и второй фрагменты LMP1, где указанные первый и второй фрагменты LMP1 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2–5, и где указанные первый и второй фрагменты LMP1 в полипептиде не примыкают друг к другу,

(б) первый и второй фрагменты LMP2, где указанные первый и второй фрагменты LMP2 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7–10, и где указанные первый и второй фрагменты LMP2 в полипептиде не примыкают друг к другу,

(в) фрагмент EBNA1, состоящий из SEQ ID NO: 12, и

(г) первый и второй фрагменты EBNA3A, где указанные первый и второй фрагменты EBNA3A выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14–20, и где

указанные первый и второй фрагменты EBNA3A в полипептиде не примыкают друг к другу.

Возможно поливалентный антиген EBV дополнительно содержит:

(а) первый фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 22, и

(б) второй фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 23;

где первый и второй фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу.

В одном воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV содержит:

(а) первый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 2,

(б) второй фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 3,

(в) третий фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 4,

(г) четвертый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 5,

(д) первый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 7,

(е) второй фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 8,

(ж) третий фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 9,

(з) четвертый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 10,

(и) первый фрагмент EBNA1, состоящий из SEQ ID NO: 12,

(к) первый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 14,

(л) второй фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 15,

(м) третий фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 16,

(н) четвертый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 17,

(о) пятый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 18,

(п) шестой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 19, и

(р) седьмой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 20;

где первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP1 не примыкают друг к другу; первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP2 не примыкают друг к другу; и первый, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой фрагменты EBNA3A не примыкают друг к другу. Возможно поливалентный антиген EBV дополнительно содержит:

(а) первый фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 22, и

(б) второй фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 23;

где первый и второй фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу.

Чтобы помочь четко понять описание полипептидов и полинуклеотидов в настоящем документе, конкретные компоненты последовательности обозначены как

«первая» полипептидная или полинуклеотидная последовательность, «вторая» полипептидная или полинуклеотидная последовательность и т. д. Следует понимать, что первая, вторая и т. д. последовательности могут находиться в любом желаемом порядке или ориентации, и что слова «первый», «второй» и т. д. не подразумевают определенный порядок или ориентацию.

В некоторых воплощениях изобретения поливалентный антиген EBV не содержит соединительные неэпитопы, которые картируются в белках человека (т. е. собственных). Иммуногенный соединительный неэпитоп представляет собой эпитоп, который вызывает иммунный ответ на соединение двух последовательностей гетерологичных белков и не присутствует ни в одной из самих последовательностей гетерологичных белков. Ответы Т-лимфоцитов на соединительные неэпитопы можно идентифицировать с использованием известных в данной области техники методов, например иммунологических анализов с использованием пула пептидов, охватывающего все используемые соединения, как описано в примере 4.

В одном воплощении изобретения поливалентный антиген EBV представляет собой конструкцию EBV-L, проиллюстрированную на Фиг. 2А. В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV представляет собой полипептид, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 24.

В другом воплощении изобретения поливалентный антиген EBV представляет собой конструкцию EBV-LLy, проиллюстрированную на Фиг. 2В. В другом воплощении изобретения поливалентный антигенный полипептид EBV представляет собой полипептид, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 26.

В предпочтительных воплощениях изобретения антигенный полипептид EBV по изобретению содержит по меньшей мере одну вставку, делецию и/или замену аминокислоты по сравнению с белком EBV дикого типа.

В другом воплощении изобретения антигенный полипептид EBV представляет собой полипептид, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе.

Полинуклеотиды

Также предложены полинуклеотиды и экспрессионные кассеты, кодирующие антигенные полипептиды EBV, описанные в настоящем документе. Под «экспрессионной кассетой» подразумевают комбинацию отдельного гетерологичного гена («трансгена», кодирующего антигенный полипептид EBV) и других регуляторных элементов,

необходимых для управления трансляцией, транскрипцией и/или экспрессией продукта этого гена в клетке-хозяине.

В изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид EBV по изобретению.

В одном воплощении изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 24. В одном воплощении изобретения полинуклеотид по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 26. В одном воплощении изобретения полинуклеотид по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 27.

Подходящими для изобретения являются рекомбинантные полинуклеотиды. Рекомбинантный полинуклеотид означает, что он является продуктом по меньшей мере одной из стадий клонирования, рестрикции, рекомбинации или лигирования или других процедур, в результате которых получают полинуклеотид, отличающийся от обнаруживаемого в природе полинуклеотида. Рекомбинантный вирус представляет собой вирус, содержащий рекомбинантный полинуклеотид. Рекомбинантный вектор представляет собой вектор, содержащий рекомбинантный полинуклеотид. Рекомбинантный вирус включает потомство исходного рекомбинантного вируса. «Рекомбинантный вектор» включает продукты репликации исходного рекомбинантного вектора. «Рекомбинантный полинуклеотид» включает продукты репликации исходного рекомбинантного полинуклеотида. Рекомбинантные полинуклеотиды по изобретению содержат по меньшей мере одну замену нуклеиновой кислоты по сравнению с геномом EBV дикого типа.

В некоторых воплощениях изобретения кодирующие антиген EBV полинуклеотиды по изобретению функционально связаны с одним или более контрольных элементов таким образом, чтобы допустить его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной или инфицированной полинуклеотидом. Используемые в настоящем документе «функционально связанные» последовательности

включают и контрольные последовательности экспрессии, расположенные непрерывно с интересующим геном, и контрольные последовательности экспрессии, осуществляющие контроль интересующего гена в транс-положении или на расстоянии. Таким образом, в одном воплощении изобретения полинуклеотид функционально связан с одной или более последовательностями, управляющими экспрессией указанного полипептида в клетке-хозяине. В некоторых воплощениях изобретения контрольная последовательность экспрессии гетерологична по отношению к кодирующему антиген EBV полинуклеотиду.

Контрольные последовательности экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации, промоторные и энхансерные последовательности транскрипции; сигналы эффективного процессинга РНК, такого как сплайсинг, и сигналы полиаденилирования (поли А), включающие поли А бета-глобина кролика; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (например, консенсус-последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, если желательно, последовательности, повышающие секрецию кодируемого продукта. Среди прочих последовательностей можно использовать химерные интроны.

«Промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая допускает связывание РНК-полимеразы и управляет транскрипцией гена. Как правило, промотор локализован в 5'-некодирующей области гена проксимально к сайту старта транскрипции гена. Элементы последовательности внутри промоторов, функционирующие в инициации транскрипции, часто характеризуются нуклеотидными консенсус-последовательностями. Примеры промоторов включают без ограничений промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и млекопитающих (включая человека). В данной области техники известно большое количество контрольных последовательностей экспрессии, которые могут быть использованы, включая промоторы, являющиеся внутренними, гетерологичными, нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифическими.

В одном воплощении изобретения полинуклеотид функционально связан с гетерологичной контрольной последовательностью экспрессии, такой как промотор. Как правило, «гетерологичный» означает «полученный из объекта, генотипически отличающегося от остальной части объекта, с которым его сравнивают». Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая не выделена и не получена из встречающейся в природе

последовательности нуклеиновой кислоты аденовирусного вектора или не основана на ней.

Примеры конститутивных промоторов включают без ограничений промотор TBG, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (возможно с энхансером), промотор цитомегаловируса (CMV) (возможно с энхансером CMV, см., например, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)), промотор CASI (WO2012/115980), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1a (Invitrogen).

Индукцибельные промоторы позволяют регулировать экспрессию гена и могут регулироваться экзогенно добавляемыми соединениями, факторами окружающей среды, такими как температура, или наличием определенного физиологического состояния, например острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индукцибельные промоторы и индукцибельные системы доступны из различных коммерческих источников, включающих без ограничений компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Описано множество других систем, которые могут быть легко подобраны специалистами в данной области техники. Например, индукцибельные промоторы включают цинк-индукцибельный промотор металлотионеина (MT) овцы и дексаметазон (Dex)-индукцибельный промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV). Другие индукцибельные системы включают промоторную систему полимеразы T7; промотор экдизона насекомых, тетрациклин-репрессуемую систему и тетрациклин-индукцибельную систему. Другие системы включают димер FK506, VP16 или р65 с использованием кастрадиола, дифенолмурислерона (diphenol murislerone), RU486-индукцибельную систему и рапамицин-индукцибельную систему. Эффективность некоторых индукцибельных промоторов возрастает со временем. В таких случаях эффективность таких систем можно повысить путем вставки множественных репрессоров в тандеме, например, TetR, сшитого с TetR посредством участка внутренней посадки рибосомы (IRES; internal ribosome entry site).

В другом воплощении изобретения можно использовать нативный промотор EBV. Нативный промотор может быть предпочтителен, если желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, если регуляция экспрессии трансгена должна быть временной, либо осуществляться в процессе развития, либо иметь тканеспецифический характер, либо осуществляться в ответ на определенные транскрипционные стимулы. В дополнительном воплощении изобретения для имитации нативной экспрессии можно также использовать другие

нативные контрольные элементы экспрессии, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсус-последовательности Козака.

Трансген может быть функционально связан с тканеспецифическим промотором. Например, если экспрессия желательна в скелетных мышцах, следует использовать промотор, активный в мышцах. Эти промоторы включают промоторы генов, кодирующих скелетный β -актин, легкую цепь 2А миозина, дистрофин, мышечную креатинкиназу, а также синтетические мышечные промоторы с более высокими активностями по сравнению с природными промоторами. Примеры промоторов, которые являются тканеспецифическими, известны для печени; корового белка вируса гепатита В; альфа-фетопропротеина, костного остеокальцина; костного сиалопротеина, лимфоцитов, тяжелой цепи иммуноглобулина; цепи Т-клеточного рецептора, нейронов, такие как среди прочего промотор нейрон-специфической енолазы (NSE), гена легкой цепи нейрофиламента и нейрон-специфического гена *vgf*.

Векторы

Предложены также векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антигенные конструкции EBV. Такие векторы будут подходить для их доставки и экспрессии в клетке-хозяине. Векторы могут иметь форму реплицирующегося или дефектного по репликации вектора, такого как вирусный вектор. Многочисленные вирусные векторы, подходящие для введения субъекту иммуногенных нуклеиновых кислот, известны в данной области техники и включают как ДНК-, так и РНК-вирусы. Примеры векторов, подходящих для кодирования описанных в настоящем документе антигенов EBV, включают: аденовирусные векторы (реплицирующиеся или дефектные по репликации), векторы на основе поксвируса, включая векторы на основе вируса осповакцины, такого как модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), NYVAC, векторы на основе авипоксвируса, канарипоксвируса (ALVAC) и вируса оспы птиц (FPV), векторы на основе альфавируса (такого как вирус Синдбис, вирус леса Семлики (SFV), вирус Росс-ривер и вирус венесуэльского конского энцефалита (VEE)) и его химер и репликонов, векторы на основе герпесвируса (например, векторы на основе цитомегаловируса (CMV)), векторы на основе аренавируса, такие как векторы на основе вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), векторы на основе вируса кори, векторы на основе вируса везикулярного стоматита, векторы на основе вируса псевдобешенства, аденоассоциированного вируса, ретровируса, лентивируса, вирусоподобные частицы и многие другие.

В одном воплощении изобретения вектор представляет собой аденовирус. Получение и применение аденовирусных векторов хорошо известно обычным специалистам в данной области техники. В контексте раскрытых в настоящем документе иммуногенных комбинаций примеры раскрытия конструирования, получения и применения аденовирусных векторов, экспрессирующих вакцинные антигены, можно найти, например, в опубликованной заявке на патент США № 2014/0141042 (WO 2012/089833); патенте США № 8,216,834 (WO 2005/071093); опубликованной заявке на патент США № US 2012/0027788 (WO 2010/086189); и опубликованной заявке на патент США № US 2005/0214323.

Как правило, аденовирусный вектор сконструирован таким образом, что экспрессионная кассета локализована в молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей другие аденовирусные последовательности, в участке, нативном для выбранного аденовирусного гена. Экспрессионная кассета может быть вставлена в участок существующего гена и при желании может нарушать функцию этого участка. Альтернативно экспрессионная кассета может быть вставлена в сайт частично или полностью делетированного аденовирусного гена. Например, экспрессионная кассета может быть локализована в сайте мутации, инсерции или делеции, приводящей к отсутствию функциональности по меньшей мере одного гена участка генома, выбранного из группы, состоящей из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4. Термин «приводит к отсутствию функциональности» означает, что существенное количество участка гена удалено или прервано иным путем так, что этот участок гена становится неспособным к продукции функциональных продуктов экспрессии гена. При желании может быть удален весь участок гена (и соответствующим образом заменен экспрессионной кассетой). Соответственно, гены E1 аденовируса делетированы и заменены экспрессионной кассетой, состоящей из выбранного промотора, последовательности кДНК интересующего гена и сигнала поли А, с получением в результате дефектного по репликации рекомбинантного вируса.

Аденовирусные векторы, используемые в настоящем изобретении, могут иметь происхождение от ряда млекопитающих-хозяев. Выделено более 100 различных серотипов аденовируса, которые инфицируют различные виды млекопитающих, из которых 51 серотип имеет человеческое происхождение. Таким образом, один или более из аденовирусных векторов могут быть образованы из аденовируса человека. Примерами таких аденовирусов человеческого происхождения являются Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, в частности Ad5, Ad11 и Ad35. Серотипы

аденовирусов, относящихся и не относящихся к человеку, относят к шести под родам (A–F) на основании ряда биологических, химических, иммунобиологических и структурных критериев.

Несмотря на то, что векторы на основе Ad5 широко используют в ряде исследований по генотерапии, могут существовать ограничения по использованию Ad5 и других аденовирусов человека группы C в связи с иммунитетом, ранее существующим в популяции в связи с естественной инфекцией. Ad5 и другие представители группы C человека склонны находиться среди наиболее серопревалентных серотипов. Иммунитет к существующим векторам может развиваться в результате воздействия вектора в ходе лечения. Эти типы ранее существующего и развитого иммунитета к серопревалентным векторам могут ограничивать результативность генотерапии или попыток вакцинации. Таким образом, очень важную цель в поиске систем доставки генов, способных избежать иммунного ответа хозяина, составляют альтернативные серотипы аденовирусов.

Одну из таких областей поиска альтернативных серотипов составляют серотипы происхождения от приматов, отличных от человека, в частности аденовирусы, выделенные у шимпанзе, бонобо и горилл. См. патент США № 6,083,716, в котором описан геном двух аденовирусов шимпанзе.

Показано, что векторы на основе аденовирусов нечеловекообразных обезьян индуцируют выраженные иммунные ответы на трансгенные продукты так же эффективно, как и векторы на основе аденовирусов человека (Fitzgerald et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1416; Colloca et al. (2012) *Science Translational Medicine* 4:1-9; Roy et al. (2004) *Virology* 324: 361–372; Roy et al. (2010) *J. of Gene Medicine* 13:17–25).

Аденовирусы нечеловекообразных обезьян могут быть выделены из мезентериальных лимфатических узлов или фекалий животных и реплицироваться *in vitro* в клетках HEK 293. Несмотря на эти сходства, аденовирусы нечеловекообразных обезьян филогенетически и иммунологически отличаются от более распространенных серотипов человека (Ad2 и Ad5).

Так, в одном воплощении изобретения один или более из аденовирусных векторов может быть образован из аденовируса приматов, отличных от человека, например аденовируса шимпанзе, такого как выбранный из серотипов ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также называемый C7) и Pan 9. В частности, вирус может представлять собой аденовируса приматов, отличных от человека, такой как аденовирус обезьян и, в частности, аденовирус шимпанзе, такой как ChAd155, Pan5, 6, 7 или 9. Примеры таких штаммов описаны в US 20040241181 (WO03/000283) и доступны в

Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, г. Манассас, Va. 20110-2209, и других источниках. Желаемые штаммы аденовируса шимпанзе включают Pan 5 [ATCC VR-591], Pan 6 [ATCC VR-592] и Pan 7 [ATCC VR-593]. Альтернативно аденовирусные векторы могут быть образованы из аденовирусов нечеловекообразных обезьян, имеющих происхождение от обезьян бонобо, например PanAd1, PanAd2 или PanAd3. Примеры таких векторов, описанных в настоящем документе, можно найти в примерах в US 20110217332 (WO2005/071093), US 2012/0027788 (WO2010/086189) и WO2016/198621.

Считают, что применение аденовирусов нечеловекообразных обезьян обладает преимуществом перед применением серотипов аденовирусов человека в связи с низким и нечастым ранее существующим иммунитетом, в частности отсутствием перекрестно нейтрализующих антител к аденовирусам в целевой популяции. Перекрестная реакция аденовирусов шимпанзе с ранее существующими ответами нейтрализующих антител присутствует только в 2% целевой популяции по сравнению с 35% в случае некоторых векторов-кандидатов на основе аденовирусов человека. Pan 6 обладает меньшим родством с Pan 5, 7 и 9.

Аденовирус по изобретению может быть дефектным по репликации. Это означает, что он обладает пониженной способностью к репликации в некомплементирующих клетках по сравнению с вирусом дикого типа. Это может быть вызвано мутированием вируса, например делетированием гена, вовлеченного в репликацию, например делецией гена E1a, E1b, E3 или E4.

Аденовирусные векторы в соответствии с настоящим изобретением могут быть образованы от дефектного по репликации аденовируса, содержащего делецию функционального гена E1. Таким образом, аденовирусные векторы по изобретению могут быть дефектными по репликации в связи с отсутствием способности к экспрессии аденовирусных генов E1a и E1b, т. е. с функционально делетированными генами E1a и E1b. Рекомбинантные аденовирусы могут также нести функциональные делеции в других генах [см., например, US 20040241181 (WO 03/000283)], например делеции в генах E3 или E4. Задержанно-ранний ген E3 аденовируса может быть элиминирован из последовательности аденовируса, составляющей часть рекомбинантного вируса. Функция E3 не является необходимой для продукции частиц рекомбинантного аденовируса. Таким образом, для упаковки рекомбинантного аденовируса, полезного в изобретении, замена функции продукта этого гена необязательна. В одном конкретном воплощении изобретения рекомбинантные аденовирусы имеют функционально делетированные гены

E1 и E3. Конструирование таких векторов описано в работе Roy et al., (2004) *Human Gene Therapy* 15:519–530.

Можно также конструировать рекомбинантные аденовирусы, имеющие функциональную делецию гена E4, хотя может быть желательным сохранение функции E4 ORF6. Аденовирусные векторы в соответствии с изобретением могут также содержать делецию в задержанно-раннем гене E2a. Делеции могут быть также получены в любом из поздних генов L1–L5 аденовирусного генома. Подобным образом могут быть полезны делеции в промежуточных генах IX и IVa.

Другие делеции могут быть получены в других структурных или неструктурных аденовирусных генах. Описанные выше делеции можно использовать по отдельности, т. е. последовательность аденовируса для использования в настоящем изобретении может содержать только делеции E1. Альтернативно делеции полноразмерных генов или их участков, эффективные для нарушения их биологической активности, можно использовать в любой комбинации. Например, в одном иллюстративном векторе аденовирусные последовательности могут иметь делеции генов E1 и генов E4, или генов E1, E2a и E3, или генов E1 и E3 (такие как функциональные делеции в генах E1a и E1b и делеция по меньшей мере части E3), или генов E1, E2a и E4 с делецией или без делеции E3 и т. д. Такие делеции могут представлять собой частичные или полные делеции этих генов, и для достижения желаемого результата они могут быть использованы в комбинации с другими мутациями, такими как температурочувствительные мутации. Аденовирусные векторы для использования в настоящем изобретении включают PanAd3 (WO 2010/086189) и ChAd155 (WO 2016/198621).

В другом воплощении изобретения вирусный вектор представляет собой поксвирусный вектор. В конкретном воплощении изобретения поксвирусный вектор представляет собой вектор на основе вируса осповакцины, такой как вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). У человека и других млекопитающих вектор (MVA) является дефектным по репликации. Первоначально он был разработан для улучшения безопасности противооспенной вакцинации путем пассажа вируса осповакцины 570 раз в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), в результате которого были получены множественные, полностью охарактеризованные делеции, после которых вирус стал высоко аттенуированным и дефектным по репликации у человека и других млекопитающих. Дефект по репликации наступает на поздней стадии сборки вириона таким образом, что экспрессия вирусных и рекомбинантных генов не нарушена,

что делает MVA эффективным экспрессионным вектором одного раунда, неспособным вызывать инфекцию у млекопитающих.

Впоследствии MVA широко использовался в качестве вирусного вектора для индукции антигенспецифичного иммунитета против трансгенов, как в биологических моделях, так и у человека. Описание MVA можно найти в работах Mayr A, et al. The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. *Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Zentralbl Bakteriolog B.* 1978 Dec; 167(5-6):375–90 и Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). *Infection* 3, 6–14.

В одном воплощении изобретения MVA образован из посевной серии вируса 460 MG, полученной после 571го пассажа вируса осповакцины в клетках CEF. В следующем воплощении изобретения MVA был получен или произведен до 31 декабря 1978 г. и свободен от контаминации прионами.

Векторы MVA и способы получения таких векторов описаны, например, в патенте США № 6,761,893 (WO02/042480); в патенте США № 7,964,395; в патенте США № 7,964,396; опубликованной заявке на патент США № US 2013/0183335 (WO2012/048817); и опубликованной заявке на патент США № 2015/0209421 (WO2014/019718). Каждый из вышеуказанных документов включен в настоящий документ посредством ссылки для получения информации о подходящих векторах MVA и способах.

В другом воплощении изобретения вирусный вектор представляет собой альфавирусный вектор, такой как альфавирусный репликон или другой автономно реплицирующийся РНК-вектор. Примеры альфавирусных векторов и способов их получения и доставки, подходящие для применения в контексте раскрытых в настоящем документе иммуногенных комбинаций, описаны, например, в документах US20090104226 (WO2006078294); US20110300205 (WO2011005799); US20130195968 (WO 2012/006376); US20130177639 (WO2012006377); WO2013006838; и WO2013006842, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки для описания подходящих примеров автономно реплицирующихся РНК-векторов в контексте раскрытых иммуногенных комбинаций.

Предложен также способ получения рекомбинантной вирусной частицы, экспрессирующей антиген EBV по изобретению, включающий экспрессию описанного в настоящем документе вектора в клетке-хозяине. Вирусные частицы могут быть получены в любой подходящей линии клеток, в которой вирусный вектор способен к репликации.

Аденовирусные векторы могут быть получены в любой подходящей линии клеток, в которой вирус способен к репликации. В частности, можно использовать комплементарные линии клеток, обеспечивающие факторы, отсутствующие в вирусном векторе (такие как E1 и/или E4), в результате чего нарушены его характеристики репликации. Без ограничений такая линия клеток может представлять собой среди прочего клетки HeLa [ATCC, номер доступа CCL 2], A549 [ATCC, номер доступа CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Детройт [например, Детройт 510, CCL 72] и WI-38 [CCL 75]. Все эти линии клеток доступны из Американской коллекции клеточных культур, 10801 University Boulevard, г. Манассас, Va. 20110–2209. Другие подходящие родительские линии клеток могут быть получены из других источников, например клеток PER.C6, которые представляют собой клетки, депонированные в Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC) под номером ECACC 96022940 в Центре прикладной микробиологии и научных исследований (Centre for Applied Microbiology and Research, CAMR, Великобритания), или клетки Hep 96 (Crucell).

Особенно подходящей комплементарной линией клеток является линия клеток Procell92. Линия клеток Procell92 получена на основе клеток HEK 293, экспрессирующих аденовирусные гены E1, трансфицированных геном-репрессором Tet под контролем промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK) человека и геном устойчивости к G418 (Vitelli *et al.* PLOS One (2013) 8(e55435):1–9). Линия клеток Procell92.S адаптирована к условиям роста в суспензии и также полезна для получения аденовирусных векторов, экспрессирующих токсические белки (www.okairos.com/e/inners.php?m=00084, последний просмотр 13 апреля 2015 г.).

Векторы на основе вируса осповакцины могут быть получены в соответствии с описанными в данной области техники способами. Например, получение и применение векторов MVA описаны в работах Ourmanov *et al.*, J. Virol. (2009) 83:5388–5400; и Martinon *et al.* Vaccine (2008) 26:532–545.

Композиции

Описанные в настоящем документе антигенные полипептиды EBV, полинуклеотиды и векторы можно вводить в иммуногенных композициях. Иммуногенная композиция, как описано в настоящем документе, представляет собой композицию, содержащую один или более рекомбинантных полипептидов, полинуклеотидов и/или векторов, способных к индукции иммунного ответа, например гуморального (например, антительного) и/или клеточно-опосредованного (например, цитотоксическими Т-лимфоцитами) ответа после доставки млекопитающему, особенно человеку.

Иммуногенные композиции, раскрытые в настоящем документе, как правило, содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Фармацевтически приемлемые носители и/или эксципиенты хорошо известны и могут быть выбраны специалистом в данной области техники. Прилагательное «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что определяемое вещество пригодно для введения субъекту (например, субъекту человеку или млекопитающему). В руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, составленном E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975), описаны композиции и препараты (включая разбавители), подходящие для фармацевтической доставки терапевтических и/или профилактических композиций, включая иммуногенные композиции.

Например, носитель или эксципиент могут эффективно включать в себя буферный раствор. Возможно носитель или эксципиент также содержат по меньшей мере один компонент, который стабилизирует растворимость или придает стабильность. Примеры солюбилизующих/стабилизирующих агентов включают детергенты, например лаурилсаркозин и/или Твин. Альтернативные солюбилизующие/стабилизирующие агенты включают аргинин и стеклообразующие полиолы (такие как сахароза, трегалоза и т. п.). Многочисленные фармацевтически приемлемые носители и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты известны в данной области техники и описаны, например, в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, составленном E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 5th Edition (1975).

Соответственно, подходящие эксципиенты и носители могут быть выбраны специалистом в данной области техники для получения препарата, подходящего для доставки субъекту выбранным путем введения.

Подходящие эксципиенты включают без ограничений: глицерин, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбитол, трегалозу, N-лауроилсаркозина натриевую соль, L-пролин, недетергентный сульфобетаин, гуанидина гидрохлорид, мочевины, триметиламина оксид, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ и другие соли двухвалентных катионов, дитиотрейтол, дитиоэритрит и 13-меркаптоэтанол. Другие эксципиенты могут представлять собой детергенты (включающие: Твин 80, Твин 20, Тритон X-00, NP-40, Empigen BB, октилглюкозид, лауроилмальтозид, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмония бромид).

Возможно иммуногенную композицию по изобретению можно включать в препарат, содержащий другие компоненты, включающие, например, адъюванты,

стабилизаторы, регуляторы рН, консерванты и т. п. Примеры подходящих адъювантов приведены ниже в разделе «Адъюванты».

Способы использования

Описанные в настоящем документе антигенные полипептиды EBV, полинуклеотиды и векторы можно применять в профилактике и/или лечении инфекции EBV и обусловленных EBV заболеваний, например, в виде вакцины для индукции иммунного ответа. При использовании в настоящем документе индукция иммунного ответа относится к способности белка к индукции Т-клеточного ответа и/или гуморального ответа на этот белок.

При использовании в настоящем документе индукция иммунного ответа относится к способности белка, также известного как «антиген» или «иммуноген», к индукции Т-клеточного ответа и/или гуморального ответа на этот белок. Например, иммуногенная композиция после иммунизации этой композицией может индуцировать популяцию Т-лимфоцитов памяти и/или В-лимфоцитов относительно субъекта, не получавшего композицию, в частности, в тех воплощениях, где композиция содержит нуклеиновую кислоту, включающую кодирующую последовательность антигенного полипептида EBV. В некоторых воплощениях изобретения субъект представляет собой позвоночное животное, такое как млекопитающее, например человек или млекопитающее, подлежащее ветеринарному обслуживанию.

Иммунные ответы можно определять количественно известными в данной области техники способами, включая анализы индукции пролиферации или эффекторной функции конкретного интересующего типа лимфоцитов, например В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-клеточных линий и Т-клеточных клонов.

Таким образом, в одном воплощении изобретения предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полинуклеотида, полипептида, вектора или иммуногенной композиции по изобретению. В одном воплощении изобретения субъект является серонегативным к вирусу Эпштейна - Барр. Субъект является «серонегативным», если на основании серологических данных у него отсутствует инфекция EBV в прошлом или в настоящее время. В другом воплощении изобретения субъект является серопозитивным к вирусу Эпштейна - Барр. Субъект является «серопозитивным», если на основании серологических данных у него присутствует инфекция EBV в прошлом или в настоящее время.

Также предложен способ лечения или профилактики обусловленного EBV заболевания у субъекта, включающий введение субъекту полинуклеотида, полипептида,

вектора или иммуногенной композиции по изобретению. В одном воплощении изобретения обусловленное EBV заболевание представляет собой обусловленное EBV злокачественное новообразование или обусловленное EBV аутоиммунное заболевание. Обусловленные EBV заболевания включают, например, рассеянный склероз, ревматоидный артрит и системную красную волчанку.

Предложены также режимы дозирования, предназначенные для максимального повышения иммуногенности полинуклеотидов, полипептидов, векторов и иммуногенных композиций по изобретению. Таким образом, в одном воплощении изобретения предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту двух или более доз полинуклеотида, полипептида, вектора и/или иммуногенной композиции по изобретению. В некоторых воплощениях изобретения интервал между дозами составляет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более недель. В другом воплощении изобретения интервал между дозами составляет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более месяцев. Альтернативно интервал между дозами может составлять один, два, три, четыре года, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более лет.

В одном воплощении изобретения предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий:

(а) введение аденовирусного вектора, содержащего полинуклеотид по изобретению; и

(б) введение вектора на основе вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид по изобретению;

где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке. В одном воплощении изобретения аденовирусный вектор представляет собой ChAd155. В другом воплощении изобретения вектор на основе вируса осповакцины представляет собой MVA. В одном воплощении изобретения стадию (б) выполняют через одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более недель после стадии (а). В другом воплощении изобретения стадию (б) выполняют через один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более месяцев после стадии (а).

В одном воплощении изобретения предложен способ лечения или профилактики обусловленного EBV заболевания у субъекта включающий:

(а) введение аденовирусного вектора, содержащего полинуклеотид по изобретению; и

(б) введение вектора на основе вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид по изобретению;

где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке. В одном воплощении изобретения аденовирусный вектор представляет собой ChAd155. В другом воплощении изобретения вектор на основе вируса осповакцины представляет собой MVA. В одном воплощении изобретения стадию (б) выполняют через одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более недель после стадии (а). В одном воплощении изобретения стадию (б) выполняют через один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более месяцев после стадии (а).

Также предложено применение полинуклеотида, вектора, полипептида или иммуногенной композиции по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного инфицированием вирусом Эпштейна - Барр.

Адьюванты

«Адьювант», как используют в настоящем документе, относится к композиции, усиливающей иммунный ответ на иммуноген. Композицию в соответствии с изобретением, содержащую адьювант, можно применять в качестве вакцины, например для субъекта-человека. Адьювант ускоряет, продлевает и/или повышает качество и/или силу иммунного ответа на антиген/иммуноген по сравнению с введением одного антигена, таким образом, необходимое количество антигена/иммуногена в любой конкретной вакцине и/или частоту инъекций, необходимую для выработки достаточного иммунного ответа на интересующий антиген/иммуноген, можно уменьшить.

Примеры адьювантов, которые можно использовать в контексте композиций по изобретению включают неорганические адьюванты (например, неорганические соли металлов, такие как фосфат алюминия или гидроксид алюминия), гелеобразные осадки гидроксида алюминия (квасцы); $AlPO_4$; алгидрогель; бактериальные продукты из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, в частности монофосфориллипид А (МФЛ-А), липополисахариды (ЛПС), мурамил-дипептиды и их производные; неполный адьювант Фрейнда; липосомы, в частности нейтральные липосомы, липосомы, содержащие композицию и возможно цитокины; AS01B, AS01E, AS02; неионные блок-сополимеры; адьювант ISCOMATRIX; метилированную ДНК, содержащую

олигонуклеотиды CpG (CpG-мотив), в частности CpG ODN с фосфоротиоатным (PTO) каркасом (CpG PTO ODN) или фосфодиэфирным (PO) каркасом (CpG PO ODN); производные синтетического липопептида, в частности Pam₃Cys; липоарабиноманнан; пептидогликан; зимозан; белки теплового шока (HSP), в частности HSP 70; двунигетевую (дн) РНК и ее синтетические производные, в частности поли I : поли C; поликатионные пептиды, в частности поли-L-аргинин; таксол; фибронектин; флагеллин; имидазохиолин; цитокины с адьювантной активностью, в частности гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкин (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-18, интерфероны I и II типа, в частности интерферон гамма, фактор некроза опухоли (ФНО) альфа; 25-дигидроксивитамин D₃ (кальцитрол); и синтетические олигопептиды, в частности пептиды, презентруемые главным комплексом гистосовместимости (ГКГ) II. В качестве адьюванта можно использовать неионные блок-сополимеры, содержащие полиоксиэтилен (ПОЭ) и полиоксипропилен (ПОП), такие как блок-сополимеры ПОЭ–ПОП–ПОЭ.

Дополнительные примеры адьювантов включают неорганические адьюванты (например, неорганические соли металлов, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия), органические адьюванты (например, сапонины, такие как QS21 или сквален), адьюванты на масляной основе (например, полный адьювант Фрейнда и неполный адьювант Фрейнда), цитокины (например, ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-18, GM-CSF и ИФН- γ), адьюванты в виде частиц (например, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), липосомы, биоразлагаемые микросферы, виросомы, бактериальные адьюванты (например, монофосфориллипид А, такой как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-МФЛ) или мурамил-пептиды), синтетические адьюванты (например, монофосфориллипид А (МФЛ), в частности 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-МФЛ)) и аналоги мурамил-пептидов или синтетический липид А, а также синтетические полинуклеотидные адьюванты, например полиаргинин или полилизин.

Подходящими адьювантами также являются сапонины, например сапонин Quil А, полученный из коры южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria Molina*, и его фракции. В качестве иммуностимуляторов также известны очищенные фракции Quil А, такие как сквален, QS21, QS17 и QS7, негемолитическая фракция Quil-А. Также подходят комбинации QS21 и полисорбата или циклодекстрина.

Другим примером адьюванта является иммуностимулирующий олигонуклеотид, содержащий неметилованные динуклеотидные мотивы цитозин–гуанозин,

присутствующие в ДНК (CpG). CpG является известным адъювантом для введения как системным, так и мукозальным путем. При включении в вакцины его можно вводить в виде свободного раствора вместе со свободным антигеном или в виде ковалентного конъюгата с антигеном, либо включать в носитель, такой как гидроксид алюминия.

Активация специфичных рецепторов может стимулировать иммунный ответ. Такие рецепторы известны специалистам в данной области техники и включают, например, рецепторы цитокинов, в частности рецепторы цитокинов I типа, рецепторы цитокинов II типа, рецепторы ФНО; и рецептор витамина D, действующий в качестве фактора транскрипции; и толл-подобные рецепторы 1 (TLR1), TLR-2, TLR 3, TLR4, TLR5, TLR-6, TLR7 и TLR9. Агонисты к таким рецепторам обладают адъювантной, т. е. иммуностимулирующей активностью. Другие подходящие адъюванты включают алкилглюкозамидфосфаты (AGP) или фармацевтически приемлемые соли AGP. Некоторые AGP являются агонистами TLR4, а некоторые агонистами TLR4. Адъювант композиции по настоящему изобретению может представлять собой один или более агонистов толл-подобного рецептора. В более предпочтительном воплощении изобретения адъювант представляет собой агонист толл-подобного рецептора 4. В более предпочтительном воплощении изобретения адъювант представляет собой агонист толл-подобного рецептора 9.

Адъюванты, такие как описано выше, можно включать в препарат вместе с носителями, такими как липосомы, эмульсии масло-в-воде и/или соли металлов (включая соли алюминия, такие как гидроксид алюминия). Например, 3D-МФЛ можно включать в препарат с гидроксидом алюминия или эмульсиями масло-в-воде; QS21 можно включать в препарат с холестеринсодержащими липосомами, эмульсиями масло-в-воде или квасцами; CpG можно включать в препарат с квасцами или с другими катионными носителями.

В настоящем изобретении можно использовать комбинации адъювантов, в частности комбинацию монофосфориллипида А и производного сапонины, более конкретно комбинацию QS21 и 3D-МФЛ или композицию, в которой QS21 погашен в холестеринсодержащих липосомах (DQ). Альтернативно комбинация CpG с сапонином, таким как QS21, представляет собой адъювант, подходящий для использования в настоящем изобретении в качестве активного препарата адъюванта, включающего QS21, 3D-МФЛ и токоферол в эмульсии масло-в-воде. Сапониновые адъюванты можно включать в липосому и объединять с иммуностимулирующим олигонуклеотидом. Таким образом, подходящие системы адъювантов включают, например, комбинацию монофосфориллипида А, предпочтительно 3D-МФЛ, вместе с солью алюминия.

Дополнительный пример адъюванта включает QS21 и/или МФЛ и/или CpG. QS21 может быть погашен в холестеринсодержащих липосомах.

Слияние инвариантной цепи ГКГ II класса (также известной как CD74) с антигеном посредством используемой для вакцинации экспрессионной системы повышает иммунный ответ на указанный антиген при введении с вирусным, например аденовирусным вектором. Соответственно, в одном воплощении изобретения иммуногенный трансген может экспрессироваться в рекомбинантном вирусном векторе ChAd155 совместно с инвариантной цепью.

В другом воплощении в изобретении предложено применение капсида ChAd155 (возможно использование интактной или рекомбинантной вирусной частицы или пустого капсида) для индукции иммуномодулирующего ответа, либо для усиления или в качестве адъюванта ответа Т-лимфоцитов на другой активный агент посредством доставки субъекту капсида ChAd155. Капсид ChAd155 можно доставлять отдельно или в комбинированном режиме с активным агентом для усиления иммунного ответа на него. Преимущественно желаемый эффект может быть достигнут без инфицирования хозяина аденовирусом.

Идентичность последовательности

Идентичность по отношению к последовательности определяют в настоящем документе как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотной последовательности сравнения после выравнивания последовательностей и при необходимости введения гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательности без учета каких-либо консервативных замен в рамках идентичности последовательности.

Идентичность последовательности может быть определена стандартными методами, которые обычно используют для сравнения подобия в положениях аминокислот двух полипептидов. Два полипептида выравнивают для оптимального совпадения их соответствующих аминокислот (либо вдоль всей длины одной или обеих последовательностей, либо вдоль заданного участка одной или обеих последовательностей) с помощью компьютерной программы, такой как BLAST или FASTA. Эти программы предусматривают штраф на открытие по умолчанию и штраф на открытие гэпа и матрицу баллов, такую как PAM 250 (стандартная матрица баллов, используемая в сочетании с компьютерной программой). Например, идентичность последовательности можно, таким образом, рассчитывать как общее число идентичных совпадений, умноженное на 100, а затем разделенное на сумму длины более длинной

последовательности в пределах совпадающего отрезка и количество гэпов, введенных в более короткие последовательности в целях выравнивания двух последовательностей.

Если настоящее описание относится к последовательности со ссылкой на код доступа базы данных UniProt или Genbank, сравниваемая последовательность представляет собой действующую версию на момент подачи настоящей заявки.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в белке, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот, относятся к «иммуногенному производному», в котором изменение(я) приводит к замене аминокислоты функционально подобной аминокислотой или к замене/делеции/добавлению остатков, не оказывающих существенного влияния на иммуногенную функцию.

В таблицах консервативных замен представлены известные в данной области техники функционально подобные аминокислоты. Как правило, такие консервативные замены входят в одну из указанных ниже группировок аминокислот, хотя в некоторых обстоятельствах возможны и другие замены, не оказывающие существенного влияния на иммуногенные свойства антигена. Каждая из приведенных ниже восьми групп содержит аминокислоты, которые, как правило, являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) Аланин (A), глицин (G);
- 2) Аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) Аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) Аргинин (R), лизин (K);
- 5) Изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) Фенилаланин (E), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) Серин (S), треонин (T); и
- 8) Цистеин (C), метионин (M).

Целесообразно, чтобы такие замены не встречались в области эпитопа и, следовательно, не оказывали значимого влияния на иммуногенные свойства антигена.

Имуногенные производные могут также включать такие, в которые вставлены дополнительные аминокислоты по сравнению с последовательностью сравнения. Целесообразно, чтобы такие вставки не встречались в области эпитопа и, следовательно, не оказывали значимого влияния на иммуногенные свойства антигена. Один из примеров вставок включает короткий отрезок из остатков гистидина (например, 2–6 остатков), способствующий экспрессии и/или очистке рассматриваемого антигена.

Иммуногенные производные включают такие, в аминокислоты делетированы по сравнению с последовательностью сравнения. Целесообразно, чтобы такие делеции не встречались в области эпитопа и, следовательно, не оказывали значимого влияния на иммуногенные свойства антигена.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что конкретное иммуногенное производное может содержать замены, делеции и добавления (или любую их комбинацию).

Общие сведения

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, как принято понимать специалистами в области техники, к которой относится данное изобретение. Термины в единственном числе включают в себя соответствующие термины во множественном числе, если контекст явным образом не требует иного. Аналогично, слово «или» подразумевает включение «и», если контекст явным образом не требует иного. Термин «множество» включает в себя два или более. Дополнительно различные ограничения, приведенные в связи с концентрациями или содержанием вещества, такими как концентрации компонентов раствора или их соотношения, и условий реакций, таких как температура, давление и время цикла, подразумевают как приблизительные. Используемый в настоящем документе термин «около» («примерно») подразумевают как означающий количество $\pm 10\%$.

Термин «содержит» означает «включает». Таким образом, если контекст явным образом не требует иного, слово «содержит» и его варианты, такие как «содержать» и «содержащий» подразумевают включение указанного соединения или композиции (например, нуклеиновой кислоты, полипептида, антигена) или стадии, либо группы соединений или стадий, но не исключение любых других соединений, композиций, стадий или их групп. Сокращение «напр.» (e.g., образованное от латинского *exempli gratia*) используется в настоящем документе для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, сокращение «напр.» является синонимом термина «например».

Настоящее изобретение будет дополнительно описано посредством приведенных ниже не имеющих ограничительного характера примеров и графических материалов.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование антигена

а. Антигенный дизайн EBV

Поливалентные антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна — Барр были рационально сконструированы с учетом следующих целей конструирования:

1) расширить мишени антигенов EBV, экспрессирующихся при обусловленном EBV рассеянном склерозе (EBV-РС) за счет включения в конструкцию множества антигенов латентной стадии и возможного включения антигенов литической стадии;

2) уменьшить риск онкогенеза и иммунной интерференции за счет исключения известных проблемных областей, фрагментации и шаффлинга антигенов белка EBV в поливалентной антигенной конструкции;

3) сосредоточить индуцированный иммунный ответ на EBV-специфичной активации Т-лимфоцитов путем включения Т-клеточных эпитопов в поливалентные антигенные конструкции; и

4) исключить присутствие нежелательных аутореактивных нео-эпитопов в конечной последовательности антигена.

Были разработаны две поливалентные антигенные конструкции EBV, соответствующие этим критериям. Первая поливалентная антигенная конструкция (EBV-L; Фиг. 2А) включает иммуногенные фрагменты белков EBV латентной стадии LMP1, LMP2, EBNA1 и EBNA3А. Вторая конструкция (EBV-LLy; Фиг. 2В) содержит те же антигенные фрагменты латентной стадии, что и EBV-L, и также включает фрагмент литического белка EBV ZEBRA. Было описано, что латентные белки EBV, выбранные для включения в антигенные конструкции, экспрессируются В-лимфоцитами в ткани головного мозга пациентов с рассеянным склерозом, полученной после аутопсии (Serafini et al., *J. Exp. Medicine* (2007) 204(12):2899; Serafini et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2010) 69(7):677. Цель включения литического антигена ZEBRA, являющегося ключевым регулятором перехода EBV из латентной фазы в литическую, состоит в контроле повторной активации вируса и ограничении дальнейшей амплификации и распространения EBV.

Полноразмерные белки EBV обладают потенциалом трансформации иммунных клеток. Поэтому для повышения безопасности антигенных конструкций проблемные области были исключены, и для дизайна конструкций были выбраны только оставшиеся фрагменты белков EBV. Фиг. 1 иллюстрирует расположение выбранных иммуногенных фрагментов в каждом из белков EBV. Как проиллюстрировано на Фиг. 2А–В, выбранные фрагменты подвергали шаффлингу с получением полипротеина, содержащего 16 (EBV-L) или 18 (EBV-LLy) иммуногенных фрагментов, собранных таким образом, чтобы фрагменты, образованные от одного и того же белка EBV, не примыкают друг к другу.

Наконец, для уменьшения риска нежелательных соединительных эпитопов, образованных путем соединения вместе двух иммуногенных фрагментов, был проведен биоинформатический скрининг для идентификации потенциальных аутореактивных нео-эпитопов в области соединений антигенных конструкций-кандидатов. Кратко, из последовательности вакцинного полипептида выделяли пептиды длиной шестнадцать аминокислот, занимающий пограничную область (соединение) между последовательными антигенными фрагментами каждой пары (8 аминокислот от каждого антигенного фрагмента). Длина области соединения 16 аминокислот гарантирует, что каждая 9-мерная последовательность в пределах области соединения содержит аминокислоты от обоих антигенов. Затем 9-мерные пептиды от каждого 16-мерного соединительного пептида сравнивали с коллекцией 9-мерных пептидов, представляющей полноразмерный протеом человека (полученной из базы данных пептидов RefSeq Национального центра биотехнологической информации (NCBI)). 9-Мерный пептид из области соединения последовательностей вакцинных полипептидов ни в одном случае не был обнаружен в белках человека.

б. Антигенный дизайн CalHV3

CalHV3 представляет собой гамма-герпесвирус, выделенный у игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*). На основании подобий структуры и последовательности, цикла воспроизведения вируса и патогенеза CalHV3 считают эквивалентным EBV вирусом игрунок. См., например, Cho *et al.*, PNAS 98(3):1224–1229 (2001). Заражение вирусом CalHV3 происходит на раннем этапе жизни, и согласно сообщениям он широко распространен в колониях игрунок, как в природе, так и в неволе.

Для оценки способности аналогичной вакцины к повторной экспансии функциональных ответов Т-лимфоцитов в модели игрунок на латентные и литические вирусные антигены у особей, латентно инфицированных гамма-герпесвирусом, были разработаны антигенные конструкции на основе CalHV3. Кратко, конструкция на основе латентных антигенов CalHV3 (CalHV3-L; проиллюстрирована на Фиг. 4А) была построена из иммуногенных фрагментов белков C1 (SEQ ID NO: 28), C7 (SEQ ID NO: 32) и ORF39 (SEQ ID NO: 36), которые являются ортологами CalHV3 белков EBV LMP1, LMP2 и EBNA1 соответственно. Как и в антигенной конструкции EBV-L, антигенные области, включенные в конструкцию CalHV3-L, подвергали фрагментации и шаффлингу таким образом, чтобы фрагменты одного и того же белка CalHV3 не примыкали друг к другу. Аминокислотная последовательность конечной антигенной конструкции CalHV3-L

представлена в SEQ ID NO: 44, кодируемой полинуклеотидом, представленным на SEQ ID NO: 45).

Также была построена конструкция на основе латентных/литических антигенов CalHV3 (CalHV3-LLy; проиллюстрирована на Фиг. 4B). В дополнение к фрагментам латентных белков C1, C7 и ORF39 CalHV3-LLy также содержит фрагменты ORF43, представляющего собой ортолог CalHV3 белка EBV ZEBRA. Аминокислотная последовательность конечной антигенной конструкции CalHV3-LLy представлена в SEQ ID NO: 46, кодируемой полинуклеотидом, представленным на SEQ ID NO: 47).

Наконец, был сконструирован вариант CalHV3-LLy (Ii-CalHV3-LLy) с генетическим адъювантом путем слияния ассоциированной с ГКГ II инвариантной полипептидной цепью (SEQ ID NO: 43) с N-концом CalHV3-LLy. Аминокислотная последовательность конечной антигенной конструкции II-CalHV3-LLy представлена в SEQ ID NO: 48, кодируемой полинуклеотидом, представленным на SEQ ID NO: 49).

Пример 2. Векторная конструкция

Полинуклеотиды, кодирующие EBV-L (SEQ ID NO: 25) и EBV-LLy (SEQ ID NO: 27), клонировали в плазмиде pVjTetOhCMV-bghpolyA, содержащей промотор tetOhCMV и сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (BGH pA), методами, описанными в WO2016/198621. Затем экспрессионные кассеты EBV-L и EBV-LLy трансфицировали в каркасе вектора ChAd155 в компетентные клетки *E. coli* BJ5183 посредством гомологической рекомбинации с получением векторов pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-EBV-L (и EBV-LLy). Нуклеиново-кислотная последовательность вектора pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-EBV-L представлена в SEQ ID NO: 50. Кодирующая область антигена находится в нуклеотидах 1348–4806 SEQ ID NO: 50. Нуклеиново-кислотная последовательность экспрессионного вектора pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-EBV-LLy представлена в SEQ ID NO: 51. Кодирующая область антигена находится в нуклеотидах 1348–5157 SEQ ID NO: 51. Векторная конструкция ChAd155-EBV была подтверждена секвенированием трансгена и рестрикционным анализом. Те же методы можно использовать для получения аденовирусных векторов EBV на основе альтернативных модифицированных каркасов ChAd155, как описано, например, в WO2016/198621.

Тем же методам следовали для получения векторов ChAd155-CalHV3-L, ChAd155-CalHV3-LLy и ChAd155-II-CalHV3-LLy (кодирующих антигены CalHV3-L, CalHV3-LLy и II-CalHV3-LLy CalHV3 соответственно). Нуклеиново-кислотная последовательность вектора pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-CalHV3-L представлена в SEQ ID

NO: 52 (кодирующая область в нуклеотидах 1348–4482). Нуклеиново-кислотная последовательность вектора pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-CalHV3-LLy представлена в SEQ ID NO: 53 (кодирующая область в нуклеотидах 1348–5238). Нуклеиново-кислотная последовательность вектора pChAd155 ($\Delta E1$, $\Delta E3$, $\Delta E4_Ad5E4$ orf6) TetO hCMV-Ii-CalHV3-LLy представлена в SEQ ID NO: 54 (кодирующая область в нуклеотидах 1348–5883).

Были также получены векторы MVA, кодирующие антигенные конструкции EBV-LLy и CalHV3-LLy, способами, известными в данной области техники. См., например, Ourmanov et al., *J. Virol.* (2009) 83:5388–5400; и Martinon et al. *Vaccine* (2008) 26:532–545.

Пример 3. Получение вирусных частиц

Векторы ChAd155_EBV-L и ChAd155_EBV-LLy линейаризовали эндонуклеазой рестрикции PmeI и трансфицировали ими линию клеток Procell92.S, полученную от HEK293, как описано в работе Vitelli et al., *PLOS One* (2013) 8(e55435):1–9. В целях подавления экспрессии трансгена в процессе генерации вируса эти клетки были генетически модифицированы так, что они конститутивно экспрессируют ген-репрессор TetO. Амплификацию вируса осуществляли в небольшом масштабе (колбе для шейкера) и очищали вирусные частицы ChAd155-EBV в двойном градиенте плотности CsCl из суспензионной культуры в масштабе 1 литр. Титры вирусных частиц ChAd155-EBV определяли с помощью кПЦР, нацеленной на промотор tetOhCMV. Тем же методам следовали для получения вирусных частиц из ChAd155-CalHV3-L, ChAd155-CalHV3-LLy и ChAd155-Ii-CalHV3-LLy.

Рекомбинантные векторы MVA, экспрессирующий антигенные конструкции EBV-LLy и CalHV3-LLy, были получены стандартными методами. Кратко, первичные культуры фибробластов куриных эмбрионов (CEF) при заданной плотности клеток инфицировали вирусным посевным материалом MVA-EBV и MVA-CalHV3 при заданной множественности инфекции. Собранные из культуры вирусы MVA-EBV и MVA-CalHV3 очищали центрифугированием с фракционным градиентом.

Пример 4. Иммуногенность антигенов ChAd155-EBV и ChAd155-CalHV3 у мышей

а. ChAd155-EBV

Оценку иммуногенности вирусных частиц ChAd155-EBV, полученных с векторов, экспрессирующих латентные или латентные и литические антигены, проводили на мышах, используя дизайн эксперимента, представленный в таблице 1. Кратко, мышам

СВ6F1 (6 мышей на группу) вводили однократную дозу (10^6 , 10^7 или 10^8 вирусных частиц внутримышечно) векторов ChAd155-EBV-L или ChAd155-EBV-LLy.

Через три недели после иммунизации выделяли спленоциты и проводили анализ ответов Т-лимфоцитов на антигены EBV в соответствии со стандартным анализом ИФН γ методом иммуноферментных пятен (ELISpot). Кратко, спленоциты от иммунизированных животных стимулировали перекрывающимися 15-мерными пептидами, распределенными на 5 пулов, каждый из которых охватывал иммуногенные фрагменты каждого из белков EBV, включенных в вакцину (LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA3A, ZEBRA; n=19–84 отдельных пептидов/пул). Шестой пул 16-мерных пептидов (E_J, n=18 пептидов), покрывающих каждое отдельное соединение между фрагментами, и ДМСО (разбавитель пептидов) также использовали в качестве стимуляторов для мониторинга ответов на соединительные эпитопы и в качестве отрицательного контроля соответственно. Активацию Т-лимфоцитов обнаруживали на основании подсчета секретирующих ИФН γ Т-лимфоцитов, индуцированных вакциной, методом иммуноферментных пятен (ELISPOT).

Таблица 1

Группа	Вектор	n	доза (вч)
1	ChAd155 EBV-L	6	10^8
2	ChAd155 EBV-L	6	10^7
3	ChAd155 EBV-L	6	10^6
4	ChAd155 EBV-LLy	6	10^8
5	ChAd155 EBV-LLy	6	10^7
6	ChAd155 EBV-LLy	6	10^6

Результаты представлены на Фиг. 5А. Как ChAd155-EBV-L, так и ChAd155-EBV-LLy индуцировали Т-лимфоцитов, секретирующих интерферон гамма (ИФН γ) дозозависимым образом. Были обнаружены ответы Т-лимфоцитов на каждый из латентных антигенов EBV (LMP1, LMP2, EBNA1 и EBNA3A) у мышей, иммунизированных как EBV-L, так и EBV-LLy. Тем не менее, ответы Т-лимфоцитов на литический белок EBV ZEBRA были выявлены только у мышей, иммунизированных

EBV-LLy. Ответов на соединительные пептиды (E_j) EBV или на отрицательный контроль ДМСО не выявлено.

Эти результаты показывают, что вирусные частицы, полученные с векторов ChAd155-EBV-L и ChAd155-EBV-LLy, способны вызывать антигенспецифические ответы Т-лимфоцитов на иммуногенные фрагменты, содержащиеся в антигенных конструкциях. Кроме того, первичный иммунный ответ на антигенные конструкции EBV-L и EBV-LLy не направлен на соединительные эпитопы.

б. ChAd155-CalHV3

Оценку иммуногенности вирусных частиц ChAd155-CalHV3 проводили, следуя тем же методам, как описано выше для оценки вирусных частиц ChAd155-EBV. Через 3 недели после вакцинации проводили антигенную стимуляцию спленоцитов перекрывающимися 15-мерными пептидами, распределенными на 4 пула, каждый из которых охватывал иммуногенные фрагменты, включенные в вакцину (C1, C7, ORF39, ORF43, n=58–96 отдельных пептидов/пул). Пятый пул 16-мерных пептидов (E_j, n=12 пептидов), покрывающих каждое отдельное соединение между фрагментами, и ДМСО (разбавитель пептидов) также использовали в качестве стимуляторов для мониторинга ответов на соединительные эпитопы и в качестве отрицательного контроля соответственно. Дизайн эксперимента представлен в сводном виде в таблице 2.

Таблица 2

Группа	Вектор	n	доза (вч)
1	ChAd155 CalHV3-L	6	10 ⁸
2	ChAd155 CalHV3-L	6	10 ⁷
3	ChAd155 CalHV3-L	6	10 ⁶
4	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10 ⁸
5	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10 ⁷
6	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10 ⁶

Результаты представлены на Фиг. 5В. Как ChAd155-CalHV3-L, так и ChAd155-CalHV3-LLy индуцировали у вакцинированных мышей Т-лимфоциты, секретирующие ИФН_γ дозозависимым образом. Ответы Т-лимфоцитов на пулы пептидов, охватывающие

латентные антигены CalHV3 C1, C7 и ORF39, были выявлены у мышей, иммунизированных как CalHV3-L, так и CalHV3-LLy. Тем не менее ответы Т-лимфоцитов на литический белок ORF43 CalHV3 были выявлены только у мышей, иммунизированных CalHV3-LLy. Ответов на соединительные пептиды (Cj) CalHV3 или на отрицательный контроль ДМСО не выявлено.

Эти результаты показывают, что вирусные частицы, полученные с векторов ChAd155-EBV-L и ChAd155-EBV-LLy, способны вызывать антигенспецифические ответы Т-лимфоцитов на иммуногенные фрагменты, содержащиеся в антигенных конструкциях. Кроме того, первичный иммунный ответ на антигенные конструкции CalHV3-L и CalHV3-LLy не направлен на соединительные эпитопы.

Пример 5. Эффект примирования — стимуляции у мышей

а. Примирование — стимуляция EBV-LLy

Оценку способности второй дозы антигена EBV-LLy к стимуляции иммунного ответа на первую дозу антигена EBV-LLy проводили с помощью экспериментального дизайна, представленного в сводном виде в таблице 3. Кратко, группы мышей СВ6F1 (n=5/группа) иммунизировали внутримышечно в день 0 5×10^7 вирусных частиц ChAd155-EBV-LLy. В день 21 (неделя 3) группа 2 получала вторую иммунизацию 10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ) MVA-EBV-LLy. Контрольные мыши либо не получали дополнительную иммунизацию (группа 3: «без стимуляции»), либо стимулирующую иммунизацию вектором MVA, кодирующим антиген, не родственный EBV (группа 1: MVA-неродственный антиген).

Таблица 3

Группа	Примирование (нед. 0)	Стимуляция (нед. 3)	n	доза (вч или БОЕ)
1	ChAd155 EBV-LLy	MVA-неродственный антиген	5	10^7 вч/ 10^7 бое
2	ChAd155 EBV-LLy	MVA EBV-LLy	5	10^7 вч/ 10^7 бое
3	ChAd155 EBV-LLy	<i>без стимуляции</i>	5	10^7 вч

Через четыре недели после первой иммунизации у мышей выделяли спленоциты и проводили оценку антигенспецифических ответов Т-лимфоцитов, используя методы, описанные в примере 4.

Как показано на Фиг. 6, иммунизация ChAd155-EBV-LLy с последующей стимулирующей иммунизацией MVA-EBV-LLy приводила к значимому увеличению EBV-специфичного высвобождения интерферона гамма по сравнению с мышами, не получившими стимулирующую иммунизацию, или с мышами, получившими стимулирующую инъекцию вектора MVA, кодирующего неродственный антиген. На Фиг. 6А представлены совокупные ответы Т-лимфоцитов на все антигены (LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA3A и ZEBRA), и на ФИГ. 6В показаны ответы на отдельные антигены.

б. Примирование — стимуляция CalHV3-LLy

Оценку стимуляции иммунных ответов на антигены CalHV3 проводили с использованием экспериментального дизайна, представленного в сводном виде в таблице 4. Кратко, группы мышей СВ6F1 (n=6/группа) иммунизировали внутримышечно в день 0 5×10^7 вирусных частиц ChAd155-CalHV3-LLy. В день 42 (неделя 6) группа 4 получала вторую иммунизацию той же антигенной конструкцией ChAd155-CalHV3-LLy, в то время как группа 3 получала стимулирующую иммунизацию MVA-CalHV3-LLy. Контрольные мыши либо не получали стимуляцию (группа 1), либо получала стимуляцию MVA, кодирующим антиген, не родственной CalHV3 (MVA-неродственный антиген).

Таблица 4

Группа	Примирование (нед. 0)	Стимуляция (нед. 6)	n	доза (вч или БОЕ)
1	ChAd155 CalHV3-LLy	без стимуляции	6	5×10^7 вч
2	ChAd155 CalHV3-LLy	MVA-неродственный антиген	6	5×10^7 вч/ 10^7 бое
3	ChAd155 CalHV3-LLy	MVA CalHV3-LLy	6	5×10^7 вч/ 10^7 бое
4	ChAd155 CalHV3-LLy	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5×10^7 вч/ 5×10^7 вч

Через семь недель после первой иммунизации у мышей выделяли спленоциты и проводили оценку антигенспецифических ответов Т-лимфоцитов, используя методы, описанные в примере 4.

Как показано на Фиг. 7, иммунизация ChAd155-CalHV3-LLy с последующей стимулирующей иммунизацией либо той же антигенной конструкцией (ChAd155-CalHV3), либо MVA-CalHV3-LLy приводила к значимому увеличению CalHV3-специфичного высвобождения интерферона гамма на 7-й неделе по сравнению с мышами, не получившими стимулирующую иммунизацию, или с мышами, получившими стимулирующую инъекцию неродственного антигена.

Эти результаты демонстрируют способность к усилению иммунного ответа на антигенные конструкции EBV и CalHV3 при использовании режимов примирования - стимуляции.

Пример 6. Слитые белки инвариантная цепь-CalHV3-LLy

Сообщали, что антигены, слитые с ассоциированной с главным комплексом гистосовместимости (ГКГ) II класса инвариантной цепью (Ii), усиливают антигенспецифические ответы Т-лимфоцитов. См., например, Carone et al., Mol Ther. 2014 May; 22(5): 1039–1047. Таким образом, проводили оценку иммуногенности вирусных частиц, экспрессирующих инвариантную цепь (Ii), слитую с N-концом антигенного полипептида CalHV3-LLy у мышей CB6F1 в соответствии с дизайном исследования, представленным в таблице 5. Оценка антигенспецифических ответов Т-лимфоцитов проводили с использованием методик анализа ИФН γ , описанных в примере 4.

Таблица 5

Группа	Примирование (нед. 0)	n	доза (вч)
1	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5×10^7 вч
2	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5×10^6 вч
3	ChAd155 Ii игрушки CalHV3-LLy	6	5×10^7 вч
4	ChAd155 Ii игрушки CalHV3-LLy	6	5×10^6 вч

На Фиг. 8 приведены сводные данные совокупных ответов Т-лимфоцитов на все антигены CalHV3-LLy (C1, C7, ORF39 и ORF43), наблюдаемых через две недели после иммунизации. При более низкой дозе антигена (5×10^6 вирусных частиц) ChAd155-Ii-CalHV3-LLy вызывала значимо большее высвобождение ИФН γ у иммунизированных

мышей, чем ChAd155-CalHV3-LLy. При более высокой исследуемой дозе антигена (5×10^7 вирусных частиц) различий не наблюдали.

Эти результаты указывают на то, что слияние антигенного полипептида CalHV3-LLy с ассоциированной с ГКГ II класса инвариантной полипептидной цепью усиливает Т-клеточный иммунный ответ на латентные и литические антигены CalHV3.

Пример 7. Иммуногенность антигенов CalHV3 у приматов, отличных от человека

Оценку иммуногенности антигенных конструкций CalHV3 проводили у серопозитивных по CalHV3 игрунок (*Callithrix jacchus*), относящихся к роду цепкохвостых приматов. Известно, что у игрунок распространена инфекция CalHV3. См., например, Cho et al., PNAS 98(3):1224–1229 (2001). В связи со структурными и патологическими сходствами между CalHV3 и EBV CalHV3-положительные игрунки могут выступать как ценная модель инфекции и патологии EBV у человека.

Животных иммунизировали, используя для вакцинации ChAd155 режим примирования/стимулирующей вакцинации MVA. Кратко, группа, состоящая из четырех взрослых животных (3 самцов и одной самки), получала примиряющую иммунизацию ChAd155-CalHV3-LLy (5×10^{10} вч) в день 0 и стимулирующую иммунизацию MVA-CalHV3-LLy (2×10^8) в день 56 (неделя 8). Образцы крови отбирали за 2 недели до примиряющих инъекций, через 3 недели после примиряющих инъекций и через 1, 4 и 7 недели после стимулирующих инъекций. Проводили оценку антигенспецифических ответов Т-лимфоцитов в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), используя методы, описанные в примере 4.

На Фиг. 9 показаны совокупные ответы Т-лимфоцитов у отдельных животных на все антигены CalHV3-LLy (С1, С7, ORF39 и ORF43), наблюдаемых на исходном уровне (нед. 0); через три недели после примирования (нед. 3 пп); и через одну, четыре и семь недель после стимуляции (нед. 1, нед. 4, нед. 7 пс). Перед иммунизацией у животных проявлялись базовые CalHV3-специфичные ответы Т-лимфоцитов, что согласуется с тем фактом, что животные являются носителями вируса. Через три недели после иммунизации ChAd155-CalHV3-LLy у животных проявлялась значимая экспансия ранее существующих CalHV3-специфичных ответов Т-лимфоцитов. Повышенные ответы Т-лимфоцитов сохранялись в течение 1 недели после стимуляции MVA-CalHV3-LLy и сокращался в течение следующих 2 месяцев, но у большинства животных по-прежнему превышал исходный уровень. Как показано на Фиг. 10, усиленные ответы Т-лимфоцитов на CalHV3-LLy были пролонгированными и полиспецифическими (т. е. на С1, С7, ORF39 и ORF43).

Эти результаты указывают на то, что векторы ChAd155 и MVA, кодирующие антигены CalHV3-LLy, могут эффективно вызывать повторную экспансию и продление ранее существующих антигенспецифических ответов Т-лимфоцитов у CalHV3-положительных игрунок, и что циркулирующие Т-лимфоциты, вызванные гамма-герпесвирусами, функционально не нарушаются и не истощаются.

Пример 8. Распознавание МКПК человека фрагментов EBV, кодируемых вакцинами на основе ChAd155 и латентных и литических генов EBV в MVA

Для валидации антигенных фрагментов латентных (EBNA1, EBNA3A, LMP1 и LMP2) и литических (ZEBRA) генов EBV, включенных в вакцину, проводили количественное определение ответов Т-лимфоцитов на соответствующие пулы пептидов у здоровых во всем остальном носителей EBV.

Кратко, замороженные мононуклеарные клетки (МКПК) от 8 здоровых людей-доноров размораживали и проводили оценку ответов Т-лимфоцитов на антигены EBV в соответствии со стандартной методикой анализа ELISpot на ИФН γ . МКПК высевали в трех повторах в количестве 2×10^5 клеток/лунка и стимулировали перекрывающимися 15-мерными пептидами, распределенными на 5 пулов, каждый из которых охватывал иммуногенные фрагменты каждого из белков EBV, включенных в вакцину (LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA3A, ZEBRA; n=19–84 отдельных пептидов/пул). В качестве отрицательного контроля использовали стимуляцию ДМСО (разбавителем пептидов). Активацию Т-лимфоцитов обнаруживали на основании подсчета секретирующих ИФН γ Т-лимфоцитов методом иммуноферментных пятен (ELISPOT).

Как показано на Фиг. 11, результаты указывают на то, что антигенспецифические ответы Т-лимфоцитов на иммуногенные фрагменты, содержащиеся в антигенных конструкциях EBV Lly могут быть легко выявлены у здоровых носителей EBV, при этом EBNA3A и ZEBRA распознаются чаще всего и вызывают самые высокие ответы, что согласуется с предшествующими работами (например, Taylor et al. *Ann. Rev. Immunol.* 33:787–821, 2015).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий:

(а) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 1,

(б) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6,

(в) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 11, и

(г) по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 13;

где полинуклеотид функционально связан с одной или более последовательностями, управляющими экспрессией указанного полипептида в клетке-хозяине.

2. Полинуклеотид по п. 1, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 21.

3. Полинуклеотид по п. 1 или 2, где полипептид содержит:

(б) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 6,

(в) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 11,

(г) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 13, или

(д) по меньшей мере десять фрагментов из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 и по меньшей мере 100 аминокислот SEQ ID NO: 21.

12. Полинуклеотид по любому из п.п. 3-11, где фрагменты SEQ ID NO: 1 не примыкают друг к другу.

13. Полинуклеотид по любому из п.п. 3-12, где фрагменты SEQ ID NO: 6 не примыкают друг к другу.

14. Полинуклеотид по любому из п.п. 3-13, где фрагменты SEQ ID NO: 11 не примыкают друг к другу.

15. Полинуклеотид по любому из п.п. 3-14, где фрагменты SEQ ID NO: 13 не примыкают друг к другу.

16. Полинуклеотид по любому из п.п. 3-15, где фрагменты SEQ ID NO: 21 не примыкают друг к другу.

17. Полинуклеотид по любому из п.п. 1-16, где полипептид содержит:

(а) первый и второй фрагменты LMP1 (латентный мембранный белок 1), где указанные первый и второй фрагменты LMP1 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2–5, и где указанные первый и второй фрагменты LMP1 в полипептиде не примыкают друг к другу,

(б) первый и второй фрагменты LMP2 (латентный мембранный белок 2), где указанные первый и второй фрагменты LMP2 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7–10, и где указанные первый и второй фрагменты LMP2 в полипептиде не примыкают друг к другу,

(в) фрагмент EBNA1 (ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барр), состоящий из SEQ ID NO: 12, и

(г) первый и второй фрагменты EBNA3A (ядерный антиген 3A вируса Эпштейна-Барр), где указанные первый и второй фрагменты EBNA3A выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14–20, и где указанные первый и второй фрагменты EBNA3A в полипептиде не примыкают друг к другу.

18. Полинуклеотид по любому из п.п. 1-17, где полипептид содержит:

- (а) первый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 2,
- (б) второй фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 3,
- (в) третий фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 4,
- (г) четвертый фрагмент LMP1, состоящий из SEQ ID NO: 5,
- (д) первый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 7,
- (е) второй фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 8,
- (ж) третий фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 9,
- (з) четвертый фрагмент LMP2, состоящий из SEQ ID NO: 10,
- (и) первый фрагмент EBNA1, состоящий из SEQ ID NO: 12,
- (к) первый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 14,
- (л) второй фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 15,
- (м) третий фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 16,
- (н) четвертый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 17,
- (о) пятый фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 18,
- (п) шестой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 19, и
- (р) седьмой фрагмент EBNA3A, состоящий из SEQ ID NO: 20;

где первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP1 не примыкают друг к другу; первый, второй, третий и четвертый фрагменты LMP2 не примыкают друг к другу;

и первый, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой фрагменты EBNA3A не примыкают друг к другу.

19. Полинуклеотид по п. 17 или 18, где полипептид дополнительно содержит:

(а) первый фрагмент ZEBRA (кодируемый BamHI Z активатор репликации вируса Эпштейна-Барр), состоящий из SEQ ID NO: 22, и

(б) второй фрагмент ZEBRA, состоящий из SEQ ID NO: 23;

где первый и второй фрагменты ZEBRA не примыкают друг к другу.

20. Полинуклеотид по любому из п.п. 1-19, где полипептид по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

21. Полинуклеотид по любому из п.п. 1-20, где фрагменты представляют собой иммуногенные фрагменты.

22. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из п.п. 1-21.

23. Вектор по п. 22, представляющий собой аденовирусный вектор или вектор на основе вируса осповакцины.

24. Вектор по п. 22 или 23, представляющий собой аденовирусный вектор нечеловекообразных обезьян.

25. Вектор по п. 24, где аденовирусный вектор нечеловекообразных обезьян представляет собой аденовирусный вектор шимпанзе.

26. Вектор по п. 22 или 23, представляющий собой вектор модифицированной осповакцины Анкара.

27. Вектор по любому из п.п. 22-25, представляющий собой экспрессионный вектор ChAd155-EBV-L, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 50.

28. Вектор по любому из п.п. 22-25, представляющий собой экспрессионный вектор ChAd155-EBV-LLy, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 51.

29. Полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из п.п. 1-21 или вектором по любому из п.п. 22-28.

30. Полипептид по п. 29, который по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

31. Иммуногенная композиция, содержащая полинуклеотид по любому из п. п. 1-21, вектор по любому из п.п. 22-28 или полипептид по любому из п.п. 29-30; и фармацевтически приемлемый эксципиент.

32. Иммуногенная композиция по п. 31, дополнительно содержащая адъювант.

33. Применение полинуклеотида по любому из п.п. 1-21, вектора по любому из п.п. 22-28, полипептида по любому из п.п. 29-30 или иммуногенной композиции по любому из п.п. 31-32 в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного инфицированием вирусом Эпштейна - Барр.

34. Полинуклеотид по любому из п.п. 1-21, вектор по любому из п.п. 22-28, полипептид по любому из п.п. 29-30 или иммуногенная композиция по любому из п.п. 31-32 для применения в лечении или профилактике заболевания, вызванного инфицированием вирусом Эпштейна - Барр.

35. Способ получения рекомбинантной вирусной частицы, способной к экспрессии антигена EBV, включающий экспрессию вектора по любому из п.п. 22-28 в клетке-хозяине.

36. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение указанному субъекту полинуклеотида по любому из п.п. 1-21, вектора по любому из п.п. 22-28, полипептида по любому из п.п. 29-30 или иммуногенной композиции по любому из п.п. 31-32.

37. Способ по п. 36, где субъект является серонегативным к вирусу Эпштейна - Барр.

38. Способ по п. 36, где субъект является серопозитивным к вирусу Эпштейна - Барр.

39. Способ лечения или профилактики ассоциированного с EBV заболевания у субъекта, включающий введение указанному субъекту полинуклеотида по любому из п.п. 1-21, вектора по любому из п.п. 22-28, полипептида по любому из п.п. 29-30 или иммуногенной композиции по любому из п.п. 31-32.

40. Способ по п. 39, где ассоциированное с EBV заболевание представляет собой EBV-ассоциированное аутоиммунное заболевание или EBV-ассоциированное злокачественное новообразование.

41. Способ по п. 39, где EBV-ассоциированное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, ревматоидного артрита и системной красной волчанки.

42. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий:

(а) введение аденовирусного вектора, содержащего полинуклеотид по любому из п.п. 1-21; и

(б) введение вектора на основе вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид по любому из п.п. 1-21;

где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке.

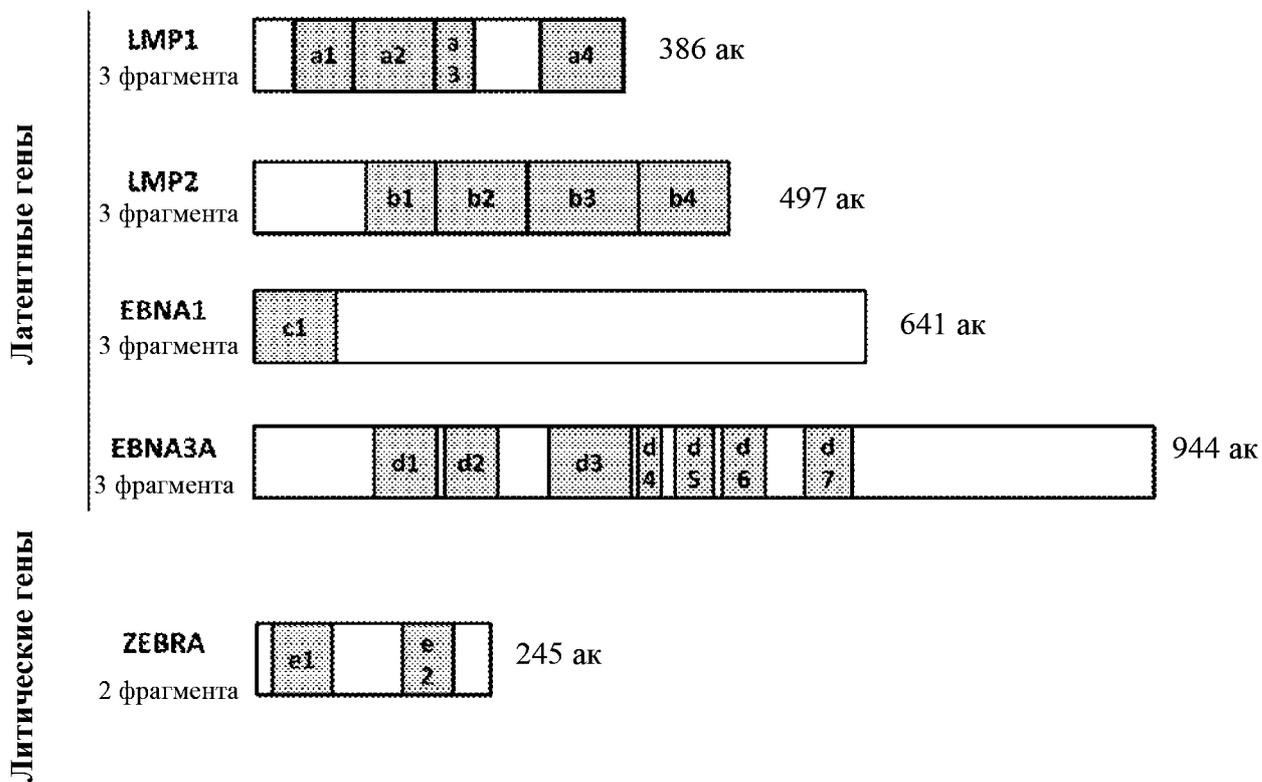
43. Способ лечения или профилактики ассоциированного с EBV заболевания у субъекта, включающий:

(а) введение аденовирусного вектора, содержащего полинуклеотид по любому из п.п. 1-21; и

(б) введение вектора на основе вируса осповакцины, содержащего полинуклеотид по любому из п.п. 1-21;

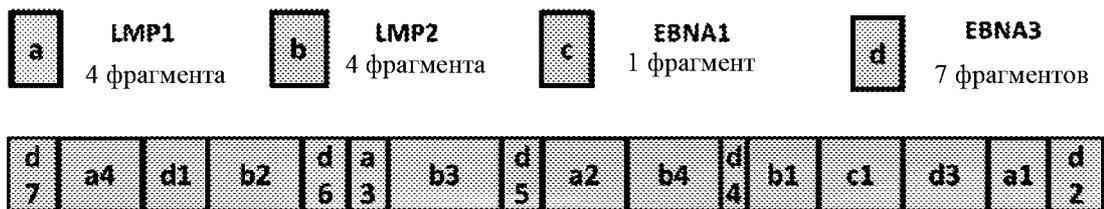
где стадии (а) и (б) проводят в любом порядке.

44. Способ по п. 42 или 43, где стадию (б) выполняют через одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более недель после стадии (а).

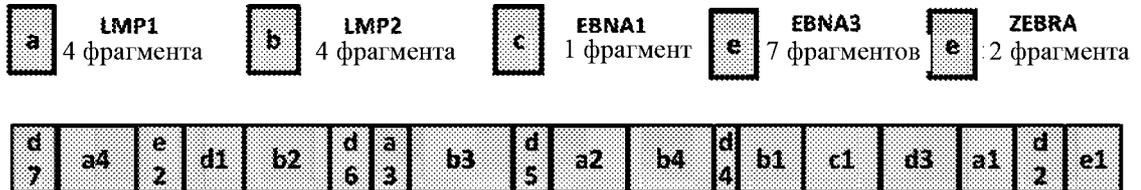
Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 1

Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 2

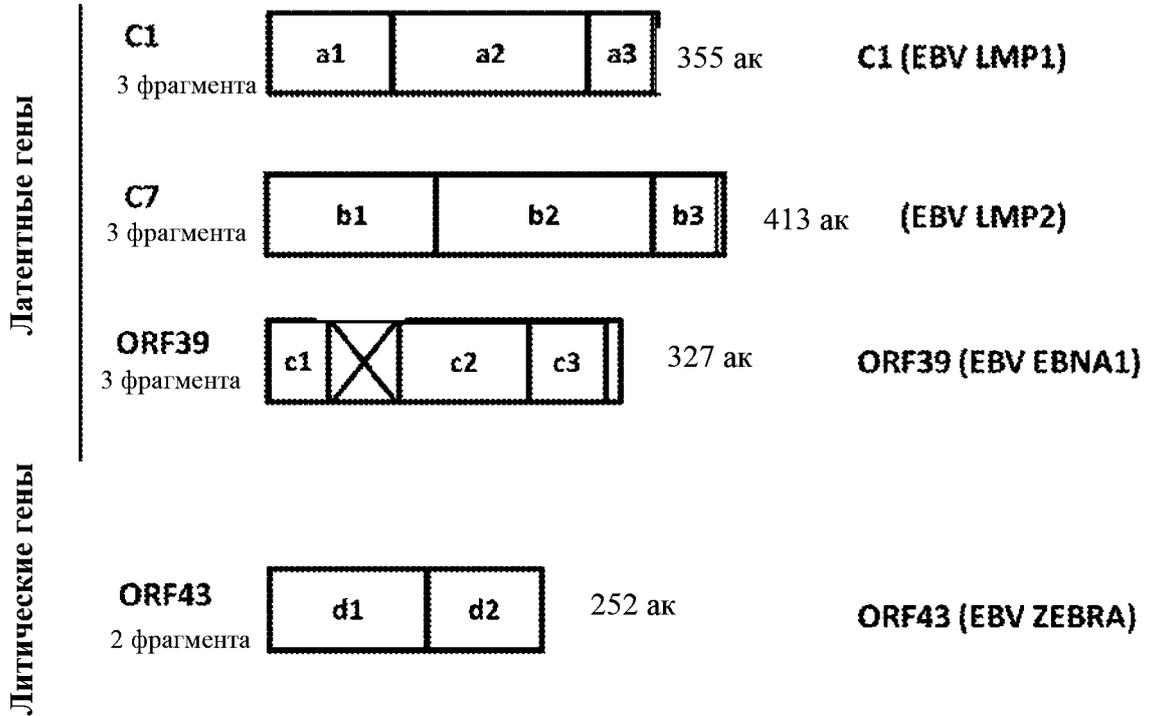
А) Конструкция EBV-Latent



В) Конструкция EBV-Latent+Lytic

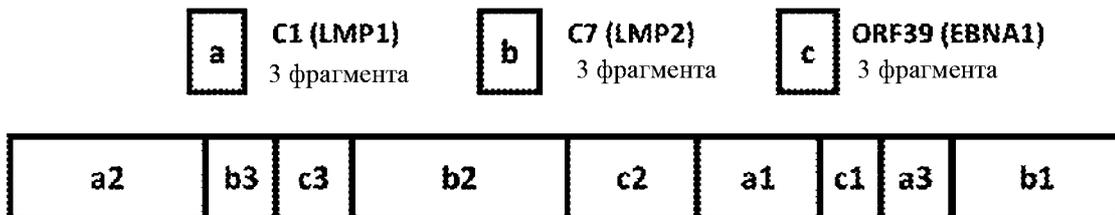


Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 3

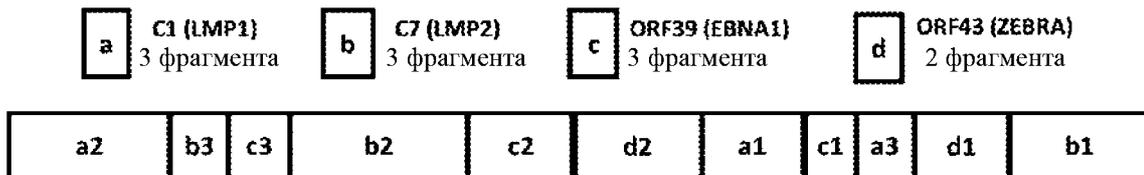


Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 4

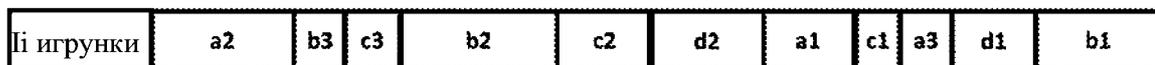
A) Конструкция CalHV3-Latent



B) Конструкция CalHV3-Latent+Lytic

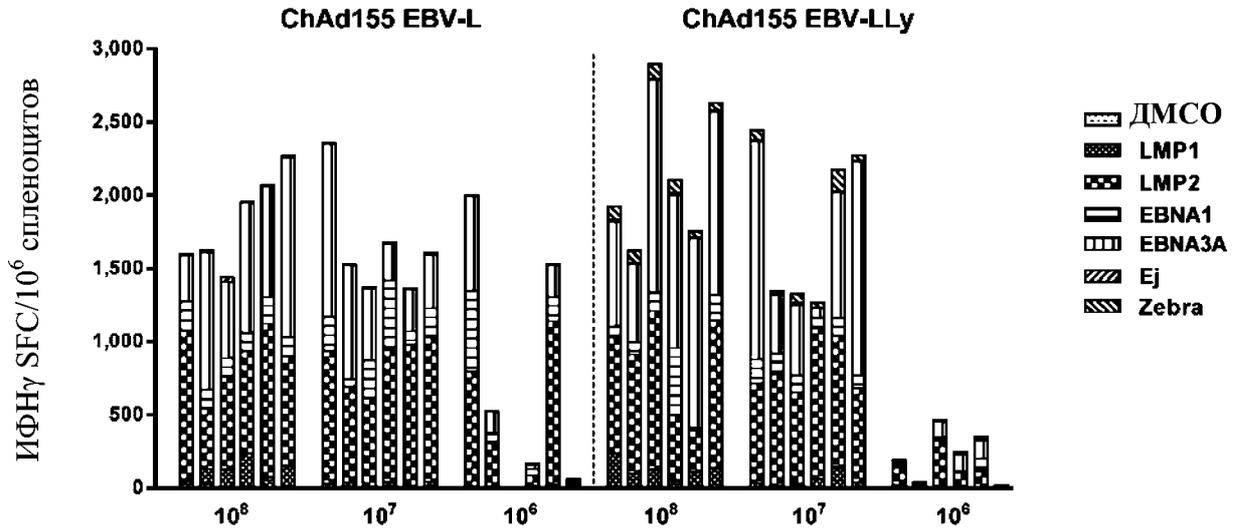


C) Конструкция CalHV3-Latent+Lytic с генетическим адьювантом



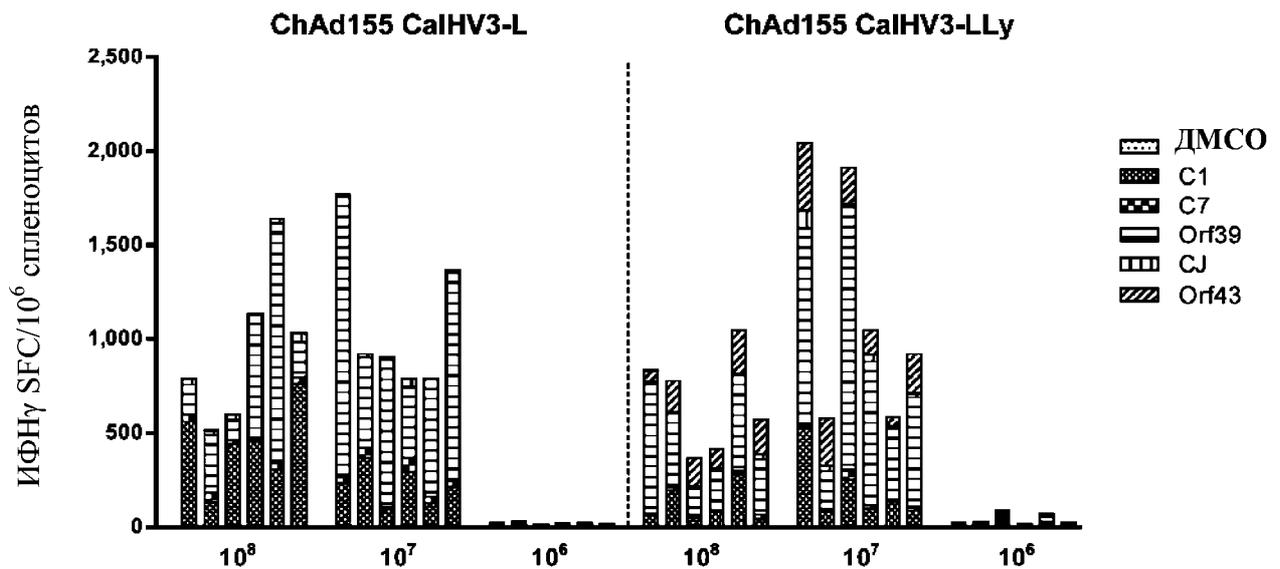
Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 5

А) Ответы Т-лимфоцитов на EBV-содержащие конструкции у мышей



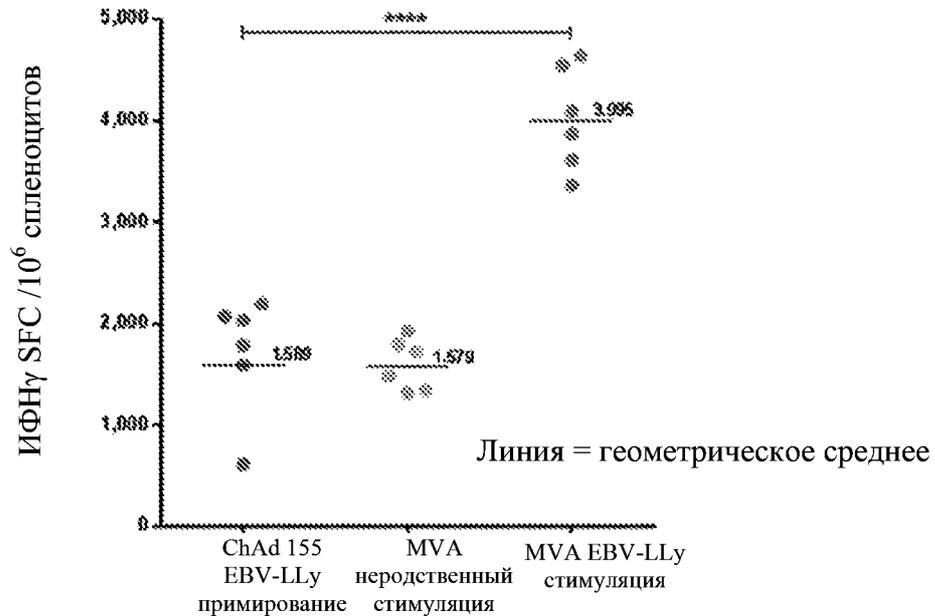
SFC = клетки, образующие ореол

В) Ответы Т-лимфоцитов на CalHV3-содержащие конструкции у мышей



Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 6

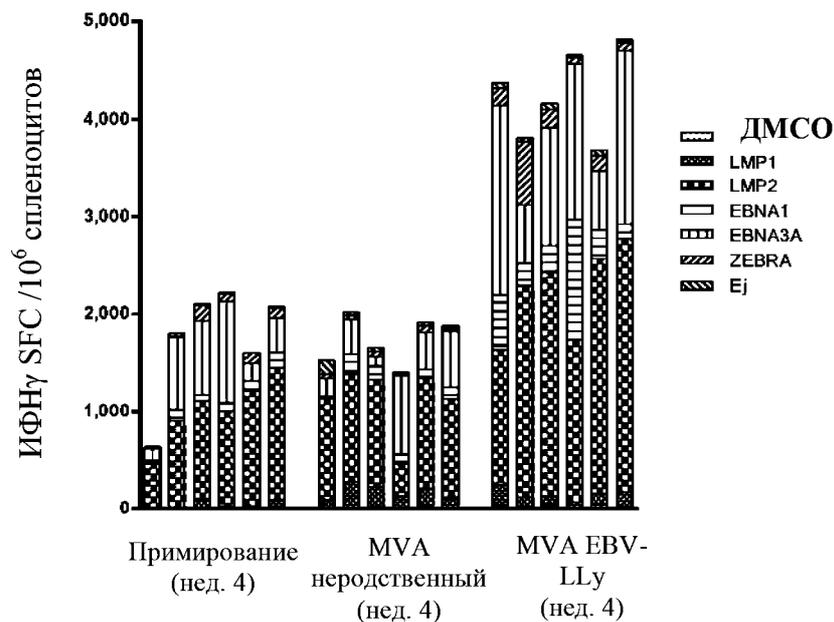
А) Совокупный ответ на антигены EBV-LLy



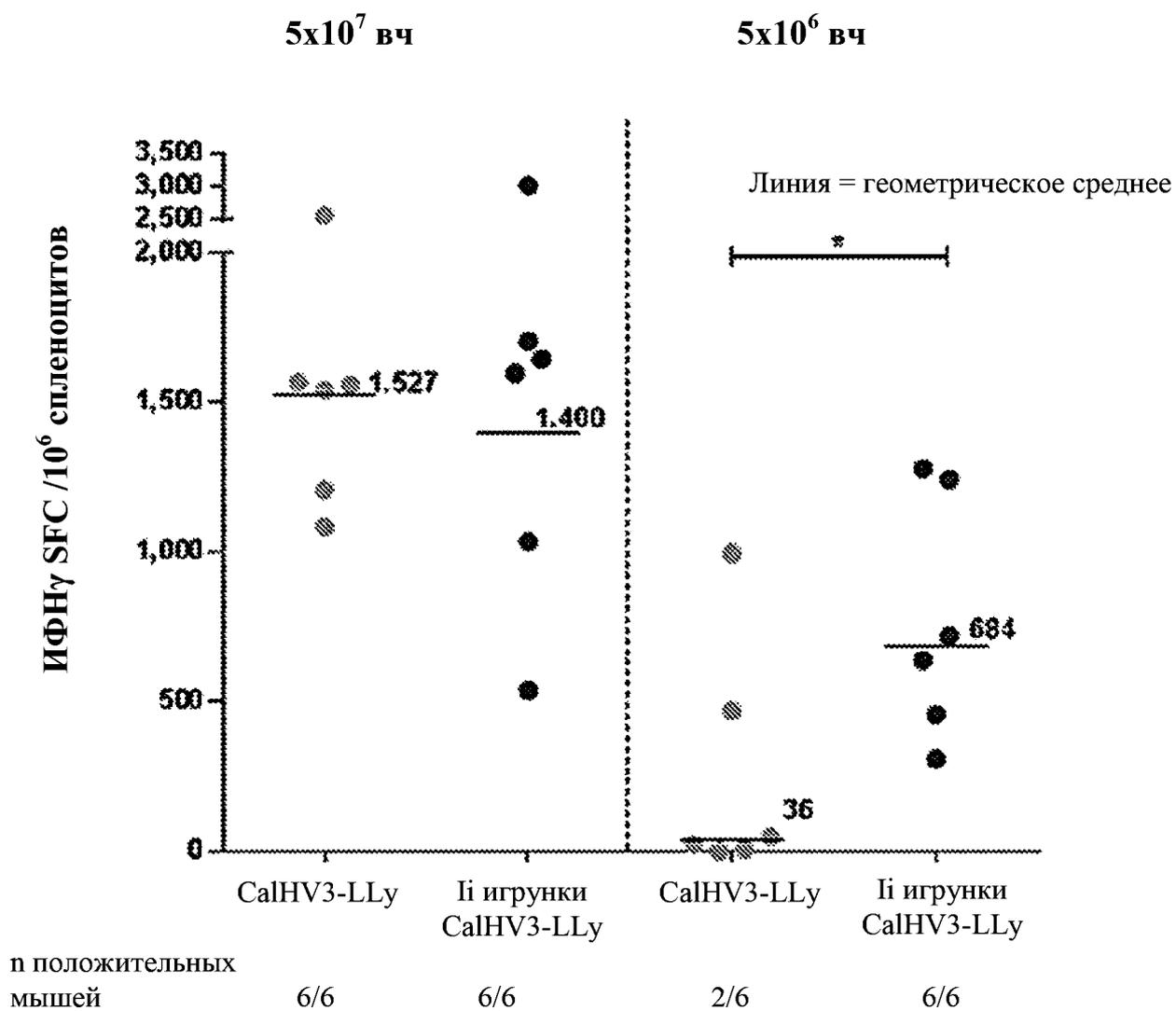
n положительных мышей 6/6 6/6 6/6

SFC = клетки, образующие ореол

В) Ответы на отдельные антигены EBV-LLy

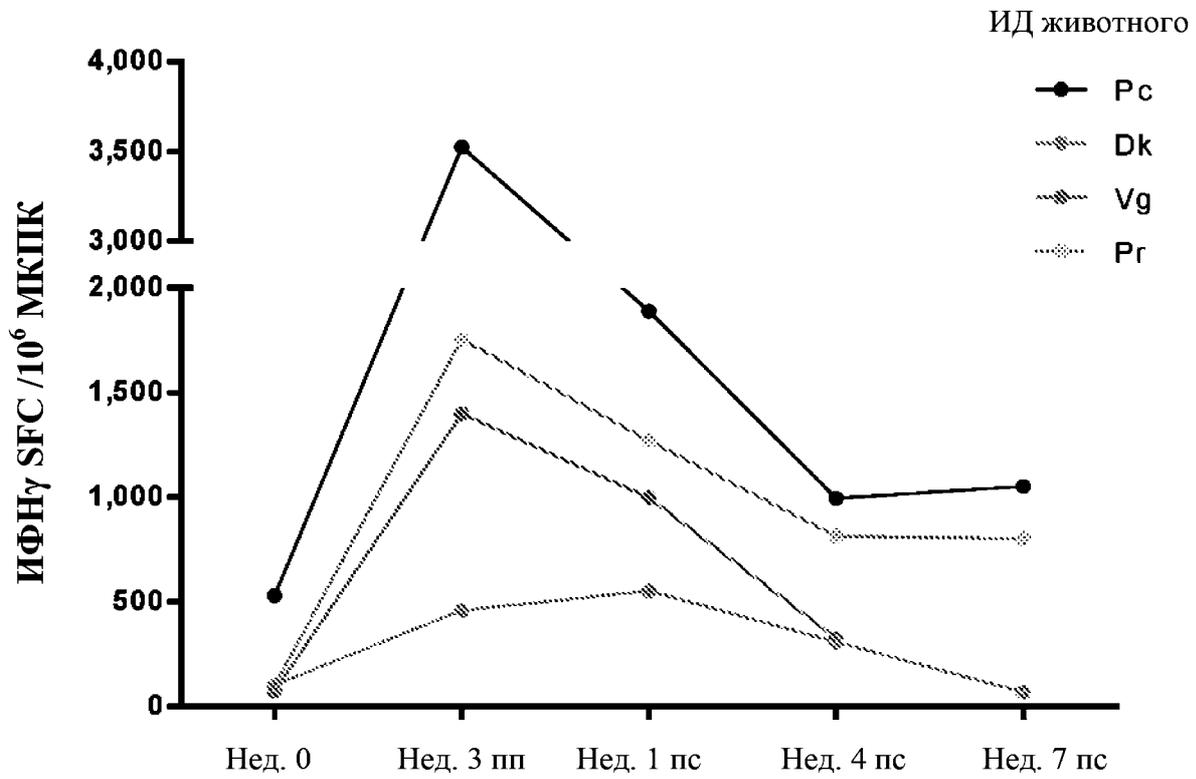


Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 8



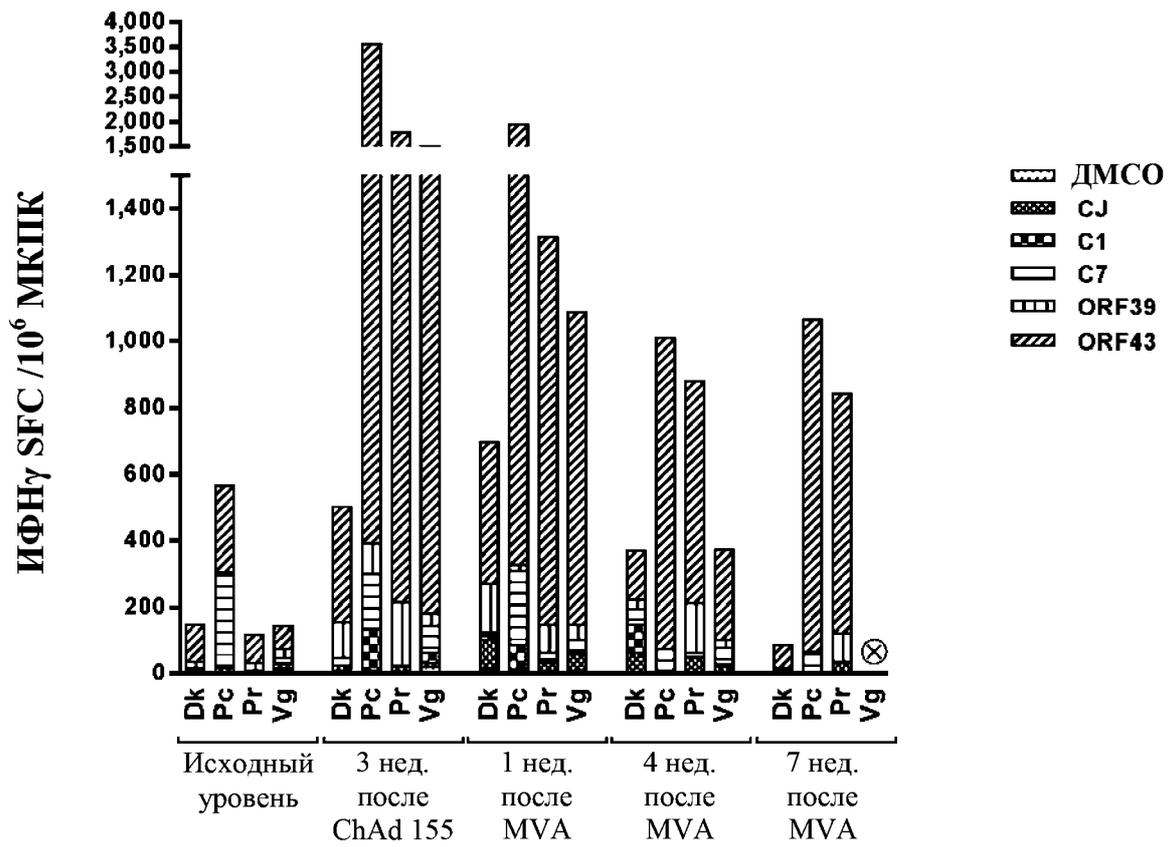
SFC = клетки, образующие ореол

Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 9



SFC = клетки, образующие ореол

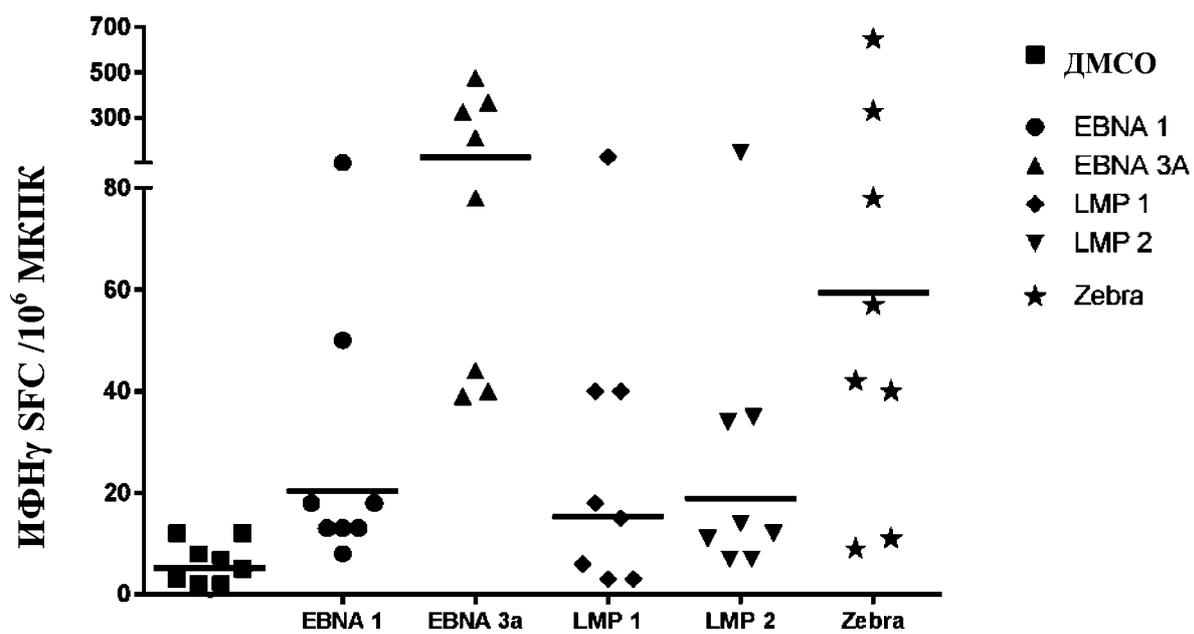
Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр
ФИГ. 10



SFC = клетки, образующие ореол

Антигенные конструкции на основе вируса Эпштейна-Барр

ФИГ. 11



SFC = клетки, образующие ореол