

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091516** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.03

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(51) Int. Cl. **A61K 39/29** (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV)

(31) РСТ/IB2017/058148; 62/607,439

(32) 2017.12.19

(33) IB; US

(86) РСТ/IB2018/060257

(87) WO 2019/123250 2019.06.27

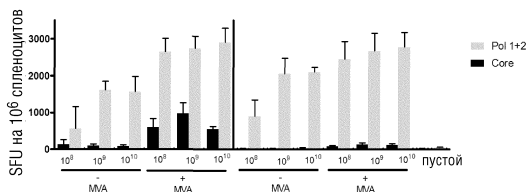
(71) Заявитель:
**ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE);
БАВАРИАН НОРДИК А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

**Бодан Даниель, Хортон Хелен, Нефс
Жан-Марк Эдмон Фернан Мари
(BE), Рой Соумитра, Кюстерс Йером
Хюбертина Хенрикус Виктор, Зан
Ролан Кристиан (NL), Калла Маркус
(DE), Де Потер Дорин (BE)**

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

(57) Изобретение относится к векторам на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и аденовирусным векторам, кодирующим антигены HBV. Изобретение также относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта-человека путем использования MVA и аденовирусных векторов, кодирующих антигены HBV в прайм/буст режиме для усиления иммунного ответа у субъекта-человека.



A1

202091516

202091516

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563380EA/019

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV)

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет Международной заявки на патент PCT/IB2017/058148, поданной 19 декабря 2017 года, и временной заявки на патент США 62/607439, поданной 19 декабря 2017 года, раскрытие которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Эта заявка содержит перечень последовательностей, который подан в электронном виде через EFS-Web как ASCII отформатированный перечень последовательностей с именем файла “688097-413 Перечень последовательностей” и датой создания 14 декабря 2018 года и который имеет размер 49,6 КБ. Перечень последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью описания изобретения и полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биотехнологии. Более конкретно, изобретение относится к способам и композициям для усиления иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV) у субъекта, нуждающегося в этом.

Предпосылки к созданию изобретения

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой небольшой гепатотропный ДНК-вирус размером 3,2 т.п.н., который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Около двух миллиардов человек инфицированы HBV, и около 240 миллионов человек имеют хроническую инфекцию гепатита В (хронический HBV), для которой характерны персистирующие вирусные и субвирусные частицы в крови в течение более 6 месяцев (1). Персистирующая HBV-инфекция приводит к Т-клеточному истощению циркулирующих и внутрипеченочных HBV-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток посредством хронической стимуляции HBV-специфических Т-клеточных рецепторов вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате полифункциональность Т-клеток снижается (то есть снижаются уровни IL-2, фактора некроза опухоли (TNF)- α , IFN- γ и отсутствия пролиферации).

Безопасная и эффективная профилактическая вакцина против гепатита В доступна с 1980-х годов и является основой профилактики гепатита В (3). Всемирная организация здравоохранения рекомендует вакцинацию всех детей грудного возраста, а в странах с низкой или промежуточной эндемичностью гепатита В рекомендуется вакцинация всех детей и подростков (возраста <18 лет), а также людей определенных групп риска. Из-за вакцинации уровень заболеваемости во всем мире резко снизился. Однако профилактические вакцины не излечивают установившуюся HBV-инфекцию.

Хронический HBV в настоящее время лечат IFN- α и нуклеозидными или

нуклеотидными аналогами, но окончательного излечения не происходит из-за сохранения в инфицированных гепатоцитах промежуточного звена внутриклеточной репликации вируса, называемого ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), которая играет фундаментальную роль в качестве матрицы для вирусных РНК и, следовательно, новых вирионов. Считается, что индуцированные вирус-специфические Т-клеточные и В-клеточные ответы могут эффективно устранять кзкДНК-несущие гепатоциты. Современные терапии, нацеленные на HBV-полимеразу, подавляют виремию, но оказывают ограниченный эффект на кзкДНК, которая находится в ядре, и соответствующую продукцию циркулирующего антигена. Наиболее радикальной формой лечения может быть удаление кзкДНК HBV из организма, которое не наблюдалось ни в качестве естественного результата, ни в результате какого-либо терапевтического вмешательства. Однако потеря поверхностных антигенов HBV (HBsAg) является клинически достоверным эквивалентом излечения, поскольку рецидив заболевания может произойти только в случаях тяжелой иммуносупрессии, которую затем можно предотвратить профилактическим лечением. Таким образом, по меньшей мере с клинической точки зрения, потеря HBsAg связана с наиболее строгой формой восстановления иммунитета против HBV.

Например, иммуномодуляция пегилированным интерфероном (pegIFN)- α оказалась лучше по сравнению с нуклеозидной или нуклеотидной терапией с точки зрения длительного ответа после лечения с конечным курсом лечения. Сообщается, что помимо непосредственного противовирусного эффекта IFN- α проявляет действие, направленное на эпигенетическую супрессию кзкДНК в клеточной культуре и у гуманизированных мышей, что приводит к снижению продуктивности вирионов и транскриптов (4). Однако эта терапия все еще чревата побочными эффектами, и общие ответы довольно низки, отчасти потому, что IFN- α оказывает только слабое модулирующее действие на HBV-специфические Т-клетки. В частности, показатели излечения являются низкими (<10%), а токсичность является высокой. Аналогичным образом, непосредственно действующие на HBV противовирусные средства, а именно ингибиторы HBV-полимеразы энтекавир и тенофовир, эффективны в качестве монотерапии для индукции вирусной супрессии с высоким генетическим барьером для появления лекарственно-резистентных мутантов и последующей профилактики прогрессирования заболевания печени. Однако излечение хронического гепатита В, определяемое потерей HBsAg или сероконверсией, редко достигается с использованием таких ингибиторов HBV-полимеразы. Следовательно, теоретически эти противовирусные препараты нужно вводить неопределенно долгое время, чтобы предотвратить повторное заболевание печени, аналогично антиретровирусной терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Терапевтическая вакцинация имеет потенциал устранения HBV у хронически инфицированных пациентов (5). Многие стратегии были изучены, но до настоящего времени терапевтическая вакцинация не была успешной.

Сущность изобретения

Соответственно, в медицине все еще существует неудовлетворенная потребность в способе лечения вируса гепатита В (HBV), особенно хронического HBV, для имеющего свои пределы хорошо переносимого лечения с более высоким уровнем излечения. Настоящая заявка удовлетворяет эту потребность. Изобретение относится к векторам на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). MVA вектор по изобретению включает не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4. Антиген HBV-полимераза из векторов на основе MVA, например, может обладать способностью к индукции иммунного ответа у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно, антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D. Более предпочтительно, антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D. В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления изобретения первая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления изобретения первая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления изобретения MVA вектор может дополнительно включать полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой. Сигнальная последовательность может, например, включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11. Предпочтительно, сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления изобретения MVA вектор дополнительно включает вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления изобретения вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления изобретения вторая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Также изобретение относится к композициям, включающие MVA вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способы включают (а) введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего не встречающуюся в природе молекулу

нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; и (b) введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению; для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека. В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н. В одном варианте осуществления изобретения первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Первая полинуклеотидная последовательность первой композиции может быть, например, по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления изобретения первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

В одном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты аденовирусного вектора в первой композиции дополнительно включает вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции может быть, например, по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 17. В одном варианте осуществления изобретения вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:17.

В одном варианте осуществления изобретения первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции кодируют слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой.

Слитый белок первой композиции может включать, например, усеченный коровий антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой через линкер. Линкер первой композиции может включать, например, аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5. Предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления изобретения слитый белок первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

В одном варианте осуществления изобретения усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека. Усиленный иммунный ответ может включать, например, усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека. Усиленный иммунный ответ может включать, например, усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

В одном варианте осуществления изобретения аденовирусный вектор представляет собой rAd26 или rAd35 вектор.

В одном варианте осуществления изобретения способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека включает (а) введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и второй плазмиды, включающей вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровий антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и (b) введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению; для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека. В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H. В одном варианте осуществления изобретения первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа. В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a). В одном варианте осуществления изобретения стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может

индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D и более, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Первая полинуклеотидная последовательность первой композиции может быть, например, по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления изобретения первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:19.

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления изобретения первая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 20. Первая полинуклеотидная последовательность первой композиции может включать, например, SEQ ID NO: 20.

В одном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты первой плазмиды первой композиции дополнительно включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой композиции. Сигнальная последовательность может включать, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления изобретения вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18. Вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции может включать, например, полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления изобретения первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции дополнительно включают промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, предпочтительно промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 и дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерной последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательность полиаденилирования SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления изобретения усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека. Усиленный иммунный ответ может включать, например, усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека. Усиленный иммунный ответ может включать, например, усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у

субъекта-человека.

Другие аспекты, характеристики и преимущества изобретения будут очевидны из следующего раскрытия, включая подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления и прилагаемую формулу изобретения.

Краткое описание чертежей

Представленное выше краткое описание изобретения, а также следующее подробное описание изобретения, будут более понятны при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Должно быть понятно, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На чертежах:

Фиг. 1A-1B показывают геном и цикл жизни вируса гепатита В; **FIG. 1A** представляет диаграмму генома вируса гепатита В (HBV); в природном вирусе белок полимеразы (Pol) содержит кодирующую последовательность для оболочечных белков в другой открытой рамке считывания; оболочечные белки (pre-S1, pre-S2 и S) находятся в одной и той же открытой рамке считывания; **Фиг. 1B** показывает цикл жизни HBV;

Фиг. 2A-2C схематически представляют экспрессионные кассеты в аденовирусных и MVA векторах в соответствии с вариантами осуществления изобретения; **Фиг. 2A** показывает экспрессионную кассету для усеченного корового антигена HBV, которая содержит CMV промотор, интрон (фрагмент, происходящий из человеческого ApoA1 гена - GenBank accession X01038 пары оснований 295-523, который содержит второй интрон ApoA1), сигнал секреции человеческого иммуноглобулина, затем кодирующую последовательность для усеченного корового антигена HBV и сигнал полиаденилирования SV40; **Фиг. 2B** показывает экспрессионную кассету для слитого белка усеченного корового антигена HBV, функционально связанного с антигеном HBV-полимеразой, которая, за исключением антигена HBV, в остальном идентична экспрессионной кассете для усеченного корового антигена HBV; **Фиг. 2C** показывает экспрессионную кассету, включающую коровый антиген HBV, функционально связанный с Pr13.5 длинным промотором, и экспрессионную кассету, включающую антиген HBV-полимеразы, функционально связанный с PrHyb промотором;

Фиг. 3 представляет график ELISPOT ответов F1 мышей, иммунизированных различными комбинациями HBV аденовирусных векторов и HBV MVA; HBV коровые(core) или полимеразные(pol) пептидные пулы, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных у различных групп вакцинированных животных, указаны черным (core) и серым (pol). Pol1 и pol2 ответы суммировали; X-ось показывает дозу аденовектора и присутствие или отсутствие бустерной дозы MVA; количество респонсивных Т-клеток указано на y-оси и выражено как образующие ореол клетки (SFC) на 10^6 спленоцитов;

Фиг. 4 представляет график ответов, полученных методом внутриклеточного цитокинового окрашивания (ICS), F1 мышей, иммунизированных различными комбинациями HBV аденовирусных векторов и HBV MVA; HBV коровые или

полимеразные пептидные пулы, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных у различных групп вакцинированных животных, указаны черным (core) и серым (pol). Pol1 и pol2 ответы суммировали; X-ось показывает дозу аденовектора и присутствие или отсутствие бустерной дозы MVA. Проценты CD8(+) Т-клеток, положительных на IFN γ , показаны на y-оси;

Фиг. 5 представляет график ICS ответов F1 мышей, иммунизированных различными комбинациями HBV аденовирусных векторов и HBV MVA векторов; HBV коровые или полимеразные пептидные пулы, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных у различных групп вакцинированных животных, указаны черным (core) и серым (pol). Pol1 и pol2 ответы суммировали; X-ось показывает дозу аденовектора и присутствие или отсутствие бустерной дозы MVA; проценты CD4(+) Т-клеток, положительных на IFN γ , показаны на y-оси;

Фиг. 6 представляет график ELISPOT ответов NHP, иммунизированных различными комбинациями HBV аденовирусных векторов и HBV MVA векторов; HBV коровые или полимеразные пептидные пулы, используемые для стимуляции PBMC, выделенных у различных групп вакцинированных животных, указаны в виде квадратов (core), кружков (pol1) и треугольников (pol2); X-ось показывает различные экспериментальные группы и временные точки. Количество респонсивных Т-клеток указано на y-оси и выражено как образующие ореол клетки (SFC) на 10^6 спленоцитов; представлены данные за вычетом исходного значения (среда+DMSO стимуляция); и

Фиг. 7А, 7В и 7С показывают графики ICS ответов NHP, иммунизированных различными комбинациями HBV аденовирусных векторов и HBV MVA векторов; HBV коровые или полимеразные пептидные пулы, используемые для стимуляции PBMC, выделенных у различных групп вакцинированных животных, указаны в виде квадратов (core), кружков (pol1) и треугольников (pol2); X-ось показывает различные экспериментальные группы и временные точки; проценты CD4(+) и CD8(+) Т-клеток, положительных на IFN γ , показаны на y-оси; представлены данные за вычетом исходного значения (среда+DMSO стимуляция).

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки создания изобретения" и в описании изобретения; каждый из этих ссылочных документов полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., которые были включены в настоящее описание, имеет целью обеспечить контекст для изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что какой-либо или все эти материалы являются частью предшествующего уровня техники в отношении любых изобретений, раскрытых или заявленных.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае,

некоторые термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что при использовании в настоящей заявке и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящей заявке, следует понимать как модифицируемые во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от приведенного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В контексте настоящей заявки использование числового диапазона определенно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в пределах таких диапазонов и доли значений, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, или они смогут установить путем не более чем рутинного экспериментирования, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются изобретением.

Повсеместно в описании и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "включать" и варианты, такие как "включает" и "включающий" следует понимать как включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. В контексте настоящей заявки термин "включающий" может быть заменен термином "содержащий" или "включая", или иногда при использовании в настоящей заявке термином "имеющий".

В контексте настоящей заявки "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не определенный в заявленном элементе. В контексте настоящей заявки "состоящий по существу из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики заявленного объекта. Любой из вышеуказанных терминов "включающий", "содержащий", "включая" и "имеющий", когда он используется в настоящей заявке в контексте аспекта или варианта осуществления изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "состоящий по существу из" для варьирования объемов раскрытия.

В контексте настоящей заявки термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами следует понимать как охватывающий как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к

применимости первого и второго элементов вместе. Предполагается, что любой из этих вариантов соответствует смыслу и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", как он используется в настоящей заявке. Должно быть понятно, что одновременная применимость более чем одного из вариантов также охватывается этим значением и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

В контексте настоящей заявки термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, который будет проходить или прошел лечение способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В контексте настоящей заявки термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, отличных от человека приматов (NHP), таких как обезьяны или приматы, людей и т.д., более предпочтительно человека.

Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и определяются как одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант используется для усиления иммунного ответа на аденовирусные и/или MVA-векторы по изобретению.

Также должно быть понятно, что термины "около", "приблизительно", "в целом", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящей заявке при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, указывают, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или схожими, как должно быть понятно специалистам в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать отклонения, которые с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, ошибки при измерении или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не должны изменять последнюю значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антигенных полипептидов HBV и полинуклеотидов, которые их кодируют) относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального наблюдения.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости

обозначают координаты субпоследовательности и программные параметры алгоритма последовательности. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательности для исследуемой последовательности (последовательностей) относительно эталонной последовательности на основе обозначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществить, например, с использованием алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритма выравнивания для определения гомологии Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), путем поиска метода подобия Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), путем реализаций этих алгоритмов программными средствами (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального осмотра (см. в основном *Current Protocols in Molecular Biology*, FM Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие между Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (Приложение 1995) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию высоко оцениваемых пар последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длины W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительно оцениваемому пороговому значению T , при выравнивании со словом той же длины в последовательности базы данных. T указывается как порог показателя сходства соседних слов (Altschul et al., *supra*). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как семена для начала поисков, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов удлиняются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

Суммарные баллы рассчитывают с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров M (балл вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного балла используется матрица оценок. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: совокупная оценка выравнивания снижается на величину X от своего максимального достигнутого значения; кумулятивная оценка уменьшается до нуля или ниже из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигается конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа

BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, M=5, N = -4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует в качестве значений по умолчанию длину слова (W) 3, ожидание (E) 10 и матрицу оценки BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915. (1989)).

В дополнение к вычислению процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним из показателей сходства, обеспечиваемым алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем около 0,1, более предпочтительно менее чем около 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем около 0,001.

Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептиды по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно, по существу, идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две нуклеотидные последовательности по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже.

В контексте настоящей заявки термин "усиленный", при использовании в отношении иммунного ответа, такого как ответ CD4⁺ Т-клеток, ответ антител или ответ CD8⁺ Т-клеток, относится к повышению иммунного ответа у субъекта, которому вводят прайм-буст комбинацию MVA и аденовирусных векторов в соответствии с изобретением, по сравнению с соответствующим иммунным ответом, наблюдаемым у субъекта, которому вводят только MVA вектор или аденовирус по изобретению.

В контексте настоящей заявки термин "CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеточный ответ" относится к Т-клеточному иммунному ответу, который характеризуется наблюдением высокой доли иммуноген-специфических CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток в популяции совокупных отвечающих Т-клеток после вакцинации. Общий иммуноген-специфический Т-клеточный ответ можно определить с использованием IFN-гамма ELISPOT анализа. Иммуноген-специфический CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ можно определить с использованием ICS анализа.

В контексте настоящей заявки термин "усиленный ответ антител" относится к усиленному ответу антител у субъекта, которому вводят прайм-буст комбинацию

векторов MVA и аденовируса в соответствии с изобретением, по сравнению с соответствующим иммунным ответом, наблюдаемым у субъекта, которому вводят только MVA вектор или аденовирус по изобретению.

Термин "адъювант" определяется как одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант используется для усиления иммунного ответа на плазмидные, аденовирусные и/или MVA векторы по изобретению.

В контексте настоящей заявки термин "антигенный генный продукт или его фрагмент" или "антигенный белок" может включать бактериальный, вирусный, паразитарный или грибковый белок или его фрагмент. Предпочтительно антигенный белок или антигенный генный продукт способен вызывать у хозяина защитный иммунный ответ, например, вызывать иммунный ответ против заболевания или инфекции (например, бактериального, вирусного, паразитарного или грибкового заболевания или инфекции), и/или вызывать иммунитет (т.е. вакцинация) у субъекта против заболевания или инфекции, который защищает субъекта от заболевания или инфекции.

Чтобы помочь читателю настоящей заявки, описание разделено на различные параграфы или разделы или направлено на различные варианты осуществления изобретения. Эти разделения не следует рассматривать как отделение содержания абзаца или раздела или вариантов осуществления от содержания другого абзаца или раздела или вариантов осуществления. Напротив, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, абзацев и предложений, которые могут быть рассмотрены. Обсуждение любого варианта осуществления представлено только в качестве примера и не предполагает, что объем раскрытия, включая формулу изобретения, ограничивается этими примерами. Например, хотя варианты осуществления HBV-векторов по изобретению (например, плазмидных ДНК или вирусных векторов), описанных в настоящей заявке, могут содержать конкретные компоненты, включая, но не ограничиваясь этим, некоторые промоторные последовательности, энхансерные или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, кодирующую последовательность HBV антигена, сигнальные последовательности полиаденилирования и т.д., расположенные в определенном порядке, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что концепции, раскрытые в настоящей заявке, в равной степени могут быть применимы к другим компонентам, расположенным в других порядках, которые могут использоваться в HBV векторах по изобретению. Настоящая заявка предусматривает использование любого из применимых компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, которая может использоваться в HBV векторах по изобретению, вне зависимости от того, описана явным образом конкретная комбинация или нет.

Вирус гепатита В (HBV)

В контексте настоящей заявки "вирус гепатита В" или "HBV" относится к вирусу

семейства *hepadnaviridae*. HBV представляет собой небольшой (например, 3,2 т.п.н.) гепатотропный ДНК вирус, который кодирует четыре открытых рамки считывания и семь белков. См. Фиг. 1А. Семь белков, кодируемых HBV, включают малый (S), средний (M) и большой (L) поверхностные антигенные (HBsAg) или оболочечные (Env) белки, прекодовый белок, коровый белок, вирусную полимеразу (Pol) и HBx белок. HBV экспрессирует три поверхностных антигена, или оболочечных белка, L, M и S, из которых S является наименьшим, а L является наибольшим. Дополнительные домены в M и L белках называются Pre-S2 и Pre-S1, соответственно. Коровый белок представляет собой субъединицу вирусного нуклеокапсида. Pol необходима для синтеза вирусной ДНК (обратная транскриптаза, РНКазы и праймер), который происходит в нуклеокапсидах, локализующихся в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. PreCore представляет собой коровый белок с N-концевым сигнальным пептидом и протеолитически процессируется на N и C концах до секреции из инфицированных клеток, как так называемый е-антиген гепатита В (HBeAg). HBx белок необходим для эффективной транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). HBx не является вирусным структурным белком. Все вирусные белки HBV имеют свою собственную мРНК, за исключением корового и полимеразы, которые имеют общую мРНК. За исключением белка preCore, ни один из HBV вирусных белков не подвергается посттрансляционному протеолитическому процессингу.

Вирион HBV содержит вирусную оболочку, нуклеокапсид и одну копию частично двухцепочечного ДНК генома. Нуклеокапсид включает 120 димеров корового белка и покрыт капсидной мембраной, заключенной в S, M и L вирусные оболочечные или поверхностные антигенные белки. После проникновения в клетку вирус не имеет оболочки, и капсид-содержащая релаксированная кольцевая ДНК (ркДНК) с ковалентно связанной вирусной полимеразой мигрирует в ядро. Во время этого процесса фосфорилирование корового белка индуцирует структурные изменения, раскрывая сигнал ядерной локализации, обеспечивающий взаимодействие капсида с так называемыми импортинами. Эти импортины опосредуют связывание корового белка с ядерными поровыми комплексами, при котором капсид распадается и комплекс полимеразы/ркДНК высвобождается в ядро. Внутри ядра ркДНК становится депротеинизированной (удаление полимеразы) и преобразуется посредством механизма репарации ДНК хозяина в геном ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), из которого перекрывающиеся транскрипты кодируют HBeAg, HBsAg, коровый белок, вирусную полимеразу и белок HBx. Коровый белок, вирусная полимеразы и прегеномная РНК (пгРНК) связываются в цитоплазме и самоорганизуются в незрелые пгРНК-содержащие капсидные частицы, которые в дальнейшем превращаются в зрелые пгРНК-капсиды и функционируют как общий промежуточный продукт, который либо заключается в оболочку и секретируется в виде инфекционных вирусных частиц, либо транспортируется обратно в ядро для пополнения и поддержания стабильного пула кзкДНК. См. Фиг. 1В.

На сегодняшний день HBV подразделяется на четыре серотипа (ad_r, ad_w, ay_r, ay_w)

на основании антигенных эпитопов, присутствующих в оболочечных белках, и на восемь генотипов (А, В, С, D, Е, F, G и H) на основании последовательности вирусного генома. Генотипы HBV распределены по разным географическим регионам. Например, наиболее распространенными генотипами в Азии являются генотипы В и С. Генотип D доминирует в Африке, на Ближнем Востоке и в Индии, тогда как генотип А широко распространен в Северной Европе, в Африке к югу от Сахары и в Западной Африке.

Антигены HBV

В контексте настоящей заявки термины “антиген HBV”, “антигенный полипептид HBV”, “HBV антигенный полипептид”, “антигенный белок HBV”, “иммуногенный полипептид HBV” и “HBV иммуноген” все относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно- опосредованный ответ, против HBV у субъекта. HBV антиген может представлять собой полипептид HBV, его фрагмент или эпитоп или комбинацию из нескольких полипептидов HBV, их части или производные. Антиген HBV способен вызывать у хозяина защитный иммунный ответ, например, индуцируя иммунный ответ против вирусного заболевания или инфекции и/или вырабатывая иммунитет (т.е. иммунизирует) у субъекта против вирусного заболевания или инфекции, который защищает субъекта против вирусного заболевания или инфекции. Например, антиген HBV может включать полипептид или его иммуногенный фрагмент(фрагменты) из любого белка HBV, такого как HBeAg, преколовый белок, HBsAg (S, M, или L белки), коловый белок, вирусная полимераза или HBx белок, происходящие из любого генотипа HBV, например генотипа А, В, С, D, Е, F, G, и/или H, или их комбинации.

(1) Коровый антиген HBV

В контексте настоящей заявки каждый из терминов “коровый антиген HBV”, “HBcAg” и “коровый антиген” относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против корового белка HBV у субъекта. Каждый из терминов “кор”, “коровый полипептид” и “коровый белок” относится к вирусному коровому белку HBV. Полноразмерный коровый антиген типично имеет 183 аминокислот в длину и включает домен сборки (аминокислоты 1-149) и домен связывания с нуклеиновыми кислотами (аминокислоты 150-183). Включающий 34 остатка домен связывания с нуклеиновыми кислотами необходим для капсидирования предгеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта. Он содержит 17 аргининовых остатков и является высокоосновным, что соответствует его функции. Коровый белок HBV является димерным в растворе, при этом димеры самоорганизуются в икосаэдрические капсиды. Каждый димер корового белка имеет четыре α -спиральных пучка, фланкированных α -спиральным доменом с обеих сторон. Усеченные коровые белки HBV, лишенные домена, связывающегося с нуклеиновыми кислотами, также способны образовывать капсиды.

В одном варианте осуществления изобретения HBV антиген представляет собой усеченный коровый антиген HBV. В контексте настоящей заявки “усеченный коровый

антиген HBV” относится к HBV антигену, который не содержит полную длину корового белка HBV, но может индуцировать иммунный ответ против корового белка HBV у субъекта. Например, коровый антиген HBV может быть модифицирован для делеции одной или нескольких аминокислот высоко положительно заряженного (богатого аргинином) С-концевого домена связывания с нуклеиновыми кислотами корового антигена, который типично содержит семнадцать аргининовых (R) остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения коровый антиген HBV представляет собой усеченный коровый белок HBV. Усеченный коровый антиген HBV по изобретению предпочтительно представляет собой усеченный на С-конце коровый белок HBV, который не включает сигнал ядерного импорта HBV, и/или усеченный коровый белок HBV, из которого удален С-концевой коровый сигнал ядерного импорта HBV. В одном варианте осуществления изобретения усеченный коровый антиген HBV включает делецию в С-концевом домене связывания с нуклеиновыми кислотами, такую как делеция 1- 34 аминокислотных остатков С-концевого домена связывания с нуклеиновыми кислотами, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислотных остатков, предпочтительно делеция всех 34 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления усеченный коровый антиген HBV включает делецию в С-концевом домене связывания с нуклеиновыми кислотами, предпочтительно всех 34 аминокислотных остатков.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, коровый антиген HBV может представлять собой консенсусную последовательность, происходящую из различных генотипов HBV (например, генотипов A, B, C, D, E, F, G и H). В контексте настоящей заявки “консенсусная последовательность” означает искусственную последовательность аминокислот, основанную на выравнивании аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, как определено путем выравнивания (например, с использованием Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Это может быть рассчитанный порядок наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, обнаруженных в каждом положении при выравнивании последовательности, на основании последовательностей антигенов HBV (например, корового, pol и т.д.) из по меньшей мере 100 природных HBV изолятов. Консенсусная последовательность может быть не встречающейся в природе и отличной от природных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности могут быть сконструированы путем выравнивания множества последовательностей антигенов HBV из разных источников, используя инструмент выравнивания множества последовательностей, и в различных выравниваемых положениях с выбором наиболее часто встречающейся аминокислоты. Предпочтительно, консенсусная последовательность антигена HBV происходит из HBV генотипов B, C и D. Термин “консенсусный антиген” используется как относящийся к антигену, имеющему консенсусную последовательность.

Усеченный коровый антиген HBV в соответствии с одним вариантом

осуществления изобретения не имеет функции связывания нуклеиновых кислот и может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно усеченный коровый антиген HBV может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D. Более предпочтительно, усеченный коровый антиген HBV может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения коровый антиген HBV представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D, более предпочтительно усеченный консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D. Иллюстративный усеченный HBV коровый консенсусный антиген в соответствии с изобретением состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, такой, которая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 представляет собой коровый консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D. SEQ ID NO: 2 содержит С-концевую делецию 34 аминокислот высоко положительно заряженного (богатый аргинином) домена связывания с нуклеиновыми кислотами природного корового антигена.

В конкретном варианте осуществления изобретения коровый антиген HBV представляет собой усеченный HBV антиген, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

(2) Антиген HBV-полимераза

В контексте настоящей заявки термин “антиген HBV-полимераза”, “HBV Pol антиген” или “HBV pol-антиген” относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против HBV-полимеразы у субъекта. Каждый из терминов “полимераза”, “полимеразный полипептид”, “Pol” и “pol” относится к вирусной ДНК полимеразе HBV. Вирусная ДНК полимеразы HBV имеет четыре домена, включая, от N конца к С концу, концевой белковый (TP) домен, который действует как праймер для синтеза ДНК минус-цепь; спейсер, который является несущественным для полимеразных функций; домен обратной транскриптазы (RT) для транскрипции; и домен РНКазы Н.

В одном варианте осуществления изобретения HBV антиген включает HBV Pol антиген или любой его иммуногенный фрагмент или их комбинацию. HBV Pol антиген может содержать дополнительные модификации для улучшения иммуногенности антигена, например, путем введения мутаций в активные сайты полимеразного и/или РНКазного доменов для снижения или по существу устранения некоторых ферментативных активностей.

Предпочтительно, HBV Pol антиген по изобретению не обладает активностью

обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н и может быть способным индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно HBV Pol антиген может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D. Более предпочтительно, HBV Pol антиген может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения HBV Pol антиген представляет собой инактивированный Pol антиген. В одном варианте осуществления изобретения инактивированный HBV Pol антиген включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном сайте полимеразного домена. В другом варианте осуществления инактивированный HBV Pol антиген включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном сайте домена РНКазыН. В предпочтительном варианте осуществления инактивированный HBV pol антиген включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном сайте обоих полимеразного домена и домена РНКазыН. Например, “YXDD” мотив в полимеразном домене HBV pol антигена, необходимый для связывания нуклеотидов/металлических ионов, может быть мутирован, например, путем замены одного или нескольких аспартатных остатков (D) аспарагиновыми остатками (N), устраняя или уменьшая функцию координации с металлами, таким образом уменьшая или по существу устраняя функцию обратной транскриптазы. Альтернативно или в дополнение к мутации “YXDD” мотива, “DEDD” мотив в домене РНКазыН HBV pol антигена, необходимый для Mg²⁺ координации, может быть мутирован, например, путем замены одного или нескольких аспартатных остатков (D) аспарагиновыми остатками (N) и/или замены глутаматного остатка (E) глутамином (Q), таким образом уменьшая или по существу устраняя функцию РНКазыН. В конкретном варианте осуществления HBV pol антиген модифицирован путем (1) мутации аспартатных остатков (D) в аспарагиновые остатки (N) в “YXDD” мотиве полимеразного домена; и (2) мутации первого аспартатного остатка (D) в аспарагиновый остаток (N) и первого глутаматного остатка (E) в глутаминовый остаток (N) в “DEDD” мотиве домена РНКазыН, таким образом уменьшая или по существу устраняя обе функции обратной транскриптазы и РНКазыН pol антигена.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения HBV pol антиген представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D, более предпочтительно инактивированный консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D. Иллюстративный HBV pol консенсусный антиген в соответствии с изобретением включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, такую, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%,

99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 представляет собой pol консенсусный антиген, происходящий из HBV генотипов В, С и D, включающий четыре мутации, находящиеся в активных сайтах полимеразного и РНКазыН доменов. В частности, четыре мутации включают мутацию остатков аспарагиновой кислоты (D) в аспарагиновые остатки (N) в “YXDD” мотиве полимеразного домена; и мутацию первого аспартатного остатка (D) в аспарагиновый остаток (N) и мутацию глутаматного остатка (E) в глутаминовый остаток (Q) в “DEDD” мотиве домена РНКазыН.

В конкретном варианте осуществления изобретения HBV pol антиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В других вариантах осуществления изобретения HBV pol антиген состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

(3) Слияние корового антигена HBV и антигена HBV-полимеразы

В контексте настоящей заявки термин “слитый белок” или “слияние” относится к одной полипептидной цепи, имеющей по меньшей мере два полипептидных домена, которые обычно не присутствуют в одном природном полипептиде.

В одном варианте осуществления изобретения антиген HBV включает слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с HBV pol-антигеном, или HBV pol-антиген, функционально связанный с усеченным коровым антигеном HBV, предпочтительно через линкер.

В контексте настоящей заявки термин “линкер” относится к соединению или фрагменту, который действует как молекулярный мостик для функционального связывания двух разных молекул, где одна часть линкера функционально связана с первой молекулой, и где другая часть линкера функционально связана с второй молекулой. Например, в слитом белке, содержащем первый полипептид и второй гетерологичный полипептид, линкер служит преимущественно в качестве спейсера между первым и вторым полипептидами. В одном варианте осуществления линкер состоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот. В одном варианте осуществления 1-20 аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Предпочтительно, линкер состоит по большей части из аминокислот, которые являются пространственно незатрудненными, таких как глицин и аланин. Примерами линкеров являются полиглицины, в частности, (Gly)₅, (Gly)₈; поли(Gly-Ala) и полиаланины. Одним примером подходящего линкера, как показано в Примерах ниже, является (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

Предпочтительно, слитый белок по изобретению может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против HBV core и HBV Pol по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно слитый белок может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D. Более

предпочтительно, слитый белок может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

В одном варианте осуществления изобретения слитый белок включает усеченный коровый антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 2, линкер и HBV pol-антиген, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 4.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения слитый белок включает усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, линкер, включающий (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5, и HBV pol-антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Более предпочтительно, слитый белок в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления изобретения слитый белок дополнительно включает сигнальную последовательность. Предпочтительно, сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11. Более предпочтительно, слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Полинуклеотиды и векторы

В одном общем аспекте настоящая заявка представляет не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HBV антиген в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, и вектор, включающий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. Не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты может включать любую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV по изобретению, которую можно получить с использованием способов, известных из уровня техники, в свете настоящего раскрытия. Предпочтительно, полинуклеотид кодирует по меньшей мере один из корового антигена HBV и антигена HBV-полимеразы по изобретению. Полинуклеотид может быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной рекомбинантными методами (например, клонированием) или полученной синтетически (например, химическим синтезом). ДНК может быть одноцепочечной или двухцепочечной, или может содержать части обеих двухцепочечной и одноцепочечной последовательности. ДНК может включать, например, геномную ДНК, кДНК или их комбинации. Полинуклеотид также может представлять собой ДНК/РНК гибрид. Полинуклеотиды и векторы по изобретению можно использовать для продукции рекомбинантных белков, экспрессии белка в клетке-хозяине или продукции вирусных частиц. Предпочтительно, полинуклеотид представляет собой ДНК.

В одном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты включает полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует усеченный коровый антиген HBV, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по изобретению, кодирующих усеченный коровый антиген HBV, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, такую, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая усеченный коровый антиген HBV, включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 17 или 18.

В одном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, такую, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по изобретению, кодирующих HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HBV pol-антиген, включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, 19 или 20.

В другом варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с HBV pol-антигеном, или HBV pol-антиген, функционально связанный с усеченным коровым антигеном HBV. В конкретном варианте осуществления не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; линкер; и антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, линкер, включающий (AlaGly) n , где n представляет собой целое число от 2 до 5; и HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по изобретению, кодирующих слитый белок, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 1, функционально связанную с кодирующей линкер последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 14, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичной SEQ ID NO: 14, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO: 14, которая также функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 3, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичной SEQ ID NO: 3, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления изобретения не

встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, включает SEQ ID NO: 1, функционально связанную с SEQ ID NO:14, которая также функционально связана с SEQ ID NO: 3.

В другом общем аспекте настоящая заявка относится к вектору, включающему выделенный полинуклеотид, кодирующий антиген HBV. В контексте настоящей заявки, “вектор” представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую для переноски генетического материала в другую клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. В свете настоящего раскрытия можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области. Примеры векторов включают, но не ограничиваются этим, плазмиды, вирусные векторы (бактериофаг, животные вирусы и растительные вирусы), космиды и искусственные хромосомы (например, YAC). Предпочтительно, вектор представляет собой ДНК плазмиду. Вектор может представлять собой ДНК вектор или РНК вектор. В свете настоящего раскрытия специалист в данной области может сконструировать вектор по изобретению, используя стандартные рекомбинантные методы.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, вектор может представлять собой вектор экспрессии. В контексте настоящей заявки термин “вектор экспрессии” относится к любому типу генетической конструкции, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную транскрибироваться. Векторы экспрессии включают, но не ограничиваются этим, векторы для экспрессии рекомбинантного белка, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор, и векторы для доставки нуклеиновой кислоты субъекту для экспрессии в ткани субъекта, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор. Специалистам в данной области должно быть понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т.д.

Векторы в соответствии с вариантами осуществления могут содержать множество регуляторных последовательностей. В контексте настоящей заявки термин “регуляторная последовательность” относится к любой последовательности, которая делает возможной, способствует или модулирует функциональную регуляцию молекулы нуклеиновой кислоты, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одной из ее производных (т.е. мРНК) в клетке или организме хозяина. В контексте настоящего раскрытия этот термин охватывает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования и элементы, которые влияют на стабильность мРНК).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой не вирусный вектор. Примеры не вирусных векторов включают, но не ограничиваются этим, ДНК плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т.д. Предпочтительно, не вирусный вектор представляет собой ДНК плазмиду. “ДНК плазида”, которая используется взаимозаменяемо с “ДНК плазмидным вектором”, “плазмидной ДНК” или “плазмидным ДНК вектором”, относится

к последовательности двухцепочечной и, как правило, кольцевой ДНК, которая способна к автономной репликации в подходящей клетке-хозяине. ДНК плазмиды, используемые для экспрессии кодируемого полинуклеотида, типично включают ориджин репликации, сайт множественного клонирования и селектируемый маркер, который, например, может представлять собой ген резистентности к антибиотикам. Примеры ДНК плазмид, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, коммерчески доступные векторы экспрессии для использования в хорошо известных системах экспрессии (включая как прокариотические, так и эукариотические системы), такие как pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для продукции и/или экспрессии белка в *Escherichia coli*; pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для продукции и/или экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae* штаммах дрожжей; MAXBAC® полная бакуловирусная система экспрессии (Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для продукции и/или экспрессии в клетках насекомых; pcDNATM или pcDNA3TM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для высокого уровня экспрессии конститутивного белка в клетках млекопитающего; и pVAX или pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для высокого уровня транзитной экспрессии представляющего интерес белка в клетках большинства млекопитающих. Остов любой коммерчески доступной ДНК плазмиды может быть модифицирован для оптимизации экспрессии белка в клетке-хозяине, например для реверсии ориентации некоторых элементов (например, ориджина репликации и/или кассеты резистентности к антибиотикам), замены промотора, эндогенного плазмиде (например, промотора в кассете резистентности к антибиотикам), и/или замены полинуклеотидной последовательности, кодирующей транскрибированные белки (например, кодирующей последовательности гена резистентности к антибиотикам), с использованием обычных методов и легко доступных исходных веществ. (См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения ДНК плазида представляет собой вектор экспрессии, подходящий для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Векторы экспрессии, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, но не ограничиваются этим, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 и т.д. Предпочтительно, вектор экспрессии основан на pVAX-1, который может быть далее модифицирован для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. pVAX-1 представляет собой обычно используемую плазмиду в ДНК-вакцинах и содержит сильный немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV-IE), за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), происходящая из бычьего гормона роста (bGH). pVAX-1 также содержит ориджин репликации pUC и ген резистентности к канамицину, управляемый небольшим прокариотическим промотором, что обеспечивает размножение бактериальной плазмиды.

В варианте осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. Как правило, вирусные векторы представляют собой генно-инженерные вирусы, несущие модифицированную вирусную ДНК или РНК, которая стала неинфекционной, но все еще содержит вирусные промоторы и транскены, обеспечивая, таким образом, возможность трансляции транскена через вирусный промотор. Поскольку вирусные векторы часто не имеют инфекционных последовательностей, им требуются хелперные вирусы или пакующие линии для крупномасштабной трансфекции. Примеры вирусных векторов, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, аденовирусные векторы, векторы на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), аденоассоциированные вирусные векторы, поксвирусные векторы, энтеровирусные векторы, векторы на основе вируса венесуэльского лошадиного энцефалита, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т.д.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, вектор, например ДНК плазида или вирусный вектор, может включать любые регуляторные элементы для установления общепринятой функции(функций) вектора, включая, но не ограничиваясь этим, репликацию и экспрессию антигена(антигенов) HBV, кодируемого полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваются этим, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, связывающийся с рибосомой элемент, терминатор транскрипции, селективируемые маркеры, ориджин репликации и т.д. Вектор может включать одну или несколько экспрессионных кассет. “Экспрессионная кассета” является частью вектора, который направляет клеточный механизм на производство РНК и белка. Экспрессионная кассета обычно включает три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (UTR), необязательно включающую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ORF) представляет собой рамку считывания, которая содержит кодирующую последовательность представляющего интерес белка (например, антигена HBV) от старт-кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы кассеты экспрессии могут быть функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий антиген HBV. В контексте настоящей заявки термин “функционально связанный” следует понимать в самом широком разумном контексте, и он относится к связыванию полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Полинуклеотид является “функционально связанным”, когда он находится в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает промоторную последовательность, предпочтительно в кассете экспрессии, для контроля экспрессии представляющего интерес антигена HBV. Термин “промотор” используется в его общепринятом смысле и относится к нуклеотидной последовательности, которая

инициирует транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор расположен на той же цепи рядом с нуклеотидной последовательностью, которую он транскрибирует. Промоторы могут быть конститутивными, индуцибельными или репрессируемыми. Промоторы могут быть природными или синтетическими. Промотор может происходить из источников, включающих вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может быть гомологичным промотором (то есть происходить из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (то есть происходить из другого вектора или генетического источника). Например, если используемый вектор представляет собой ДНК плазмиду, промотор может быть эндогенным по отношению к плазмиде (гомологичным) или происходить из других источников (гетерологичным). Предпочтительно, промотор расположен перед полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, в каскаде экспрессии.

Примеры промоторов, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, промотор из обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор, содержащий длинный концевой повтор (LTR) бычьего вируса иммунодефицита (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как немедленно-ранний CMV промотор (CMV-IE), промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Дополнительные промоторы, подходящие для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, RSV промотор, LTR ретровируса, основной поздний аденовирусный промотор и различные поксвирусные промоторы, включая, но не ограничиваясь этим, следующие происходящие из вируса осповакцины или MVA и происходящие из FPV промоторы: 30K промотор, I3промотор, PrS промотор, PrHyb, PrS5E промотор, Pr7.5K, Pr13.5длинный промотор, 40K промотор, MVA-40K промотор, FPV 40K промотор, 30k промотор, PrSynIIм промотор, PrLE1 промотор и PR1238 промотор. Другие промоторы также описаны в WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 и WO 2014/063832 и WO2017/021776, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Промотор также может представлять собой промотор из человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин, или человеческий металлотионеин. Промотор также может представлять собой тканеспецифический промотор, такой как специфический в отношении мышечной или кожной ткани промотор, природный или синтетический.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения промотор представляет собой сильный эукариотический промотор, предпочтительно цитомегаловирусный немедленно-ранний (CMV-IE) промотор. Нуклеотидная последовательность иллюстративного CMV-IE промотора показана в SEQ ID NO: 7.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения промотор представляет собой поксвирусный промотор, предпочтительно промотор, выбранный из

длинного PrMVA 13.5 и/или PrHyb. Нуклеотидные последовательности для иллюстративных длинного Pr13.5 промотора и PrHyb промотора показаны как SEQ ID NO:25 и 26, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые стабилизируют экспрессированный транскрипт, усиливают ядерный экспорт РНК транскрипта и/или улучшают транскрипционно-трансляционное сопряжение. Примеры таких последовательностей включают сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования типично расположен ниже кодирующей последовательности для белка, представляющего интерес (например, антигена HBV) в экспрессионной кассете вектора. Энхансерные последовательности являются регуляторными ДНК последовательностями, которые, когда они связаны факторами транскрипции, усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Энхансерная последовательность предпочтительно расположена выше полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV, но ниже промоторной последовательности в экспрессионной кассете вектора.

В свете настоящего раскрытия можно использовать любой сигнал полиаденилирования, известный специалистам в данной области. Например, сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40 (например, SEQ ID NO:16), сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования человеческого β -глобина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормон роста (bGH). Нуклеотидная последовательность иллюстративного bGH сигнала полиаденилирования показана в SEQ ID NO:9.

В свете настоящего раскрытия можно использовать любую энхансерную последовательность, известную специалистам в данной области. Например, энхансерная последовательность может представлять собой человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или вирусный энхансер, такой как один из CMV, HA, RSV или EBV. Примеры конкретных энхансеров включают, но не ограничиваются этим, посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) HBV суслика, последовательность интрона/экзона, происходящую из предшественника аполипопротеина A1 человека, нетранслируемый домен R-U5 длинного концевого повтора(LTR) вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (HTLV-1), энхансер сплайсинга, синтетический интрон β -глобина кролика или любую их комбинацию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения энхансерная последовательность представляет собой составную последовательность из трех последовательных элементов нетранслируемого домена R-U5 LTR HTLV-1, интрона β -глобина кролика и энхансера сплайсинга, которая указана в настоящей заявке как “тройственная энхансерная последовательность”. Нуклеотидная последовательность иллюстративной тройственной

энхансерной последовательности показана в SEQ ID NO: 8. Другая иллюстративная энхансерная последовательность представляет собой фрагмент гена AroAI, показанный в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность. Предпочтительно, полинуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальную пептидную последовательность, расположена перед полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV. Сигнальные пептиды обычно направляют локализацию белка, способствуют секреции белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце антигена HBV при экспрессии из вектора, но отщепляется сигнальной пептидазой, например при секреции из клетки. Экспрессированный белок, в котором отщеплен сигнальный пептид, часто называют “зрелым белком”. В свете настоящего раскрытия можно использовать любой сигнальный пептид, известный в данной области. Например, сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид цистатина S; сигнал секреции иммуноглобулина (Ig), такой как сигнальный пептид гамма-тяжелой цепи Ig, SPIgG, или сигнальный пептид эпсилон-тяжелой цепи Ig, SPIgE.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения сигнальная пептидная последовательность представляет собой сигнальный пептид цистатина S. Иллюстративные нуклеотидная и аминокислотная последовательности сигнального пептида цистатина S показаны в SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно. Иллюстративные нуклеотидная и аминокислотная последовательности сигнала секреции иммуноглобулина показаны в SEQ ID NO: 10 и 27 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

Вектор, такой как ДНК плазида, также может включать бактериальный ориджин репликации и кассету экспрессии резистентности к антибиотикам для выбора и поддержания плазмиды в бактериальных клетках, например E. coli. Бактериальные ориджины репликации и кассеты резистентности к антибиотикам могут быть расположены в векторе в той же ориентации, что и экспрессионная кассета, кодирующая антиген HBV, или в противоположной (обратной) ориентации. Ориджин репликации (ORI) представляет собой последовательность, с которой начинается репликация, позволяя плазмиде репродуцироваться и выживать в клетках. Примеры ORI, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K и 15A, предпочтительно pUC. Иллюстративная нуклеотидная последовательность pUC ORI показана в SEQ ID NO: 21.

Экспрессионные кассеты для выбора и поддержания в бактериальных клетках типично включают промоторную последовательность, функционально связанную с геном резистентности к антибиотикам. Предпочтительно, промоторная последовательность, функционально связанная с геном резистентности к антибиотикам, отличается от промоторной последовательности, функционально связанной с полинуклеотидной

последовательностью, кодирующей белок, представляющий интерес, например антиген HBV. Ген резистентности к антибиотикам может быть кодон-оптимизированным, и композиция последовательности гена резистентности к антибиотикам обычно адаптирована для использования бактериального, например *E. coli*, кодона. В свете настоящего раскрытия можно использовать любой ген резистентности к антибиотикам, известный специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, ген резистентности к канамицину (Kan^r), ген резистентности к ампициллину (Amp^r) и ген резистентности к тетрациклину (Tet^r), а также гены, сообщающие резистентность к хлорамфениколу, блеомицину, спектиномицину, карбенициллину и т.д.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор, включающий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один из антигена HBV, выбранный из группы, состоящей из HBV pol-антигена, включающего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 4, и усеченного корового антигена HBV, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; вышележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, включающую, от 5' конца к 3' концу, промоторную последовательность, предпочтительно CMV-IE промоторную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, предпочтительно тройственную энхансерную последовательность SEQ ID NO: 8 или AroA1 энхансерную последовательность SEQ ID NO: 15, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, предпочтительно сигнал цистатина S, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и нижележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, включающую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 16 или bGH сигнал полиаденилирования SEQ ID NO: 9.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно MVA вектор, включающий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один из антигена HBV, выбранного из группы, состоящей из HBV pol-антигена, включающего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 4, и усеченного корового антигена HBV, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; вышележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, включающую, от 5' конца к 3' концу, промоторную

последовательность, предпочтительно PrMVA13.5 длинную промоторную последовательность SEQ ID NO: 25 или PrHyb промоторную последовательность SEQ ID NO: 26, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, предпочтительно сигнал цистатина S, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и нижележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, включающую сигнал полиаденилирования или сигнал преждевременной терминации, где сигнал преждевременной терминации имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28, или где сигнал полиаденилирования выбран из SV40 сигнала полиаденилирования, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, или bGH сигнала полиаденилирования, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, предпочтительно нижележащая последовательность, функционально связанная с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, представляет собой сигнал преждевременной терминации, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления изобретения вектор, такой как вирусный вектор, кодирует HBV pol-антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, вектор включает кодирующую последовательность для HBV pol-антигена, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления изобретения вектор, такой как вирусный вектор, кодирует усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Предпочтительно, вектор включает кодирующую последовательность для усеченного корового антигена HBV, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 1.

Еще в одном варианте осуществления изобретения вектор, такой как вирусный вектор, кодирует слитый белок, включающий HBV pol-антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, вектор включает кодирующую последовательность для слияния, которая содержит кодирующую последовательность для усеченного корового антигена HBV, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:1, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%,

99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO:1, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 1, функционально связанную с кодирующей последовательностью для HBV pol-антигена, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 3, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичной SEQ ID NO:3, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, кодирующая последовательность для усеченного корового антигена HBV функционально связана с кодирующей последовательностью для HBV pol-антигена через кодирующую последовательность для линкера, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 14, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичную SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления изобретения вектор включает кодирующую последовательность для слияния, содержащую SEQ ID NO: 1, функционально связанную с SEQ ID NO: 14, которая также функционально связана с SEQ ID NO: 3.

В свете настоящего раскрытия полинуклеотиды и векторы экспрессии, кодирующие антигены HBV по изобретению, можно получить любым способом, известным из уровня техники. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген HBV, может быть встроен или “клонирован” в вектор экспрессии с использованием стандартных методов молекулярной биологии, например полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т.д., которые хорошо известны специалистам в данной области.

Аденовирусы

В одном аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный аденовирус, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV core-антиген. В другом аспекте настоящая заявка представляет аденовирус, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV pol-антиген. В другом аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный аденовирусный вектор, включающий первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV core-антиген, и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV pol-антиген. В другом аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный аденовирус, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный слитый белок HBV core-HBV pol.

Аденовирус в соответствии с изобретением принадлежит к семейству *Adenoviridae* и, предпочтительно, относится к роду *Mastadenovirus*. Это может быть человеческий аденовирус, но также и аденовирус, который заражает другие виды, включая, но не ограничиваясь этим, бычий аденовирус (например, бычий аденовирус 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), свиной аденовирус (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус обезьян и аденовирус приматов, такой

как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно аденовирус представляет собой человеческий аденовирус (HAdV или AdHu); в настоящей заявке подразумевается человеческий аденовирус, если он указан как Ad без указания видов, например, краткое указание “Ad5” означает то же самое, что HAdV5, который является аденовирусом человека 5 серотипа) или аденовирус приматов, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV).

Наиболее продвинутые исследования были осуществлены с использованием человеческих аденовирусов, и человеческие аденовирусы являются предпочтительными в соответствии с некоторыми аспектами изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с изобретением основан на человеческом аденовирусе. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на человеческом аденовирусе серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 или 50. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления, аденовирус представляет собой человеческий аденовирус одного из серотипов 26 или 35.

Преимущество этих серотипов заключается в низкой серопревалентности и/или низких предсуществующих титрах нейтрализующих антител в популяции людей. Получение векторов rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virol* 81 (9):4654-63, которые оба включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте. Иллюстративные геномные последовательности Ad26 можно найти в GenBank Accession EF 153474 и в WO 2007/104792 (см., например, SEQ ID NO: 1). Получение векторов rAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al. (2003) *J Virol* 77 (15):8263-71, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте. Иллюстративные геномные последовательности Ad35 можно найти в GenBank Accession AC_000019 и в WO 00/70071 (см., например, Фиг. 6).

Аденовирусы обезьян обычно также имеют низкую серопревалентность и/или низкие предсуществующие титры нейтрализующих антител в популяции людей, и были сообщения о значительном объеме работ с использованием аденовирусных векторов шимпанзе (например, US 6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina et al., 2001, *J Virol* 75: 11603-13; Cohen et al., 2002, *J Gen Virol* 83:151-55; Kobinger et al., 2006, *Virology* 346:394-401; Tatsis et al., 2007 *Molecular Therapy* 15:608-17; см. также обзор Bangari and Mittal, 2006, *Vaccine* 24:849-62; обзор Lasaro and Ertl, 2009, *Mol Ther* 17:1333-39). Следовательно, в других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с изобретением основан на аденовирусе обезьян, например, аденовирусе шимпанзе. В одном из вариантов осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе обезьян типа 1, 3, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,1, 28,1, 29, 30, 31,1, 32, 33, 34, 35,1, 36, 37,2, 39, 40,1, 41,1, 42,1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Аденовирусные векторы rAd26 и rAd35

В предпочтительном варианте осуществления изобретения аденовирусные векторы содержат капсидные белки двух редких серотипов: Ad26 и Ad35. В типичном варианте осуществления вектор представляет собой вирус rAd26 или rAd35.

Таким образом, векторы, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают капсидный белок Ad26 или Ad35 (например, фибриллярный, пентоновый или гексоновый белок). Специалисту в данной области должно быть понятно, что нет необходимости использовать весь капсидный белок Ad26 или Ad35 в векторах по изобретению. Таким образом, химерные капсидные белки, которые включают по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35, могут быть использованы в векторах по изобретению. Векторы по изобретению могут также включать капсидные белки, в которых фибриллярные, пентоновые или гексоновые белки получены каждый из разного серотипа, при условии, что по меньшей мере один капсидный белок происходит из Ad26 или Ad35. В предпочтительных вариантах осуществления фибриллярный, пентоновый или гексоновый белки происходят каждый из Ad26 или каждый из Ad35.

Специалисту в данной области должно быть понятно, что элементы, происходящие из нескольких серотипов, могут быть объединены в один рекомбинантный аденовирусный вектор. Таким образом, может быть получен химерный аденовирус, который сочетает в себе желательные свойства от различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный аденовирус по изобретению может сочетать отсутствие предсуществующего иммунитета серотипов Ad26 и Ad35 с такими характеристиками, как температурная стабильность, сборка, заякоривание, выход продукции, обратное развитие или ослабление инфекции, стабильность ДНК в клетке-мишени и т.п.

В варианте осуществления изобретения рекомбинантный аденовирусный вектор, полезный в настоящем изобретении, происходит в основном или полностью из Ad35 или из Ad26 (т.е. вектор представляет собой rAd35 или rAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например потому что он содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов по изобретению, происходящих из Ad26 или Ad35, типичным является обмен кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса с E4-orf6 аденовируса человеческой подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих клеточных линиях, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т.п. (см., например, Havenga et al, 2006, J Gen Virol 87:2135-43; WO 03/104467). В одном варианте осуществления аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 35 с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4 orf6 областью Ad5. В варианте осуществления изобретения аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 26 с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4 orf6 областью Ad5. Для аденовируса Ad35 типично сохранять 3'-конец открытой рамки считывания E1B 55K в

аденовирусе, например 166 п.н. непосредственно перед рІХ открытой рамкой считывания, или содержащий его фрагмент, такой как фрагмент размером 243 п.н. непосредственно перед старт-кодоном рІХ, отмеченный на 5'-конце рестрикционным сайтом Bsu36І, поскольку это повышает стабильность аденовируса, т.к. промотор гена рІХ частично находится в этой области (см., например, Havenga et al, 2006, выше; WO 2004/001032).

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Получение rAd26 векторов описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63. Иллюстративные геномные последовательности Ad26 можно найти в GenBank Accession EF 153474 и в SEQ ID NO:1 WO 2007/104792. Получение rAd35 векторов описано, например, в патенте США № 7270811 и в Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263-71. Иллюстративную геномную последовательность Ad35 можно найти в GenBank Accession AC_000019.

В одном варианте осуществления изобретения векторы, полезные в изобретении, включают векторы, описанные в WO2012/082918, раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

Типично, вектор, полезный в изобретении, получают с использованием нуклеиновой кислоты, включающей полный геном рекомбинантного аденовируса (например, плазмиду, космиду или бакуловирусный вектор). Таким образом, изобретение также обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют аденовирусные векторы по изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной путем клонирования или полученной синтетически. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

Аденовирусные векторы, полезные в изобретении, обычно дефектны по репликации. В этих вариантах осуществления вирус становится дефектным по репликации путем делеции или инактивации областей, критичных для репликации вируса, таких как область E1. Области могут быть по существу делетированы или инактивированы, например, путем вставки представляющего интерес гена (обычно связанного с промотором). В некоторых вариантах осуществления векторы по изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как области E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, связанных с промотором. Для E2- и/или E4-мутированных аденовирусов обычно используют E2- и/или E4-дополняющие клеточные линии для получения рекомбинантных аденовирусов. Мутации в области E3 аденовируса не должны дополняться клеточной линией, поскольку E3 не требуется для репликации.

Пакующая клеточная линия обычно используется для получения достаточного количества аденовирусных векторов по изобретению. Пакующая клетка представляет собой клетку, которая включает те гены, которые были делетированы или инактивированы в дефектном по репликации векторе, обеспечивая возможность репликации вируса в клетке. Подходящие клеточные линии включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

Как отмечено выше, множество различных антигенов вируса гепатита В (HBV)

(например, HBV коровый антиген и антиген HBV полимеразу) могут экспрессироваться в векторах. Если требуется, гетерологичный ген, кодирующий антиген HBV, может быть кодон-оптимизированным для обеспечения соответствующей экспрессии у подлежащего лечению хозяина (например, человека). Кодон-оптимизация представляет собой метод, широко используемый в данной области. Как правило, гетерологичный ген клонируют в E1 и/или E3 область аденовирусного генома.

Гетерологичный ген вируса гепатита В может находиться под контролем (то есть функционально связан с) промотора, происходящего из аденовируса (например, главного позднего промотора), или может находиться под контролем гетерологичного промотора. Примеры подходящих гетерологичных промоторов включают CMV промотор и RSV промотор. Предпочтительно, промотор расположен перед интересующим гетерологичным геном в экспрессионной кассете.

MVA векторы

В MVA векторах, полезных в изобретении, используют аттенуированный вирус, происходящий из модифицированного вируса осповакцины Анкара. MVA векторы экспрессируют широкий ряд различных антигенов HBV (например, HBV коровый антиген и антиген HBV-полимеразу). В одном аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный MVA вектор, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV core-антиген. В другом аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный MVA вектор, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV pol-антиген. В одном аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный MVA вектор, включающий первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV core-антиген, и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный HBV pol-антиген. В другом аспекте настоящая заявка представляет рекомбинантный MVA вектор, включающий гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный слитый белок HBV core-HBV pol.

Модифицированный вирус осповакцины Анкара ("MVA")

Искусственный аттенуированный модифицированный вирус осповакцины Анкара ("MVA") был получен путем 516 серийных пассажей на фибробластах куриных эмбрионов штамма вируса осповакцины Анкара (CVA) (см. обзор в Maug, A., et al. *Infection*. 3, 6-14 (1975)). В результате этих длительных пассажей в геноме полученного MVA вируса было deletировано около 31 т.п.н. его геномной последовательности, и поэтому он был описан как сильно ограниченный клеткой-хозяином для репликации в клетки птиц (Meyer, H. et al. *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991)). На различных моделях животных было показано, что полученный MVA был значительно авирулентным по сравнению с полностью репликация-компетентным исходным материалом (Maug, A. & Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34 (1978)).

Вирус MVA, полезный для осуществления изобретения, может включать, но не

ограничивается этим, MVA-572 (депонирован как ECACC V94012707 27 января 1994 г.); MVA-575 (депонирован как ECACC V00120707 7 декабря 2000 г.), MVA-I721 (указанный в Suter et al., Vaccine 2009) и ACAM3000 (депонирован как ATCC® PTA-5095 27 марта 2003 г.).

Более предпочтительно MVA, используемый в соответствии с изобретением, включает MVA-BN и производные MVA-BN. MVA-BN был описан в международной публикации PCT WO 02/042480. “Производные” MVA-BN относятся к вирусам, проявляющим по существу те же характеристики репликации, что и MVA-BN, как описано в настоящей заявке, но демонстрирующим различия в одной или нескольких частях их геномов.

MVA-BN, а также его производные являются неспособными к репликации, что означает неспособность к репродуктивной репликации *in vivo* и *in vitro*. Более конкретно, *in vitro*, MVA-BN или его производные были описаны как способные к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способные к репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCat (Boukamp et al. (1988), J. Cell Biol. 106:761-771), клеточной линии остеосаркомы кости человека 143B (ECACC, депозитарный № 91112502), клеточной линии почки эмбриона человека 293 (ECACC, депозитарный № 85120602) и клеточной линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa (ATCC, депозитарный № CCL-2). Кроме того, MVA-BN или его производные имеют коэффициент амплификации вируса по меньшей мере в два раза, более предпочтительно в три раза меньше, чем MVA-575 в клетках Hela и клеточных линиях HaCaT. Испытания и анализ этих свойств MVA-BN и его производных описаны в WO 02/42480 (патентная заявка США № 2003/0206926) и WO 03/048184 (патентная заявка США № 2006/0159699).

Термин “не способен к репродуктивной репликации” или “отсутствие способности к репродуктивной репликации” в клеточных линиях человека *in vitro*, как описано в предыдущих абзацах, описан, например, в WO 02/42480, который также раскрывает, как получить MVA, имеющий желаемые свойства, как указано выше. Этот термин применяется к вирусу, который имеет коэффициент амплификации вируса *in vitro* через 4 дня после заражения менее 1, определенный с использованием анализов, описанных в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893

Термин “неспособность к репродуктивной репликации” относится к вирусу, который имеет коэффициент амплификации вируса в клеточных линиях человека *in vitro*, как описано в предыдущих параграфах, через 4 дня после заражения менее 1. Анализы, описанные в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, применимы для определения степени амплификации вируса.

Амплификация или репликация вируса в клеточных линиях человека *in vitro*, как описано в предыдущих абзацах, обычно выражается как отношение вируса, продуцируемого из инфицированной клетки (выход), к количеству, первоначально используемому для заражения клетки в первом месте (вход), указываемое как

“коэффициент амплификации”. Коэффициент амплификации “1” определяет статус амплификации, когда количество вируса, продуцируемого из инфицированных клеток, совпадает с количеством, первоначально использованным для инфицирования клеток, что означает, что инфицированные клетки допускают вирусную инфекцию и размножение. Напротив, коэффициент амплификации менее 1, т.е. уменьшение выхода по сравнению с входящим уровнем, указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, аттенуацию вируса.

Преимущества вакцин на основе MVA включают их профиль безопасности, а также возможность крупномасштабного производства вакцин. Доклинические испытания показали, что MVA-BN демонстрирует превосходную аттенуацию и эффективность по сравнению с другими штаммами MVA (WO 02/42480). Дополнительным свойством штаммов MVA-BN является способность индуцировать практически одинаковый уровень иммунитета в режимах примирования вирусом осповакцины/стимулирования вирусом осповакцины по сравнению с режимами ДНК-примирования/стимулирования вирусом осповакцины.

Считается, что рекомбинантные MVA-BN вирусы, наиболее предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения, являются безопасными из-за их явного дефицита репликации в клетках млекопитающих и их хорошо установленной авирулентности. Кроме того, в дополнение к эффективности, практическую значимость может иметь возможность промышленного производства. Кроме того, вакцины на основе MVA могут доставлять несколько гетерологичных антигенов и позволяют одновременно индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет.

MVA векторы, полезные для изобретения, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в WO/2002/042480 и WO/2002/24224, соответствующие раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения MVA вектор(векторы) включают нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или несколько антигенных белков, выбранных из группы, состоящей из HBV core-антигена, HBV pol-антигена и слитого антигена HBV core-HBV pol.

Антигенный белок HBV может быть встроен в одну или несколько межгенных областей (IGR) MVA. В варианте осуществления изобретения IGR выбран из IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и IGR 148/149. В одном из вариантов осуществления менее 5, 4, 3 или 2 IGR рекомбинантного MVA включают гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты HBV core-антигена и/или HBV pol-антигена. Гетерологичные нуклеотидные последовательности могут, дополнительно или альтернативно, быть встроены в один или несколько природных сайтов делеции, в частности в основные сайты делеции I, II, III, IV, V или VI генома MVA. В одном из вариантов осуществления менее 5, 4, 3 или 2 природных сайтов делеции рекомбинантного MVA включают гетерологичные нуклеотидные

последовательности, кодирующие антигенные детерминанты HBV core-антигена и/или HBV pol-антигена.

Количество сайтов инсерции MVA, включающих гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты белка HBV, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более. В одном из вариантов осуществления гетерологичные нуклеотидные последовательности встроены в 4, 3, 2 или менее сайтов инсерции. Предпочтительно использую два сайта инсерции. В варианте осуществления изобретения используют три сайта инсерции. Предпочтительно рекомбинантный MVA включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, встроенных в 2 или 3 сайта инсерции.

Представленные в настоящей заявке рекомбинантные MVA вирусы могут быть получены обычными способами, известными в данной области. Способы получения рекомбинантных поксвирусов или встраивания экзогенных кодирующих последовательностей в поксвирусный геном хорошо известны специалистам в данной области. Например, стандартные методы молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, вестерн-блот-анализ, методы ОТ-ПЦР и ПЦР-амплификации, описаны в *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed.)* (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), а также методы работы и манипуляции с вирусами описаны в *Virology Methods Manual* (B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)). Точно так же методы и ноу-хау для работы, манипуляции с MVA и генноинженерные методы описаны в *Molecular Virology: A Practical Approach* (A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)) и *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Son, Inc. (1998) (см., например, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)).

Для получения различных рекомбинантных MVA, раскрытых в настоящей заявке, могут применяться разные способы. Последовательность ДНК, которая должна быть вставлена в вирус, может быть помещена в плазмидную конструкцию *E.coli*, в которую была вставлена ДНК, гомологичная участку ДНК MVA. Отдельно, вставляемая последовательность ДНК может быть лигирована с промотором. Связь промотор-ген может быть расположена в плазмидной конструкции так, чтобы связь промотор-ген с обоих концов фланкировалась ДНК, гомологичной последовательности ДНК, фланкирующей область ДНК MVA, содержащую несущественный локус. Полученная плазмидная конструкция может быть амплифицирована путем размножения в бактериях *E.coli* и выделена. Выделенная плазмида, содержащая генную последовательность ДНК, которая должна быть вставлена, может быть трансфицирована в клеточную культуру, например фибробласты куриных эмбрионов (CEF), одновременно культуру инфицируют MVA. Рекомбинация между гомологичной ДНК MVA в плазмиде и вирусным геномом, соответственно, может генерировать MVA, модифицированный присутствием чужеродных последовательностей ДНК.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, клетка подходящей клеточной культуры, например клетки CEF, может быть инфицирована поксвирусом. Затем инфицированная клетка может быть трансфицирована первым плазмидным вектором, включающим чужеродный или гетерологичный ген или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем элемента контроля экспрессии поксвируса. Как объяснено выше, плазмидный вектор также включает последовательности, способные направлять вставку экзогенной последовательности в выбранную часть поксвирусного генома. Необязательно, плазмидный вектор также содержит кассету, включающую маркерный и/или селектируемый ген, функционально связанный с поксвирусным промотором.

Подходящими маркерными или селекционными генами являются, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок, β -галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу, или другие маркеры. Использование селектируемых или маркерных кассет упрощает идентификацию и выделение генерированного рекомбинантного поксвируса. Однако рекомбинантный поксвирус также может быть идентифицирован методом ПЦР. Впоследствии, другая клетка может быть инфицирована рекомбинантным поксвирусом, полученным, как описано выше, и трансфицирована вторым вектором, включающим второй чужеродный или гетерологичный ген или гены. В случае, если этот ген должен быть введен в другой сайт инсерции поксвирусного генома, второй вектор также отличается поксвирус-гомологичными последовательностями, направляющими интеграцию второго чужеродного гена или генов в геном поксвируса. После того, как произошла гомологичная рекомбинация, рекомбинантный вирус, включающий два или более чужеродных или гетерологичных гена, может быть выделен. Для введения дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус стадии инфицирования и трансфекции можно повторять, используя рекомбинантный вирус, выделенный на предыдущих стадиях для инфицирования, и используя дополнительный вектор, включающий дополнительный чужеродный ген или гены для трансфекции.

Альтернативно, стадии инфицирования и трансфекции, как описано выше, являются взаимозаменяемыми, то есть подходящая клетка может быть сначала трансфицирована плазмидным вектором, включающим чужеродный ген, а затем инфицирована поксвирусом. В качестве дополнительной альтернативы, также возможно ввести каждый чужеродный ген в разные вирусы, ко-инфицировать клетку всеми полученными рекомбинантными вирусами и скринировать на рекомбинант, включающий все чужеродные гены. Третий вариант включает лигирование генома ДНК и чужеродных последовательностей *in vitro* и восстановление рекомбинантного ДНК генома вируса осповакцины с использованием хелперного вируса. Четвертой альтернативой является гомологичная рекомбинация в *E.coli* или другом бактериальном виде между геномом вируса осповакцины, таким как MVA, клонированным в виде бактериальной искусственной хромосомы (BAC), и линейной чужеродной последовательностью, фланкированной последовательностями ДНК, гомологичными последовательностям,

фланкирующим желаемый сайт интеграции в геноме вируса осповакцины.

Гетерологичный ген HBV (например, HBV core-антиген, HBV pol-антиген и/или слитый белок HBV core-HBV pol) может находиться под контролем (т.е. функционально связан с) одного или нескольких поксвирусных промоторов. В одном варианте осуществления изобретения поксвирусный промотор представляет собой Pr7.5промотор, гибридный ранний/поздний промотор или PrS промотор, PrS5E промотор, синтетический или природный ранний или поздний промотор или АТІ промотор вируса осповакцины.

Композиции, иммуногенные комбинации и вакцины

Настоящая заявка также относится к композициям, иммуногенным комбинациям, более конкретно наборам, и вакцинам, включающим один или несколько HBV антигенов, полинуклеотидов, и/или векторов, кодирующих один или несколько антигенов HBV в соответствии с изобретением. Любой из HBV антигенов, полинуклеотидов (включая РНК и ДНК) и/или векторов по изобретению, описанных в настоящей заявке, можно использовать в композициях, иммуногенных комбинациях или наборах и вакцинах по изобретению.

В общем аспекте, настоящая заявка представляет композицию, включающую выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, или антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, вектор, включающий выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, и/или выделенный или не встречающийся в природе полипептид, кодируемый выделенной или не встречающейся в природе молекулой нуклеиновой кислоты.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), включающую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; и выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК

или РНК), включающую полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Кодированные последовательности для усеченного HBV core-антигена и HBV Pol-антигена могут присутствовать в одной и той же выделенной или не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) или в двух разных выделенных или не встречающихся в природе молекулах нуклеиновых кислот (ДНК или РНК).

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; и вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий HBV pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Вектор, включающий кодирующую последовательность для усеченного корового антигена HBV, и вектор, включающий кодирующую последовательность для HBV pol-антигена, может представлять собой один и тот же вектор, или это могут быть два разных вектора.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2, функционально связанный с HBV Pol-антигеном, включающим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4, или наоборот. Предпочтительно, слитый белок дополнительно включает линкер, который функционально связывает усеченный коровый антиген HBV с HBV Pol-антигеном, или наоборот. Предпочтительно, линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенный или не встречающийся в природе усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенный или не встречающийся в природе HBV Pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенный или не встречающийся в природе усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; и выделенный или не встречающийся в природе HBV Pol-антиген, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления изобретения композиция включает выделенный или не встречающийся в природе слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2, функционально связанный с HBV Pol-антигеном, включающим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4, или наоборот. Предпочтительно, слитый белок дополнительно включает линкер, который функционально связывает усеченный коровый антиген HBV с HBV Pol-антигеном, или наоборот. Предпочтительно, линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В другом общем аспекте настоящая заявка относится к иммуногенной комбинации или набору, включающему полинуклеотиды, экспрессирующие усеченный коровый антиген HBV и HBV pol-антиген в соответствии с вариантами осуществления изобретения. В иммуногенных комбинациях или наборах по изобретению можно использовать любые полинуклеотиды и/или векторы, кодирующие коровый и pol антигены HBV по изобретению, описанные в настоящей заявке.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, полинуклеотиды в вакцинной комбинации или наборе могут быть связаны или разделены таким образом, что антигены HBV, экспрессируемые из таких полинуклеотидов, слиты вместе или продуцируются в виде отдельных белков, независимо от того, экспрессируются ли они из одного и того же или разных полинуклеотидов. В одном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в отдельных вирусных векторах, используемых в комбинации либо в одной и той же, либо в отдельных композициях, таким образом, что экспрессированные белки также являются отдельными белками, но используются в комбинации. В другом варианте осуществления антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут быть экспрессированы из одного и того же вирусного вектора, таким образом, образуется слитый HBV core-pol антиген. Необязательно, коровый и pol антигены могут быть соединены или слиты вместе посредством короткого

линкера. Альтернативно, антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут быть экспрессированы независимо из одного вектора с использованием рибосомального сайта проскальзывания (также известного как сайт цис-гидролазы) между последовательностями, кодирующими коровый и pol антиген. Эта стратегия приводит к бицистронному экспрессирующему вектору, в котором отдельные коровый и pol антигены продуцируются из одного мРНК транскрипта. Коровый и pol антигены, продуцируемые из такого бицистронного вектора экспрессии, могут иметь дополнительные N или C-концевые остатки в зависимости от упорядочения кодирующих последовательностей на мРНК транскрипте. Примеры рибосомальных сайтов проскальзывания, которые можно использовать для этой цели, включают, но не ограничиваются этим, сайт проскальзывания FA2 из вируса ящура (FMDV). Другая возможность состоит в том, что антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться независимо из двух отдельных векторов, один из которых кодирует коровый антиген HBV, а другой HBV pol-антиген.

В предпочтительном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в отдельных вирусных векторах. Предпочтительно, отдельные векторы присутствуют в одной и той же композиции.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуногенная комбинация или набор включает: первый вектор, предпочтительно ДНК плазмиду или вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; и второй вектор, предпочтительно ДНК плазмиду или вирусный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения первый вектор представляет собой первую ДНК плазмиду, а второй вектор представляет собой вторую ДНК плазмиду. Каждая из первой и второй ДНК плазмид включает ориджин репликации, предпочтительно pUC ORI SEQ ID NO: 21, и кассету резистентности к антибиотикам, предпочтительно включающую кодон-оптимизированный Kan^r (резистентность к Канамицину) ген, имеющий полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22, предпочтительно под контролем bla промотора, например bla промотора, показанного в SEQ ID NO: 24. Каждая из первой и второй ДНК плазмид независимо дополнительно включает по меньшей мере одну из промоторной последовательности, энхансерной последовательности и полинуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную пептидную последовательность, функционально связанной с первой полинуклеотидной последовательностью или второй полинуклеотидной последовательностью. Предпочтительно, каждая из первой и второй ДНК плазмид включает вышележащую последовательность, функционально связанную с

первым полинуклеотидом или вторым полинуклеотидом, где вышележащая последовательность включает, от 5' конца к 3' концу, промоторную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность SEQ ID NO: 8 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Каждая из первой и второй ДНК плазмид также может включать сигнал полиаденилирования, расположенный после кодирующей последовательности антигена HBV, такой как bGH сигнал полиаденилирования SEQ ID NO: 9.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения первый вектор представляет собой первый вирусный вектор, а второй вектор представляет собой второй вирусный вектор. Предпочтительно, каждый из первого и второго вирусного вектора представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно Ad26 или Ad35 вектор, включающий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий HBV pol-антиген или усеченный коровый антиген HBV по изобретению; вышележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим HBV антиген, включающую, от 5' конца к 3' концу, промоторную последовательность, предпочтительно CMV промоторную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI SEQ ID NO: 15 или тройственную энхансерную последовательность SEQ ID NO: 8, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, предпочтительно сигнал цистатина S, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и нижележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим HBV антиген, включающую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 16.

В конкретном варианте осуществления изобретения первый вектор представляет собой первый вирусный вектор, а второй вектор представляет собой второй вирусный вектор. Предпочтительно, каждый из первого и второго вирусного вектора представляет собой MVA вектор, включающий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий HBV pol-антиген и/или усеченный коровый антиген HBV по изобретению; вышележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, включающую, от 5' конца к 3' концу, промоторную последовательность, предпочтительно PrMVA13.5 длинную промоторную последовательность SEQ ID NO: 25 или PrHyb промоторную последовательность SEQ ID NO: 26, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, предпочтительно сигнал цистатина S, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и нижележащую последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген

HBV, включающую сигнал полиаденилирования или сигнал преждевременной терминации, где сигнал преждевременной терминации имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:28, или где сигнал полиаденилирования выбран из SV40 сигнала полиаденилирования, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, или bGH сигнала полиаденилирования, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, предпочтительно нижележащая последовательность, функционально связанная с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, представляет собой сигнал преждевременной терминации, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления изобретения обеспечивается вакцинная комбинация, включающая (а) первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4, где антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; и (b) вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающего вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, где антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; где первую композицию вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а вторую композицию вводят субъекту-человеку один или несколько раз для стимулирования иммунного ответа.

В одном варианте осуществления изобретения обеспечивается вакцинная комбинация, включающая (а) первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4, где антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; и (b) вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, где антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; где первую композицию вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а вторую композицию вводят субъекту-человеку один или несколько раз для стимулирования иммунного ответа.

В тех вариантах осуществления изобретения, в которых иммуногенная комбинация

включает первый вирусный вектор и второй вирусный вектор, количество каждого из первого и второго векторов конкретно не ограничивается. Например, первый вирусный вектор и второй вирусный вектор могут присутствовать в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, таком как 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно, первый и второй вирусные векторы присутствуют в соотношении 1:1 по массе.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут включать дополнительные полинуклеотиды или векторы, кодирующие дополнительные антигены HBV и/или дополнительные антигены HBV или их иммуногенные фрагменты. Однако в конкретных вариантах осуществления композиции и иммуногенные комбинации по изобретению не включают определенные антигены.

В конкретном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация или набор по изобретению не включает HBsAg или полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBsAg.

В другом конкретном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация или набор по изобретению не включает HBV L белок или полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBV L белок.

Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения композиция или иммуногенная комбинация по изобретению не включает оболочечный белок HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую оболочечный белок HBV.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению также могут включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным и не должен мешать эффективности активного ингредиента. Фармацевтически приемлемые носители могут включать один или несколько эксципиентов, таких как связующие, дезинтегранты, агенты, вызывающие набухание, суспендирующие агенты, эмульгаторы, смачивающие агенты, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутримышечного (например, кишечного), интраназального или интраперитонеального пути. Для жидких инъектируемых препаратов, например, суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т.п. Для твердых пероральных препаратов, например, порошков, капсул, каплет, гелевых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, смазывающие вещества, связующие, разрыхлители и т.п. Для назальных спреев/ингаляционных смесей водный раствор/суспензия может включать воду, гликоли, масла, смягчающие вещества, стабилизаторы, смачивающие агенты, консерванты, ароматические вещества, отдушки и т.п. в качестве подходящих носителей и добавок.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут быть

сформулированы в любом веществе, подходящем для введения субъекту, чтобы облегчить введение и повысить эффективность, включая, но не ограничиваясь этим, пероральное (энтеральное) введение и парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутрискожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции для применения также могут быть сформулированы для других путей введения, включая трансмукозальное, глазное, ректальное введение, долгосрочную имплантацию, сублингуальное введение, введение под язык, из слизистой оболочки полости рта, минуя порталное кровообращение, ингаляцию или интраназальное введение.

В предпочтительном варианте осуществления композиции и иммуногенные комбинации по изобретению сформулированы для парентеральной инъекции, предпочтительно подкожной, внутрискожной инъекции или внутримышечной инъекции, более предпочтительно внутримышечной инъекции.

В соответствии с вариантами осуществления, композиции и иммуногенные комбинации для введения обычно включают забуференный раствор в фармацевтически приемлемом носителе, например водном носителе, такой как забуференный физиологический раствор и т.п., например, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Композиции и иммуногенные комбинации могут также содержать фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, таким как регулирующие pH и буферные агенты. В типичном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация по изобретению, включающая плазмидную ДНК, может содержать фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Плазмидная ДНК может присутствовать в концентрации, например, от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, такой как 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл или 5 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут быть сформулированы в виде вакцины (также называемой “иммуногенной композицией”) в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунных реакций. Оптимальные соотношения каждого компонента в композиции, в свете настоящего раскрытия, можно определить методами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

В варианте осуществления изобретения адъювант включают в композицию или иммуногенную комбинацию по изобретению или вводят совместно с композицией или иммуногенной комбинацией по изобретению. Использование адъюванта является необязательным, и он может дополнительно усиливать иммунные ответы, когда композицию используют для целей вакцинации. Адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композиции в соответствии с изобретением, предпочтительно должны быть такими, которые являются потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для людей. Адъювант может представлять собой небольшую молекулу или антитело, включая, но не ограничиваясь этим, ингибиторы

иммунных контрольных точек (например, анти-PD1, анти-RIM-3 и т.д.), ингибиторы toll-подобного рецептора, ингибиторы RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные IRF3 и генетические адъюванты IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL-12 и IL-7-hyFc.

Варианты осуществления изобретения также относятся к способам получения композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению. В соответствии с вариантами осуществления, способ получения композиции или иммуногенной комбинации включает смешивание выделенного полинуклеотида, кодирующего антиген, вектор и/или полипептид HBV, с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Специалистам в данной области техники должны быть известны традиционные методы, используемые для получения таких композиций.

Способы индукции/усиления иммунного ответа

В другом общем аспекте настоящая заявка относится к способу индуцирования иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту иммунологически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению. Любую из композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению, описанных в настоящей заявке, можно использовать в способах по изобретению.

Настоящая заявка обеспечивает улучшенный способ примирования и стимулирования иммунного ответа на антигенный белок HBV или его иммуногенный полипептид у субъекта-человека с использованием MVA вектора в комбинации с аденовирусным вектором.

В соответствии с общим аспектом изобретения, способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека включает:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора по изобретению; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

В соответствии с другим общим аспектом изобретения, способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека включает:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора по изобретению;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

В соответствии с другим общим аспектом изобретения, способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека включает:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей первую не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBV рол-антиген по изобретению, и иммунологически эффективное количество второй плазмиды, включающей вторую не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV по изобретению; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

В соответствии с другим общим аспектом изобретения, способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека включает:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по изобретению; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей первую не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBV рол-антиген по изобретению, и иммунологически эффективное количество второй плазмиды, включающей вторую не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV по изобретению;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

Первую композицию вводят субъекту-человеку, нуждающемуся в этом для примирования иммунного ответа, а вторую композицию вводят субъекту-человеку, нуждающемуся в этом для стимулирования иммунного ответа. Примирование и стимулирование иммунного ответа могут, например, усиливать иммунный ответ.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигенного белка HBV у субъекта-человека.

Предпочтительно, усиленный иммунный ответ дополнительно включает усиленный CD4⁺ ответ или усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против HBV антигенного белка у субъекта-человека. Усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ, генерируемый способом в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, может представлять собой, например, повышение или индукцию доминантного CD4⁺ Т-клеточного ответа против антигенного белка HBV и/или увеличение количества или индукцию полифункциональных CD4⁺ Т-клеток, специфических в отношении антигенного белка HBV, у субъекта-человека. Полифункциональные CD4⁺ Т-клетки экспрессируют более одного цитокина, например два или более из IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа. Усиленный CD8⁺ Т-

клеточный ответ, генерируемый способом в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, может представлять собой, например, увеличение количества или индукцию полифункциональных CD8⁺ Т-клеток, специфических в отношении антигенного белка HBV, у субъекта-человека.

Более предпочтительно, усиленный иммунный ответ, достигаемый способом в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, включает усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ, усиленный ответ антител и усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигенного белка HBV у субъекта-человека.

В контексте настоящей заявки термин “инфекция” относится к внедрению в организм хозяина вызывающего заболевание агента. Возбудитель заболевания считается “инфекционным”, когда он способен проникать в организм хозяина и реплицироваться или размножаться в организме хозяина. Примеры инфекционных агентов включают вирусы, например, HBV и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибы, простейшие и т.п. “Инфекция HBV” конкретно относится к инвазии организма-хозяина, такого как клетки и ткани организма-хозяина, вирусом гепатита В (HBV). В соответствии с вариантами осуществления изобретения, “индукция иммунного ответа” при использовании со ссылкой на способы, описанные в настоящей заявке, означает способ, вызывающий желаемый иммунный ответ или эффект у субъекта, нуждающегося в этом, против HBV или инфекции HBV. “Индукция иммунного ответа” также включает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения против патогенного агента, т.е. HBV. В контексте настоящей заявки термин “терапевтический иммунитет” или “терапевтический иммунный ответ” означает, что вакцинированный субъект, инфицированный HBV, способен контролировать инфекцию патогенным агентом, т.е. HBV, против которого осуществлена вакцинация. В одном варианте осуществления “индукция иммунного ответа” означает создание иммунитета у субъекта, нуждающегося в этом, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как инфекция HBV. В варианте осуществления изобретения “индукция иммунного ответа” относится к вызову или улучшению клеточного иммунитета, например Т-клеточного ответа, против HBV. В варианте осуществления изобретения “индукция иммунного ответа” относится к вызову или улучшению гуморального иммунного ответа против HBV. В варианте осуществления изобретения “индукция иммунного ответа” относится к вызову или улучшению клеточного и гуморального иммунного ответа против HBV.

Как правило, композиции и иммуногенные комбинации в соответствии с вариантами осуществления вводят с терапевтической целью генерирования иммунного ответа против HBV после заражения HBV или развития симптомов, характерных для HBV инфекции, т.е. для терапевтической вакцинации.

В контексте настоящей заявки термин “иммуногенно эффективное количество” или “иммунологически эффективное количество” означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для индукции желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте

осуществления иммунологически эффективное количество означает количество, достаточное для индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления иммунологически эффективное количество означает количество, достаточное для создания иммунитета у субъекта, нуждающегося в этом, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как HBV инфекция. Иммунологически эффективное количество может варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, масса тела, состояние здоровья и т.д.; конкретное применение, например обеспечение защитного иммунитета или терапевтического иммунитета; и конкретное заболевание, например вирусная инфекция, для которой желателен иммунитет. Иммунологически эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области с учетом настоящего раскрытия.

В конкретных вариантах осуществления изобретения иммунологически эффективное количество относится к количеству композиции или иммуногенной комбинации, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести HBV инфекции или связанного с ней симптома; (ii) уменьшение продолжительности HBV инфекции или связанного с ней симптома; (iii) предотвращение прогрессирования HBV инфекции или связанного с ней симптома; (iv) вызов регрессии HBV инфекции или связанного с ней симптома; (v) предотвращение развития или возникновения HBV инфекции или связанного с ней симптома; (vi) предотвращение рецидива HBV инфекции или связанного с ней симптома; (vii) снижение необходимости в госпитализации субъекта с HBV инфекцией; (viii) сокращение продолжительности госпитализации субъекта, инфицированного HBV; (ix) увеличение выживаемости субъекта с HBV инфекцией; (x) устранение HBV инфекции у субъекта; (xi) ингибирование или уменьшение репликации HBV у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

В других конкретных вариантах осуществления иммунологически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения уровней HbsAg, соответствующих эволюции до клинической сероконверсии; достижения устойчивого клиренса HBsAg, ассоциированного с уменьшением количества инфицированных гепатоцитов иммунной системой субъекта; индукции HBV-антиген-специфических активированных Т-клеточных популяций; и/или достижения постоянной потери HBsAg в течение 12 месяцев. Примеры целевого индекса включают более низкий уровень HBsAg ниже порога 500 копий HBsAg IU и/или более высокие количества CD8.

В качестве общего руководства, иммунологически эффективное количество, при использовании в контексте вирусного вектора, может находиться в пределах от около 1×10^7 вирусных частиц на дозу до около 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. Иммунологически эффективное количество может составлять около 1×10^{10} , около 2×10^{10} , около 3×10^{10} , около 4×10^{10} , около 5×10^{10} , около 6×10^{10} , около 7×10^{10} , около 8

$\times 10^{10}$, около 9×10^{10} , около 1×10^{11} , около 2×10^{11} , около 3×10^{11} , около 4×10^{11} , около 5×10^{11} или около 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. Иммунологически эффективное количество может быть из одного вектора или из нескольких векторов. Иммунологически эффективное количество можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, например в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композициях (например, таблетки, капсулы или инъекционные препараты), где введение множества капсул или инъекций вместе обеспечивает субъекту иммунологически эффективное количество. Также можно вводить иммунологически эффективное количество субъекту и затем вводить другую дозу иммунологически эффективного количества тому же субъекту в так называемом прайм-буст режиме. Эта общая концепция прайм-буст режима хорошо известна специалистам в области вакцин. При необходимости к режиму могут быть добавлены дополнительные бустерные дозы.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, субъекту можно вводить иммуногенную комбинацию, включающую два вирусных вектора, например, первый вирусный вектор, кодирующий коровый антиген HBV, и второй вирусный вектор, кодирующий HBV pol-антиген, путем смешивания обоих вирусных векторов и доставки смеси в один анатомический участок. Альтернативно, можно осуществить две отдельные иммунизации, каждая из которых доставляет один вектор экспрессии. В таких вариантах осуществления, независимо от того, вводятся ли оба вирусных вектора за одну иммунизацию в виде смеси или за две отдельные иммунизации, первый вирусный вектор и второй вирусный вектор можно вводить в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, таком как 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно, первой и второй вирусный векторы вводят в соотношении 1:1 по массе.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами по изобретению, представляет собой субъекта, инфицированного HBV, в частности субъекта, имеющего хроническую HBV инфекцию. Острая HBV инфекция характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, дополненной последующим широким адаптивным ответом (например, HBV-специфические Т-клетки, нейтрализующие антитела), который обычно приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. В отличие от этого, такие ответы ухудшаются или уменьшаются вследствие высокой вирусной и антигенной нагрузки, например, оболочечные белки HBV продуцируются в избытке и могут высвобождаться в субвирусных частицах в 1000-кратном избытке относительно инфекционного вируса.

Хроническая HBV инфекция описывается в фазах, характеризующихся вирусной нагрузкой, уровнем ферментов печени (некрвоспалительная активность), HBeAg или HBsAg нагрузкой или присутствием антител к этим антигенам. Уровни кзкДНК остаются относительно постоянными при примерно от 10 до 50 копий на клетку, хотя виремия может значительно варьироваться. Персистенция видов кзкДНК приводит к хроническому

состоянию. Более конкретно, фазы хронической HBV инфекции включают: (i) иммуннотолерантную фазу, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальными или минимально повышенными ферментами печени; (ii) HBeAg-положительную фазу иммунной активации, в которой наблюдаются более низкие или снижающиеся уровни вирусной репликации со значительно повышенными ферментами печени; (iii) неактивную фазу с переносом HbsAg, которая представляет собой слабое репликативное состояние с низкими вирусными нагрузками и нормальными уровнями ферментов печени в сыворотке, которые могут следовать за сероконверсией HBeAg; и (iv) HBeAg-отрицательную фазу, в которой вирусная репликация происходит периодически (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровней ферментов печени, типичны мутации в прекоровом и/или базальном коровом промоторе, так что HBeAg не продуцируется инфицированной клеткой.

В контексте настоящей заявки термин “хроническая HBV инфекция” относится к субъекту, имеющему обнаруживаемое присутствие HBV в течение более 6 месяцев. Субъект, имеющий хроническую HBV инфекцию, может находиться в любой фазе хронической HBV инфекции. В предпочтительных вариантах осуществления хроническая HBV инфекция, указываемая в настоящей заявке, соответствует определению, опубликованному Disease Control and Prevention (CDC), согласно которому хроническая HBV инфекция характеризуется следующими данными лабораторных анализов: (i) отрицательный на IgM антитела к коровому антигену гепатита В (IgM анти-HBc) и положительный на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), е-антиген гепатита В (HBeAg) или тест на нуклеиновые кислоты на ДНК вируса гепатита В, или (ii) положительный на HBsAg или тест на нуклеиновые кислоты на ДНК HBV, или положительный на HBeAg два раза с интервалом по меньшей мере 6 месяцев.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или иммуногенной комбинации, которое является достаточным для лечения хронической HBV инфекции.

В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий хроническую HBV инфекцию, проходит лечение нуклеозидным аналогом (NUC) и является NUC-супрессированным. Используемый в настоящей заявке термин “NUC-супрессированный” относится к субъекту, имеющему неопределяемый вирусный уровень HBV и стабильные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примеры лечения нуклеозидным/нуклеотидным аналогом включают ингибиторы HBV-полимеразы, такие как энтакавир и тенофовир. Предпочтительно, субъект, имеющий хроническую HBV инфекцию, не имеет прогрессирующего фиброза или цирроза печени. Такой субъект обычно имеет METAVIR оценку менее 3 и результат фибросканирования менее 9 кПа. METAVIR оценка представляет собой систему оценки, которая обычно используется для оценки степени воспаления и фиброза путем гистопатологической оценки при биопсии печени у пациентов с гепатитом В. Система оценки присваивает два стандартизированных балла: один отражает степень воспаления, а другой отражает

степень фиброза.

Считается, что устранение или уменьшение хронического HBV может позволить на раннем этапе предотвратить тяжелое заболевание печени, включая вирусный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, способы по изобретению также можно использовать в качестве терапии для лечения HBV-индуцируемых заболеваний. Примеры HBV-индуцируемых заболеваний включают, но не ограничиваются этим, цирроз печени, рак (например, гепатоцеллюлярная карцинома) и фиброз, в частности, прогрессирующий фиброз, характеризующийся METAVIR оценкой 3 или выше. В таких вариантах осуществления иммуногенно-эффективное количество представляет собой количество, достаточное для достижения постоянной потери HBsAg в течение 12 месяцев и значительного снижения клинического заболевания (например, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и т.д.).

Способы в соответствии с вариантами осуществления изобретения дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, другого иммуногенного средства (такого как другой HBV-антиген или другой антиген) или другого анти-HBV средства (такого как нуклеозидный аналог или другое анти-HBV средство) в комбинации с композицией по изобретению.

Способы доставки

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению можно вводить субъекту любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего изобретения, включая, но не ограничиваясь этим, парентеральное введение (например, внутримышечная, подкожная, внутривенная или внутрикожная инъекция), пероральное введение, трансдермальное введение и назальное введение. Предпочтительно композиции и иммуногенные комбинации вводят парентерально (например, путем внутримышечной инъекции или внутрикожной инъекции) или трансдермально.

В некоторых вариантах осуществления, в которых композиция или иммуногенная комбинация включает один или несколько вирусных векторов, введение можно осуществлять путем инъекции через кожу, например, внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции. Внутримышечную инъекцию можно сочетать с электропорацией, то есть применением электрического поля для облегчения доставки ДНК плазмид к клеткам. В контексте настоящей заявки термин “электропорация” относится к использованию импульса трансмембранного электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране. Во время электропорации *in vivo* к клеткам прикладывают электрические поля соответствующей величины и продолжительности, индуцируя транзиторное состояние повышенной проницаемости клеточной мембраны, обеспечивая, таким образом, возможность клеточного поглощения молекул, неспособных самостоятельно проходить через клеточные мембраны. Создание таких пор электропорацией облегчает прохождение биомолекул, таких как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства и т.д., с одной стороны клеточной мембраны на другую. Было показано, что

электропорация *in vivo* для доставки ДНК-вакцин значительно увеличивает поглощение плазмиды клетками-хозяевами, а также приводит к легкому до умеренного воспаления в месте инъекции. В результате эффективность трансфекции и иммунный ответ значительно улучшаются (например, до 1000 раз и 100 раз соответственно) при внутрикожной или внутримышечной электропорации по сравнению с обычной инъекцией.

В типичном варианте осуществления электропорацию сочетают с внутримышечной инъекцией. Однако также возможно комбинировать электропорацию с другими формами парентерального введения, например, внутрикожной инъекцией, подкожной инъекцией и т.д.

Введение композиции, иммуногенной комбинации или вакцины по изобретению посредством электропорации можно осуществить с использованием устройств электропорации, которые могут быть сконфигурированы для доставки в желаемую ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для образования обратимых пор в клеточных мембранах. Устройство электропорации может включать компонент электропорации и комплект электродов или блок ручного управления. Компонент электропорации может включать один или несколько из следующих компонентов устройств для электропорации: контроллер, генератор сигналов тока, тестер импеданса, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент сообщения о состоянии, коммуникационное отверстие, компонент памяти, источник питания и переключатель питания. Электропорацию можно осуществить с использованием устройства для электропорации *in vivo*. Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению, в частности, содержащих ДНК-плазмиды, включают CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA), электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) систему доставки Tri-Grid™ (Ichor Medical Systems, Inc., San Diego, CA 92121) и устройства, описанные в патенте США № 7664545, патенте США № 8209006, патенте США № 9452285, патенте США № 5273525, патенте США № 6110161, патенте США № 6261281, патенте США № 6958060 и в патенте США № 6939862, патенте США № 7328064, патенте США № 6041252, патенте США № 5873849, патенте США № 6278895, патенте США № 6319901, патенте США № 6912417, патенте США № 8187249, патенте США № 9364664, патенте США № 9802035, патенте США № 6117660 и публикации международной патентной заявки WO2017172838, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте. Также для доставки композиций и иммуногенных комбинаций настоящей заявкой предусматривается использование импульсного электрического поля, например, как описано в патенте США № 6697669, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

В других вариантах осуществления, в которых композиция или иммуногенная комбинация включает одну или несколько ДНК плазмид, способ введения является чрескожным. Чрескожное введение может сочетаться с эпидермальной абразией кожи для облегчения доставки ДНК плазмид к клеткам. Например, дерматологический пластырь

можно использовать для эпидермальной абразии кожи. После удаления дерматологического пластыря композицию или иммуногенную комбинацию можно нанести на поврежденную кожу.

Способы доставки не ограничиваются вышеописанными вариантами осуществления, и можно использовать любые средства для внутриклеточной доставки. Другие способы внутриклеточной доставки, предусматриваемые способами по изобретению, включают, но не ограничиваются этим, липосомальную инкапсуляцию, наночастицы и т.д.

Адьюванты

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ индуцирования иммунного ответа против HBV дополнительно включает введение адьюванта. Термины "адьювант" и "иммуностимулятор" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и определяются как одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адьювант используется для усиления иммунного ответа на антигены HBV и антигенные полипептиды HBV по изобретению.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, адьювант может присутствовать в иммуногенной комбинации или композиции по изобретению, или его можно вводить в отдельной композиции. Адьювант может представлять собой небольшую молекулу или антитело. Примеры адьювантов, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, анти-PD1, анти-RIM-3 и т.д.), ингибиторы toll-подобного рецептора, ингибиторы RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные IRF3 и генетические адьюванты IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адьювант FLT3L, генетический адьювант IL-12 и IL-7-hyFc.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению также можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним другим анти-HBV средством. Примеры анти-HBV средств, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, малые молекулы, антитела и/или CAR-T-терапии, которые функционируют в качестве ингибиторов капсида, ингибиторы TLR, ингибиторы кзкДНК, ингибиторы HBV-полимеразы (например, энтекавир и тенофовир) и/или ингибиторы иммунных контрольных точек и т.д. Такие анти-HBV средства можно вводить с композициями и иммуногенными комбинациями по изобретению одновременно или последовательно.

Способы прайм/буст иммунизации

Варианты осуществления изобретения также предусматривают введение иммунологически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации субъекту и затем введение другой дозы иммунологически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации тому же субъекту в так называемом прайм-буст режиме. Таким образом, в одном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация по изобретению представляет собой примирующую вакцину, используемую для примирования иммунного ответа. В другом варианте осуществления

композиция или иммуногенная комбинация по изобретению представляет собой бустерную вакцину, используемую для стимулирования иммунного ответа. Примирующие и бустерные вакцины в соответствии с вариантами осуществления можно использовать в способах по изобретению, описанных в настоящей заявке. Эта общая концепция прайм-буст режима хорошо известна специалистам в области вакцин. Любую из композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению можно использовать в качестве примирующих и/или бустерных вакцин для примирования и/или усиления иммунного ответа против HBV.

В соответствии с вариантами осуществления, композицию или иммуногенную комбинацию по изобретению можно вводить по меньшей мере один раз для первичной иммунизации. Композицию или иммуногенную комбинацию можно повторно вводить для усиления иммунизации. Необязательно, к режиму иммунизации при необходимости можно добавить стимулирующие введения композиции или вакцинной комбинации. Адъювант может присутствовать в композиции по изобретению, используемой для усиления иммунизации, присутствовать в отдельной композиции для введения вместе с композицией или иммуногенной комбинацией по изобретению для усиления иммунизации, или его можно вводить как таковой в качестве бустер-иммунизации. В тех вариантах осуществления, в которых адъювант включен в режим иммунизации, адъювант предпочтительно используют для бустер-иммунизации.

Иллюстративный и не ограничивающий пример прайм-буст режима включает введение однократной дозы иммунологически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению субъекту для примирования иммунного ответа; а затем введение другой дозы иммунологически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению для стимуляции иммунного ответа, при этом бустер-иммунизацию первый раз вводят примерно через одну - двенадцать недель (1-12), две - двенадцать недель (2-12), примерно две - десять недель (2-10), примерно две - шесть недель (2-6), предпочтительно, примерно через четыре недели после первоначального введения примирующей иммунизации, предпочтительно примерно через восемь недель после первоначального введения примирующей иммунизации. В одном из вариантов осуществления бустер-иммунизацию осуществляют по меньшей мере через одну неделю после первичной иммунизации. В одном из вариантов осуществления бустер-иммунизацию осуществляют по меньшей мере через две недели после примирующей иммунизации. Необязательно, приблизительно через 10-14 недель, предпочтительно через 12 недель, после первоначального введения примирующей иммунизации вводят дополнительную бустер-иммунизацию композиции или иммуногенной комбинации или другого адъюванта.

Наборы

Настоящая заявка также представляет набор, включающий иммуногенную комбинацию по изобретению. Набор может включать первый полинуклеотид и второй полинуклеотид в отдельных композициях, или набор может включать первый

полинуклеотид и второй полинуклеотид в одной композиции. Набор может дополнительно включать один или несколько адъювантов или иммуностимуляторов и/или других анти-HBV средств.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против HBV при введении в организм животного или человека можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием различных анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание методов, доступных для оценки возникновения и активации иммунного ответа, см., например, в Coligan et al. (1992 и 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета можно осуществить путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, в том числе происходящих из CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, количественное определение IL-10 или IFN-гамма-продуцирующих клеток методом ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, анализы Т-клеточной пролиферации классическим методом поглощения [3H] тимидина), путем анализа на антиген-специфические Т-лимфоциты у сенсibilизированного субъекта (например, пептид-специфический лизис в анализе цитотоксичности и т. д.)

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определить по связыванию антител и/или конкуренции при связывании (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, можно измерить при помощи иммуноферментного анализа (ELISA). Иммунные ответы также можно измерить при помощи анализа нейтрализующих антител, где нейтрализация вируса определяется как потеря инфекционности посредством реакции/ингибирования/нейтрализации вируса специфическим антителом. Иммунный ответ также можно измерить с использованием анализа антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Варианты осуществления

В настоящей заявке также представлены следующие не ограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающий не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4.

Вариант осуществления 2 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 1, где антиген HBV-полимераза не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 3 представляет собой MVA вектор варианта

осуществления 1 или 2, где антиген HBV-полимераза может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 4 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-3, где антиген HBV-полимераза включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 5 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-4, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой.

Вариант осуществления 6 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 5, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 7 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-6, где первая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 8 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 7, где первая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 9 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-8, дополнительно включающий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 10 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 9, где вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 11 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 10, где вторая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 12 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 9-11, где вторая полинуклеотидная последовательность дополнительно включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с усеченным коровым антигеном HBV.

Вариант осуществления 13 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 12, где сигнальная последовательность включает аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 14 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 9-13, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности кодируют слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой.

Вариант осуществления 15 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 14, где слитый белок включает усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой через линкер.

Вариант осуществления 16 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 15, где линкер включает аминокислотную последовательность (AlaGly) $_n$ и n представляет собой целое число от 2 до 5, предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 17 представляет собой MVA вектор варианта осуществления 16, где слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 18 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 14-17, где слитый белок дополнительно включает сигнальную последовательность, предпочтительно сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, более предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 19 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-18, дополнительно включающий по меньшей мере одну промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, предпочтительно по меньшей мере одна промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25 и/или SEQ ID NO: 26, и дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерной последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательности полиаденилирования SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 20 представляет собой MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-19, где не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты не кодируют HBV антиген, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена Гепатита В (HBsAg), оболочечного (Env) антигена HBV и L-белкового антигена HBV.

Вариант осуществления 21 представляет собой MVA вектор, включающий первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, где первая полинуклеотидная последовательность также кодирует сигнальную последовательность,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и где первая полинуклеотидная последовательность дополнительно включает промоторную последовательность, включающую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26, и вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где вторая полинуклеотидная последовательность также кодирует сигнальную последовательность, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и где вторая полинуклеотидная последовательность дополнительно включает промоторную последовательность, включающую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25.

Вариант осуществления 22 представляет собой композицию, включающую MVA вектор любого из вариантов осуществления 1-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека, включающий (а) введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; и (b) введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора любого из вариантов осуществления 1-21; для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ варианта осуществления 23, где антиген HBV-полимераза первой композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ варианта осуществления 23 или 24, где первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-25, где антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-26, где антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-27, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой композиции.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ варианта осуществления 28, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-29, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 31 представляет собой способ варианта осуществления 30, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 32 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-31, где молекула нуклеиновой кислоты аденовируса в первой композиции дополнительно включает вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ варианта осуществления 32, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 17.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ варианта осуществления 33, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 32-34, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции кодируют слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой.

Вариант осуществления 36 представляет собой способ варианта осуществления 35, где слитый белок первой композиции включает усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой через линкер.

Вариант осуществления 37 представляет собой способ варианта осуществления 36, где линкер первой композиции включает аминокислотную последовательность (AlaGly) $_n$ и n представляет собой целое число от 2 до 5, предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 38 представляет собой способ варианта осуществления 37, где слитый белок первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 39 представляет собой способ любого из вариантов

осуществления 35-38, где слитый белок первой композиции дополнительно включает сигнальную последовательность, предпочтительно сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, более предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 40 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-39, где не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты первой композиции дополнительно включает промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, предпочтительно промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, а дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерных последовательностей SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательность полиаденилирования SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 41 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-40, где не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты первой композиции не кодируют антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена Гепатита В (HBsAg), оболочечного (Env) антигена HBV и L-белкового антигена HBV.

Вариант осуществления 42 представляет собой способ по любому из пп. 23-41, где усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 43 представляет собой способ варианта осуществления 42, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 44 представляет собой способ варианта осуществления 42 или 43, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 45 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-44, где аденовирусный вектор представляет собой rAd26 или rAd35 вектор.

Вариант осуществления 46 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-45, где стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 47 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-45, где стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 48 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-45, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a).

Вариант осуществления 49 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 23-45, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

Вариант осуществления 50 представляет собой вакцинную комбинацию, включающую (а) первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; и (б) вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающего вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4; где первую композицию вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а вторую композицию вводят субъекту-человеку один или несколько раз для стимулирования иммунного ответа.

Вариант осуществления 51 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 50, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 52 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 50 или 51, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 53 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 50-52, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 54 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 50-53, дополнительно включающую полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой и второй композиции.

Вариант осуществления 55 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 54, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 56 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 50-55, где первая и вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 57 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 56, где первая и вторая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 58 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 50-57, где аденовирусный вектор первой композиции дополнительно включает третью полинуклеотидную последовательность, а MVA вектор второй композиции дополнительно включает четвертую полинуклеотидную последовательность, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность кодируют усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 59 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 58, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 60 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 59, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 61 представляет собой вакцинную комбинацию, включающую (а) первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество вектора на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; и (б) вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; где первую композицию вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а вторую композицию вводят субъекту-человеку один или несколько раз для стимулирования иммунного ответа.

Вариант осуществления 62 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 61, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 63 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 61 или 62, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 64 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 61-63, где антиген HBV-полимераза первой и второй композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 65 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 61-64, дополнительно включающую полинуклеотидную

последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой и второй композиции.

Вариант осуществления 66 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 65, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 67 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 61-66, где первая и вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 68 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 67, где первая и вторая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 69 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 61-68, где MVA вектор первой композиции дополнительно включает третью полинуклеотидную последовательность, а аденовирусный вектор второй композиции дополнительно включает четвертую полинуклеотидную последовательность, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность кодируют усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 70 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 69, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 71 представляет собой вакцинную комбинацию варианта осуществления 70, где третья и четвертая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 72 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов осуществления 50-71, которая представляет собой набор.

Вариант осуществления 73 представляет собой способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека, включающий (а) введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и второй плазмиды, включающей вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и (b) введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора любого из вариантов осуществления 1-21; для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 74 представляет собой способ варианта осуществления 73, где антиген HBV-полимераза первой композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 75 представляет собой способ варианта осуществления 73 или 74, где первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа.

Вариант осуществления 76 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-75, где антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 77 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-76, где антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 78 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-77, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой композиции.

Вариант осуществления 79 представляет собой способ варианта осуществления 78, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 80 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-79, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 81 представляет собой способ варианта осуществления 80, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 82 представляет собой способ вариантов осуществления 73-81, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 83 представляет собой способ варианта осуществления 82, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 84 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-83, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции дополнительно включают промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей,

предпочтительно промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, а дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерной последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательность полиаденилирования SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 85 представляет собой способ по любому из пп. 73-84, где усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 86 представляет собой способ варианта осуществления 85, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 87 представляет собой способ варианта осуществления 85 или 86, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 88 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-87, где стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 89 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-87, где стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 90 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-87, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a).

Вариант осуществления 91 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 73-87, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

Вариант осуществления 92 представляет собой способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека, включающий (a) введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора любого из вариантов осуществления 1-21; и (b) введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и второй плазмиды, включающей не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 93 представляет собой способ варианта осуществления 92, где антиген HBV-полимераза второй композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 94 представляет собой способ варианта осуществления 92

или 93, где первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа.

Вариант осуществления 95 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-94, где антиген HBV-полимераза второй композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Вариант осуществления 96 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-95, где антиген HBV-полимераза второй композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 97 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-96, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой второй композиции.

Вариант осуществления 98 представляет собой способ варианта осуществления 97, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 99 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-98, где первая полинуклеотидная последовательность второй композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 100 представляет собой способ варианта осуществления 99, где первая полинуклеотидная последовательность второй композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 101 представляет собой способ вариантов осуществления 92-100, где вторая полинуклеотидная последовательность второй композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 102 представляет собой способ варианта осуществления 101, где вторая полинуклеотидная последовательность второй композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 103 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-102, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности второй композиции дополнительно включают промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, предпочтительно промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7, а дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерной последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательность полиаденилирования SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 104 представляет собой способ по любому из пп. 92-103, где усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 105 представляет собой способ варианта осуществления 104, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 106 представляет собой способ варианта осуществления 104 или 105, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD4⁺ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

Вариант осуществления 107 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 108 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 109 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a).

Вариант осуществления 110 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

Вариант осуществления 111 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере 4 недели после стадии (a).

Вариант осуществления 112 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере 8 недель после стадии (a).

Вариант осуществления 113 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 92-106, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 12 недель после стадии (a).

ПРИМЕРЫ

Следующие представленные в заявке примеры предназначены для дополнительной иллюстрации сущности изобретения. Должно быть понятно, что следующие примеры не ограничивают изобретение, и объем изобретения должен определяться прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Получение последовательностей HBV core и pol антигенов

Т-клеточные эпитопы на коровом белке гепатита считаются важными для устранения инфекции гепатита В, и вирусные белки гепатита В, такие как полимераза, могут служить для улучшения широты ответа. Таким образом, коровый и полимеразный белки гепатита В были выбраны в качестве антигенов для разработки терапевтической вакцины против вируса гепатита В (HBV).

Получение консенсусных последовательностей корового антигена HBV и антигена

HBV-полимеразы

Консенсусные последовательности HBV pol и core антигенов были получены на основе HBV генотипов В, С и D. Различные последовательности HBV были получены из разных источников и выровнены отдельно для корового и полимеразного белков. Исходные выравнивания последовательностей для всех подтипов (от А до Н) были впоследствии ограничены HBV генотипами В, С и D. Консенсусные последовательности были определены для каждого выравнивания белка в каждом подтипе отдельно и во всех совместных последовательностях BCD. В переменных положениях выравнивания наиболее часто встречающуюся аминокислоту использовали в консенсусной последовательности.

Оптимизация корового антигена HBV

Консенсусную последовательность корового антигена HBV оптимизировали путем осуществления двух делеций, содержащихся в нативном вирусном белке. Первой делецией была делеция N-концевого удлинения корового белка, составляющего прекоровую часть “цинковый палец”, поскольку в литературных источниках указывается, что вирус использует эту последовательность для индукции толерантности к вирусным белкам у инфицированных субъектов. Вторая делеция представляла собой делецию тридцати четырех аминокислот, соответствующих C-концевому высоко положительно заряженному сегменту, который необходим для прегеномного инкапсидирования и продуктивного синтеза вирусной ДНК с положительной цепью в жизненном цикле вируса.

Оптимизация HBV Pol-антигена

Консенсусную последовательность HBV pol-антигена оптимизировали путем замены четырех остатков для удаления ферментативных активностей обратной транскриптазы и РНКазы Н. В частности, аспартатные остатки (D) были заменены аспарагиновыми остатками (N) в “YXDD” мотиве домена обратной транскриптазы, чтобы устранить любую координационную функцию и, таким образом, связывание нуклеотида/металлического иона. Кроме того, первый аспартатный остаток (D) был заменен аспарагиновым остатком (N), а первый глутаматный остаток (E) был заменен глутаминовым остатком (A) в “DEDD” мотиве домена RNазыН для устранения Mg²⁺ координации. Кроме того, последовательность HBV pol-антигена была кодон-оптимизирована для скремблирования внутренних открытых рамок считывания оболочечных белков, включая белок S и варианты белка S с N-концевыми удлинениями pre-S1 и pre-S2. В результате были удалены открытые рамки считывания для оболочечных белков (pre-S1, pre-S2 и S белок) и белка X.

Выбор сигнального пептида для эффективной секреции белка

Были оценены три различных сигнальных пептида, введенных в рамку на N-конце корового антигена HBV: (1) сигнальный пептид тяжелой цепи гамма Ig SPIgG (BAA75024.1); (2) сигнальный пептид тяжелой цепи эпислон Ig SPIgE (AAB59424.1); и (3) сигнальный пептид предшественника цистатина S SPCS (NP_0018901.1). Сайты

расщепления сигнального пептида были оптимизированы *in silico* для корового слияния с использованием программы прогнозирования Signal P. Эффективность секреции определяли путем анализа уровней корового белка в супернатанте. Вестерн-блот анализ секреции корового антигена с использованием трех различных сигнальных пептидов, слитых на N-конце, показал, что сигнальный пептид цистатина S приводит к наиболее эффективной секреции белка.

Пример 2. Получение аденовирусных векторов, экспрессирующих слияние усеченного корового антигена HBV с pol-антигеном HBV

Аденовирусный вектор был создан для экспрессии слитого белка усеченного корового антигена HBV и pol-антигена HBV из одной открытой рамки считывания. Также могут быть предусмотрены дополнительные конфигурации для экспрессии двух белков (например, усеченного корового антигена HBV и pol-антигена HBV), например, с использованием двух отдельных кассет экспрессии или с использованием 2A-подобной последовательности для разделения двух последовательностей.

Конструирование кассет экспрессии для аденовирусных векторов

Кассеты экспрессии (показанные на Фиг. 2A и 2B) включают CMV промотор (SEQ ID NO: 7), интрон (SEQ ID NO: 15) (фрагмент, происходящий из человеческого гена ApoA1 - GenBank accession X01038 пары оснований 295-523, несущий второй интрон ApoA1), за которым следует оптимизированная кодирующая последовательность - либо только кор, либо слитый белок кора и полимеразы, которому предшествует последовательность, кодирующая сигнала секреции иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 10), и со следующим за этим SV40 сигналом полиаденилирования (SEQ ID NO: 16).

Сигнал секреции был включен из-за прошлого опыта, показывающего улучшение технологичности некоторых аденовирусных векторов, содержащих секретлируемые трансгены, без влияния на вызываемый Т-клеточный ответ (эксперименты на мышах).

Последние два остатка корового белка (VV) и первые два остатка полимеразного белка (MP), в случае слияния, приводят к объединенной последовательности (VVMP), которая присутствует на белке допаминового рецептора человека (изоформа D3), вместе с фланкирующими гомологиями.

Встраивание линкера AGAG между коровой и полимеразной последовательностями устраняет эту гомологию и не отражало никакие дополнительные совпадения в Blast протеома человека.

Пример 3. Получение MVA векторов, экспрессирующих коровый(core) антиген HBV и pol-антиген HBV.

MVA вектор был разработан для кодирования каждой из HBV Core и Pol кодирующих последовательностей настоящего изобретения. Каждую из HBV Core и Pol кодирующих последовательностей встраивали в вектор MVA в IGR44/45, каждую под контролем отдельного промотора. Также можно предусмотреть дополнительные конфигурации для экспрессии этих двух белков, например, с использованием одной экспрессионной кассеты, в которой Core и Pol антиген включает слитый белок, или,

альтернативно, с использованием 2A-подобной последовательности для разделения двух последовательностей. Кроме того, можно предусмотреть дополнительные и/или альтернативные сайты инсерций в MVA векторе, например, вставляя каждую из HBV Core и Pol кодирующих последовательностей в один и тот же или разные сайты инсерции.

Конструирование кассет экспрессии для MVA векторов

Экспрессионные кассеты (показанные на Фиг. 2С) состоят из Pr13.5 длинного промотора (SEQ ID NO: 25), смежного с, и направляющего его экспрессию, коровым антигеном HBV, и PrHyb промотора (SEQ ID NO: 26), смежного с, и направляющего его экспрессию, Pol-антигеном HBV. HBV кор-кодирующая последовательность включает SEQ ID NO: 1, а HBV Pol-кодирующая последовательность включает SEQ ID NO: 3. Каждую из SEQ ID NO: 1 и 3 модифицировали путем элиминации отрицательных цис-действующих сайтов и путем регулирования содержания GC. Кроме того, каждая из SEQ ID NO: 1 и 3 была кодон-оптимизирована для использования человеческих кодонов без влияния на аминокислотную последовательность. Каждая из SEQ ID NO: 1 и 3 включает дополнительные сигналы преждевременной терминации (TTTTTNT (SEQ ID NO: 28)), расположенные рядом со стоп-кодоном.

Пример 4. Иммуногенность комбинаций аденовирусных векторов HBV и MVA векторов HBV у мышей.

Материалы и методы

Конструкция вектора: Использовали два аденовирусных вектора, экспрессирующих либо только Кор (коровый антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), либо Полимеразу (HBV pol-антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4) в дополнение к Кору в качестве белка слияния, экспрессируемого из единственной открытой рамки считывания. Для этого были разработаны последовательности *in silico* для обеспечения консенсуса для генотипов В, С и D вируса гепатита В. Экспрессионные кассеты включают CMV промотор, AroAI интрон, сигнал секреции человеческого иммуноглобулина, за которым следует кодирующая последовательность - либо только Кор, либо слитый белок Кора и Полимеразы и сигнал полиаденилирования SV40.

Рекомбинантный MVA вектор состоит из поксвирусного промотора Pr13.5 (SEQ ID NO:25), связанного с кодирующей кор последовательностью (нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:1 и полипептидная последовательность SEQ ID NO:2), и PrHyb (SEQ ID NO: 26), связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полимеразу (нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 3 и полипептидная последовательность SEQ ID NO: 4), за обеими следует последовательность терминации транскрипции TTTTTNT (SEQ ID NO: 28). Кодирующая кор последовательность включает N-концевую метку секреции иммуноглобулина (SEQ ID NO: 11), а кодирующая полимеразу последовательность включает N-концевую сигнальную последовательность цистатина S (SEQ ID NO:6). См., например, Фиг. 2С.

In vivo испытание на иммуногенность у мышей: Чтобы оценить иммуногенность

комбинации аденовирусных векторов HBV и MVA HBV *in vivo*, мышей F1 (C57BL/6 × Balb/C) подвергали прайм-буст иммунизации внутримышечно с использованием различных комбинаций векторов. Эти исследования иммуногенности были сфокусированы на определении клеточных иммунных ответов, вызываемых коровым и полимеразным антигенами HBV.

Антиген-специфические ответы анализировали и количественно определяли методом иммуноферментных пятен (ELISPOT), а внутриклеточную продукцию цитокинов (TNF-альфа, **IL-2** и IFN-γ) определяли методом проточной цитометрии. В этих анализах выделенные спленоциты иммунизированных животных инкубировали с пептидными пулами, покрывающими Коровый белок, Pol белок или небольшую пептидную лидерную и соединительную последовательность (2 мкг/мл каждого пептида). Кроме того, использовали MVA-специфический пептид (2 мкг/мл). Пулы состоят из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, совпадающими с консенсусной последовательностью генотипов ABCD Core и Pol аденовирусных векторов. Большой 94 кДа HBV Pol белок расщепляли посередине на два пептидных пула. В ELISPOT высвобождение IFN-γ одной антиген-специфической Т-клеткой визуализировали при помощи соответствующих антител и последующей хромогенной детекцией в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC). В ICS определяли процент цитокин-высвобождающих клеток в конкретной популяции (CD3-положительные, CD4-положительные или CD8-положительные клетки).

Результаты

Оценка иммуногенности комбинаций аденовирусных векторов HBV и MVA HBV у мышей. Целью исследования была оценка иммунного ответа, индуцируемого комбинацией аденовирусных векторов HBV и MVA HBV после внутримышечной доставки мышам F1. Введение мышам F1 осуществляли, как показано в Таблице 1. Животные получали одну иммунизацию аденовирусным вектором HBV с последующей MVA HBV иммунизацией через 8 недель. Спленоциты собирали через одну неделю после последней иммунизации.

Таблица 1

План эксперимента по иммунизации мышей

Группа	N	Прайм День 0	Путь	Доза (vp)	Буст День 56	Путь	Доза TCID50	Конечн. точка День
1	4	Core-Pol слияние+Core	ИМ	10 ⁸	-	-	-	63
2	4	Core-Pol слияние+Core	ИМ	10 ⁹	-	-	-	63
3	4	Core-Pol	ИМ	10 ¹⁰	-	-	-	63

		слияние+Core						
4	4	Core-Pol слияние+Core	IM	10^8	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
5	4	Core-Pol слияние+Core	IM	10^9	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
6	4	Core-Pol слияние+Core	IM	10^{10}	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
7	4	Core Pol слияние	IM	10^8	-	-	-	63
8	4	Core-Pol слияние	IM	10^9	-	-	-	63
9	4	Core-Pol слияние	IM	10^{10}	-	-	-	63
10	4	Core-Pol слияние	IM	10^8	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
11	4	Core-Pol слияние	IM	10^9	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
12	4	Core-Pol слияние	IM	10^{10}	MVA	IM	$8,9 \times 10^7$	63
13	4	Пустой вектор	IM	10^{10}	EV	IM	-	63

IM: внутримышечный;

вр: вирусных частиц;

TCID50: доза заражения 50% культуры ткани;

MVA: модифицированный вирус осповакцины Анкара

Аденовирусные векторы HBV отдельно и в комбинации с MVA HBV вектором вызывали Pol-специфические Т-клеточные ответы у мышей. Низкоуровневые Core ответы были индуцированы аденовирусными векторами с Core-Pol слиянием+Core, и эти ответы усиливались путем бустер-инъекции HBV MVA вектора. Комбинация аденовектора с Core-Pol слиянием и HBV MVA вектора также индуцировала Core ответы (Фиг. 3).

Pol ответы в основном опосредуются CD8(+) Т-клетками, тогда как Core ответы в основном включают CD4(+) Т-клетки (Фиг. 4 и 5). Комбинация Core-Pol слияние+Core аденовекторов и HBV MVA также индуцировала CD8(+) Т-клеточно-опосредованные Core ответы (Фиг. 4).

Закключение: Комбинация HBV аденовирусных векторов и MVA HBV векторов приводит к Т-клеточным ответам против core и pol у мышей F1.

Пример 5. Иммуногенность комбинаций HBV аденовирусных векторов и

MVA HBV векторов у отличных от человека приматов (NHP)

Исследование иммуногенности у NHP in vivo. Для оценки in vivo иммуногенности комбинации HBV аденовирусных векторов и MVA HBV векторов осуществляли прайм-буст-буст иммунизацию маврикийских обезьян *супомолгус* внутримышечно различными комбинациями векторов. Эти исследования иммуногенности были сфокусированы на определении клеточных иммунных ответов, вызываемых коровым антигеном HBV и антигеном HBV-полимеразой.

Антиген-специфические ответы анализировали и количественно определяли методом иммуноферментных пятен (ELISPOT), а внутриклеточную продукцию цитокинов (TNF-альфа, **IL-2** и IFN- γ) определяли методом проточной цитометрии. В этих анализах PBMC иммунизированных животных инкубировали с пептидными пулами, покрывающими Core белок или Pol белок (2 мкг/мл каждого пептида). Пулы состоят из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, совпадающими с консенсусной последовательностью генотипов ABCD Core и Pol аденовирусных векторов. Большой 94 кДа HBV Pol белок расщепляли посередине на два пептидных пула. В ELISPOT высвобождение IFN- γ одной антиген-специфической Т-клеткой визуализировали при помощи соответствующих антител и последующей хромогенной детекцией в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC). В анализе внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) определяли процент цитокин-высвобождающих клеток в конкретной популяции (CD3-положительные, CD4-положительные или CD8-положительные клетки).

Результаты

Оценка иммуногенности комбинаций HBV аденовирусных векторов и MVA HBV у NHP. Целью исследования была оценка иммунного ответа, индуцируемого комбинацией HBV аденовирусных векторов и MVA HBV после внутримышечной доставки маврикийским обезьянам *супомолгус*. Введение маврикийским обезьянам *супомолгус* осуществляли, как показано в Таблице 1. Животные получали одну иммунизацию HBV аденовирусным вектором с последующей иммунизацией MVA HBV вектором через 8 недель и затем с еще одной последующей иммунизацией HBV аденовирусным вектором через 8 недель. PBMC собирали через две недели после последней иммунизации.

Таблица 2

План эксперимента по иммунизации NHP

Группа	N	Прайм День 0	Путь	Доза на вектор (vp)	Буст День 56	Путь	Доза TCID50	Буст День 112	Доза (vp)	Путь
1	8	Core-Pol слияние	IM	5×10^{10}	MVA	IM	5×10^8	Core-Pol слияние	1×10^1	IM
2	8	Core-Pol	IM	5×10^{10}	MVA	IM	5×10^8	Core-Pol	1×10^1	IM

		слияние+ Core						слияние	¹	
--	--	------------------	--	--	--	--	--	---------	--------------	--

IM: внутримышечный;

vp: вирусных частиц;

TCID₅₀: доза заражения 50% культуры ткани;

MVA: модифицированный вирус осповакцины Анкара

Введение только аденовирусного вектора с Core-Pol слиянием и аденовирусных векторов с Core-Pol слиянием+Core в комбинации с HBV MVA вектором вызывали устойчивые Core и Pol-специфические Т-клеточные ответы у NHP. Дополнительная стимуляция аденовирусным вектором с Core-Pol слиянием не усиливала ответ (Фиг. 6).

Core и Pol ответы у NHP опосредуются как CD4(+), так и CD8(+) Т-клетками. Комбинация аденовекторов с Core-Pol слиянием+Core аденовекторы (используемая в качестве прайм-иммунизации) и HBV MVA (используемых в качестве буст-иммунизации) индуцировала самые высокие CD4(+) Core-специфические и CD8(+) Pol-специфические Т-клеточные IFN- γ ответы (Фиг. 7).

Эти результаты демонстрируют, что комбинация HBV аденовирусных векторов и MVA HBV векторов вызывала устойчивые Т-клеточные ответы против core и pol антигенов у NHP.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от их широкого изобретательского замысла. Поэтому должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сути и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen et al. "Is chronic hepatitis B being undertreated in the United States?" J. Viral Hepat. (2011) 18(6), 377-83.
2. Obeng-Adjei et al. "DNA vaccine cocktail expressing genotype A and C HBV surface and consensus core antigens generates robust cytotoxic and antibody responses and mice and Rhesus macaques" Cancer Gene Therapy (2013) 20, 652-662.
3. World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204 [Internet] 2015 March. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
4. Belloni et al. "IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome" J. Clin. Invest. (2012) 122(2), 529-537.
5. Michel et al. "Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges." J. Hepatol. (2011) 54(6), 1286-1296.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), включающий не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4.

2. MVA вектор по п.1, где антиген HBV-полимераза может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

3. MVA вектор по п.1, где антиген HBV-полимераза включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

4. MVA вектор по любому из пп. 1-3, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой.

5. MVA вектор по любому из пп. 1-4, где первая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3.

6. MVA вектор по п.5, где первая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

7. MVA вектор по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

8. MVA вектор по п.7, где вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1.

9. MVA вектор по п.8, где вторая полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

10. Композиция, включающая MVA вектор по любому из пп. 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека, включающий:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO:4; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по любому из пп. 1-10;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена

HBV у субъекта-человека.

12. Способ по п.11, где антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

13. Способ по п.12, где антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

14. Способ по любому из пп. 11-13, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 19.

15. Способ по п.14, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

16. Способ по любому из пп. 11-15, где молекула нуклеиновой кислоты аденовирусного вектора в первой композиции дополнительно включает вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

17. Способ по п.16, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 17.

18. Способ по п.17, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17.

19. Способ по любому из пп. 16-18, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции кодируют слитый белок, включающий усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой.

20. Способ по п.19, где слитый белок первой композиции включает усеченный коровый антиген HBV, функционально связанный с антигеном HBV-полимеразой через линкер.

21. Способ по п.20, где линкер первой композиции включает аминокислотную последовательность (AlaGly)_n и n представляет собой целое число от 2 до 5, предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей SEQ ID NO: 14.

22. Способ по п.21, где слитый белок первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

23. Способ по любому из пп. 11-22, где усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека.

24. Способ по п.23, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD8+ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

25. Способ по п.23 или 24, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD4+ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

26. Способ по любому из пп. 11-25, где аденовирусный вектор представляет собой rAd26 или rAd35 вектор.

27. Способ по любому из пп. 11-26, где стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a).

28. Способ по любому из пп. 11-26, где стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a).

29. Способ по любому из пп. 11-26, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a).

30. Способ по любому из пп. 11-26, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

31. Способ усиления иммунного ответа у субъекта-человека, включающий:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество первой плазмиды, включающей первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV-полимеразу, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и второй плазмиды, включающей вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, включающую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и

б. введение субъекту-человеку второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество MVA вектора по любому из пп. 1-10;

для достижения таким образом усиленного иммунного ответа против антигена HBV у субъекта-человека.

32. Способ по п.31, где антиген HBV-полимераза первой композиции не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

33. Способ по п.31 или 32, где первая композиция предназначена для примирования иммунного ответа, а вторая композиция предназначена для стимулирования иммунного ответа.

34. Способ по любому из пп. 31-33, где антиген HBV-полимераза первой композиции может индуцировать иммунный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере двух генотипов HBV, предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов В, С и D, и более предпочтительно антиген HBV-полимераза может индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

35. Способ по любому из пп. 31-34, где антиген HBV-полимераза первой композиции включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

36. Способ по любому из пп. 31-35, дополнительно включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность,

функционально связанную с антигеном HBV-полимеразой первой композиции.

37. Способ по п.36, где сигнальная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 10.

38. Способ по любому из пп. 31-37, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 20.

39. Способ по п.38, где первая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

40. Способ по любому из пп. 31-39, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18.

41. Способ по п.40, где вторая полинуклеотидная последовательность первой композиции включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

42. Способ по любому из пп. 31-41, где первая и вторая полинуклеотидные последовательности первой композиции дополнительно включают промоторную последовательность, необязательно одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, предпочтительно промоторная последовательность включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7, и дополнительная регуляторная последовательность выбрана из группы, состоящей из энхансерной последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 15, и сигнальную последовательность полиаденилирования SEQ ID NO: 16.

43. Способ по любому из пп. 31-42, где усиленный иммунный ответ включает усиленный ответ антител против антигена HBV у субъекта-человека.

44. Способ по п.43, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD8+ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

45. Способ по п.43 или 44, где усиленный иммунный ответ включает усиленный CD4+ Т-клеточный ответ против антигена HBV у субъекта-человека.

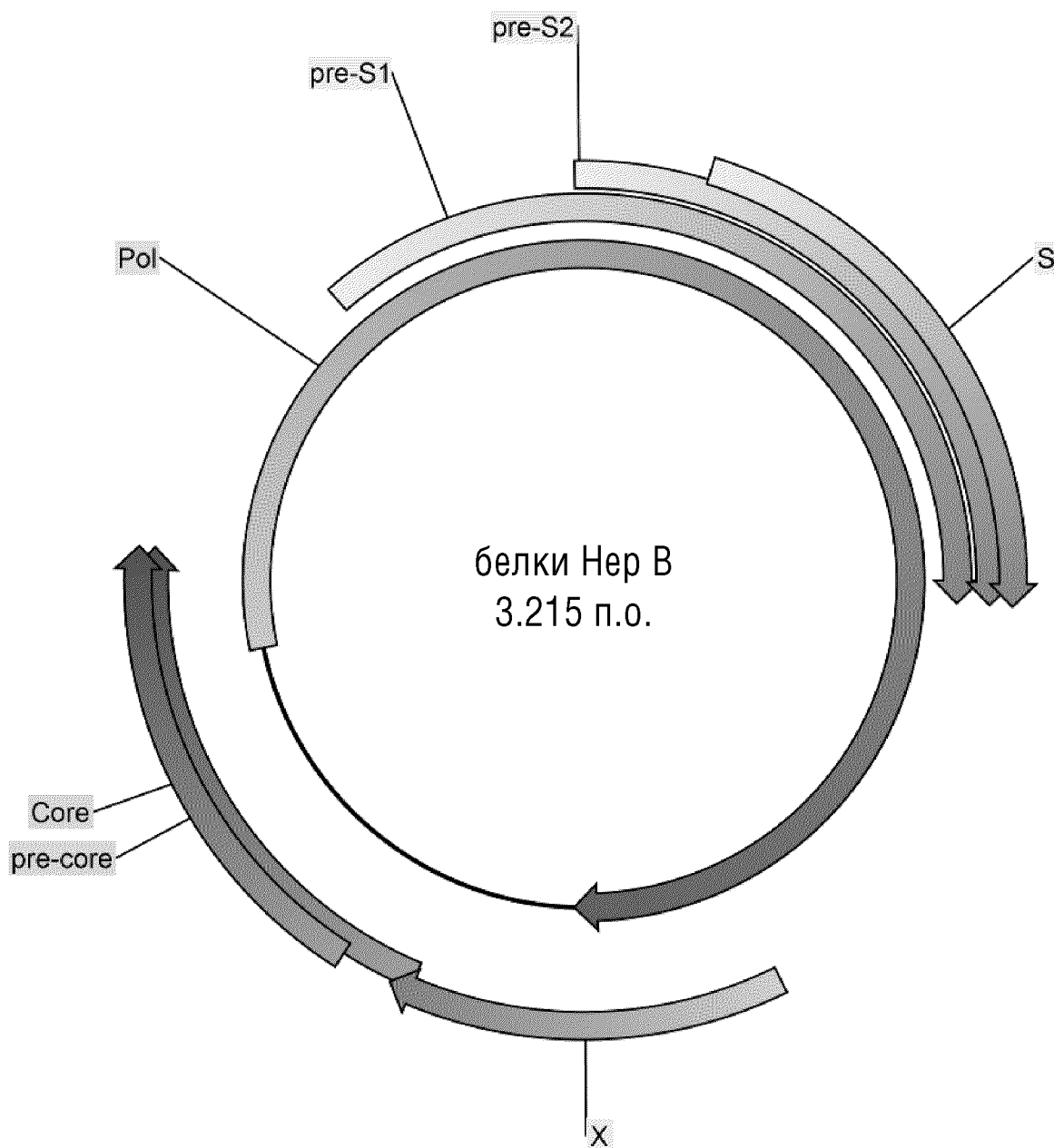
46. Способ по любому из пп. 31-45, где стадию (b) осуществляют через 1-12 недель после стадии (a).

47. Способ по любому из пп. 31-45, где стадию (b) осуществляют через 2-12 недель после стадии (a).

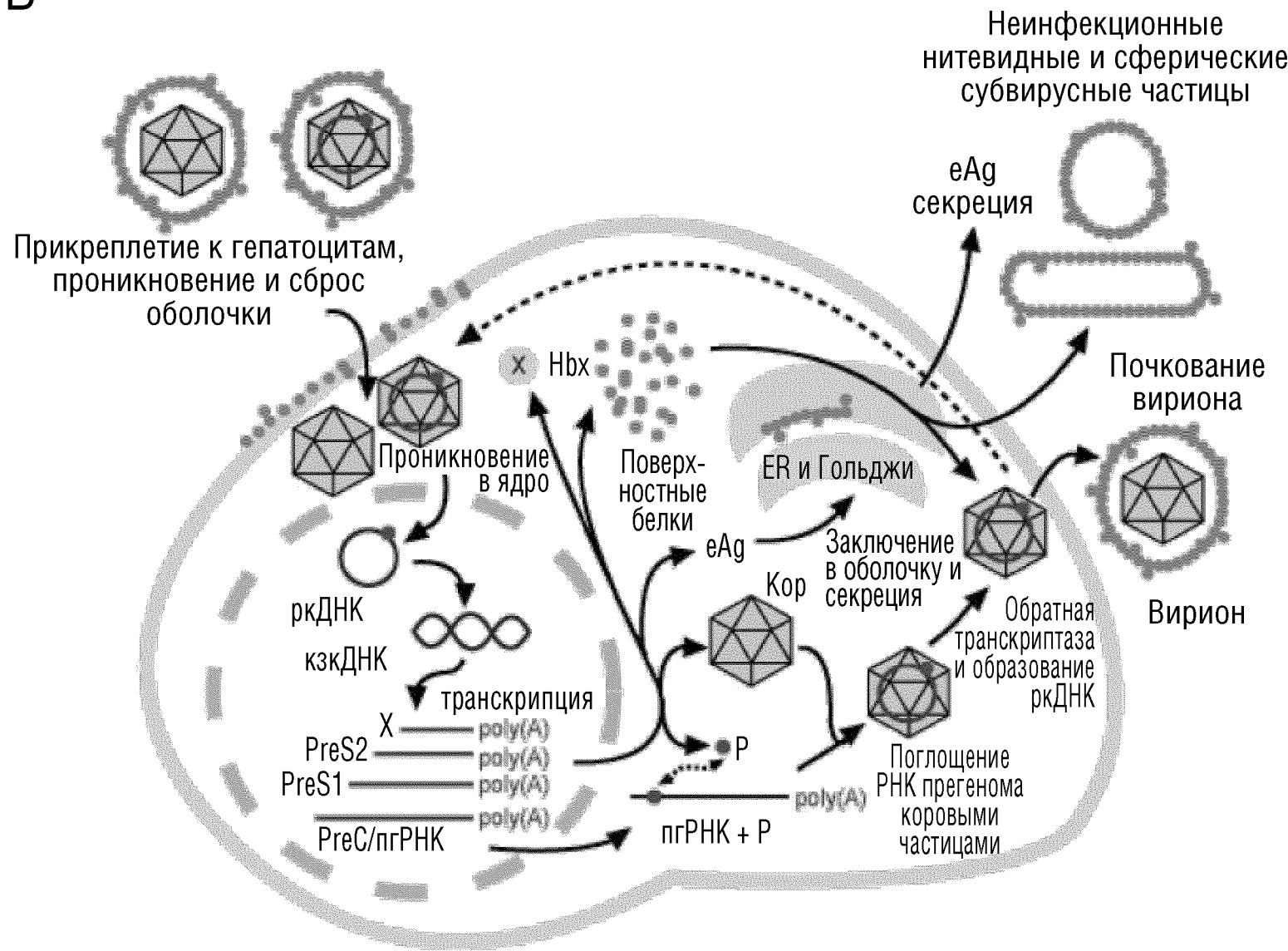
48. Способ по любому из пп. 31-45, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 1 неделю после стадии (a).

49. Способ по любому из пп. 31-45, где стадию (b) осуществляют по меньшей мере через 2 недели после стадии (a).

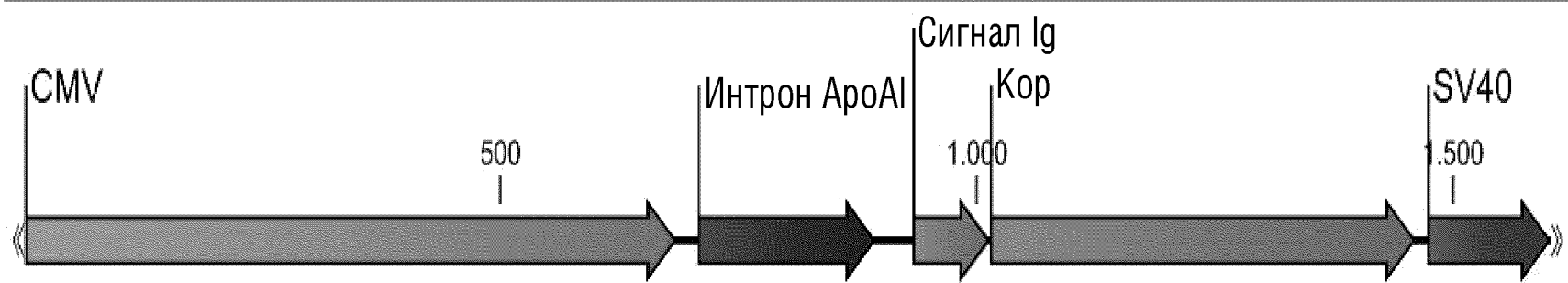
ФИГ.1А



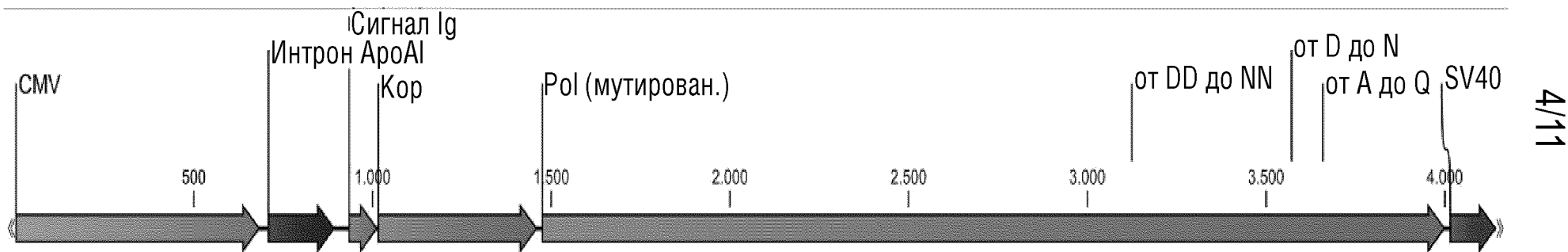
ФИГ.1В



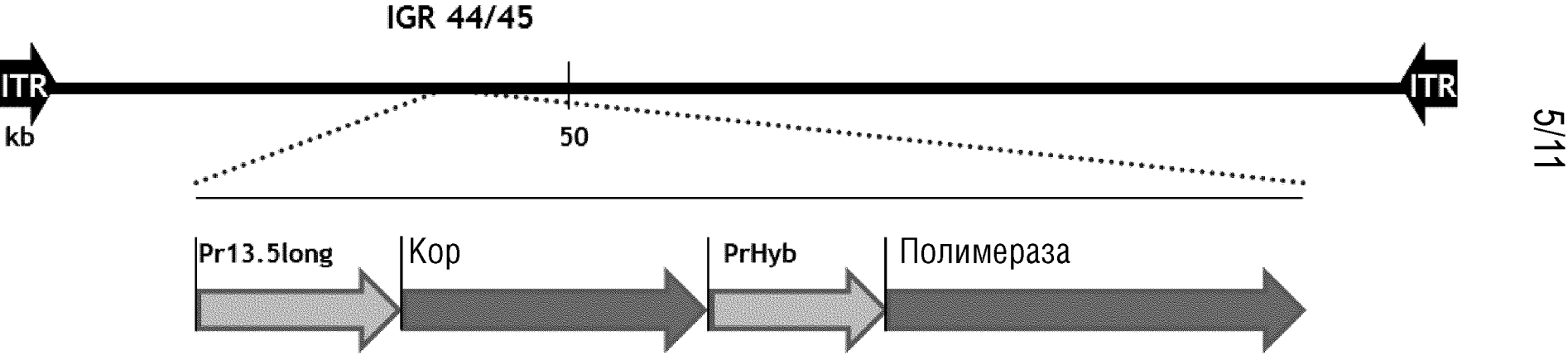
ФИГ.2А



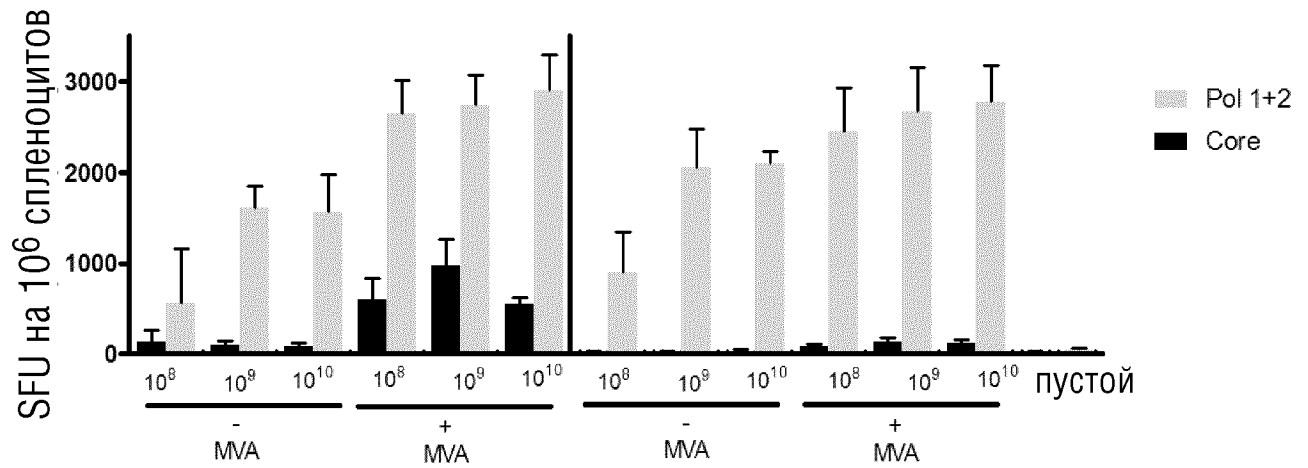
ФИГ.2В



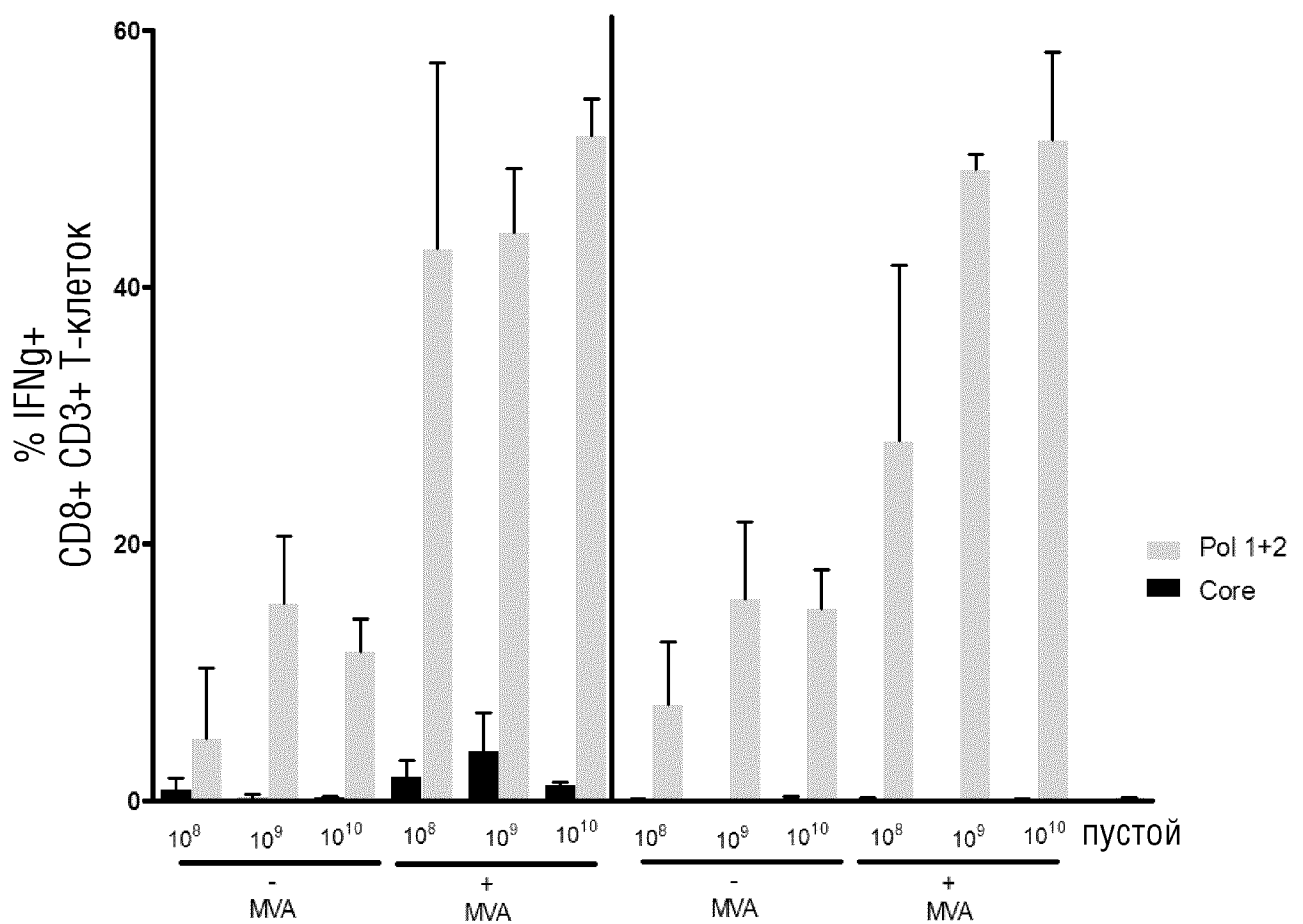
ФИГ.2С



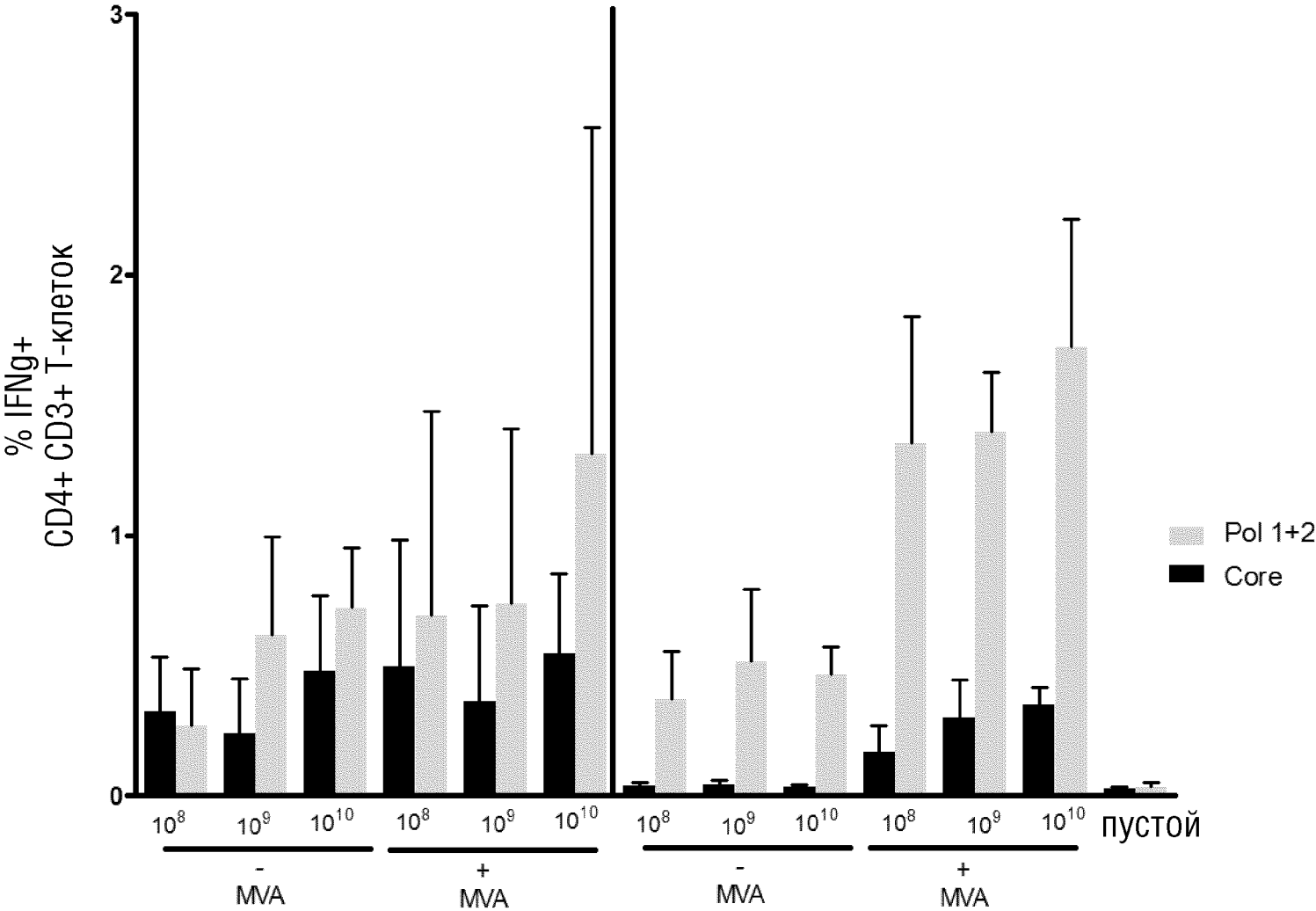
ФИГ.3



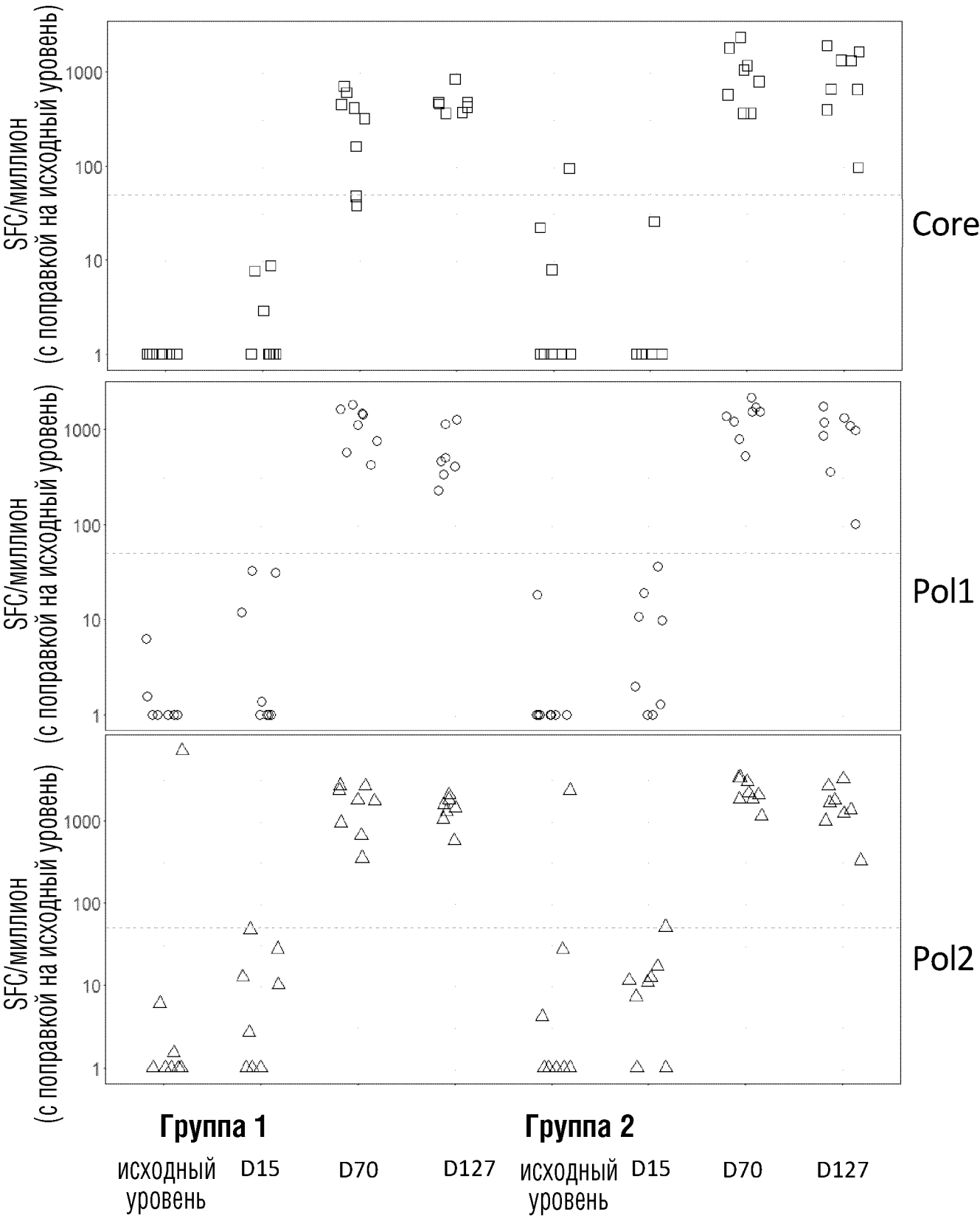
ФИГ.4



ФИГ.5

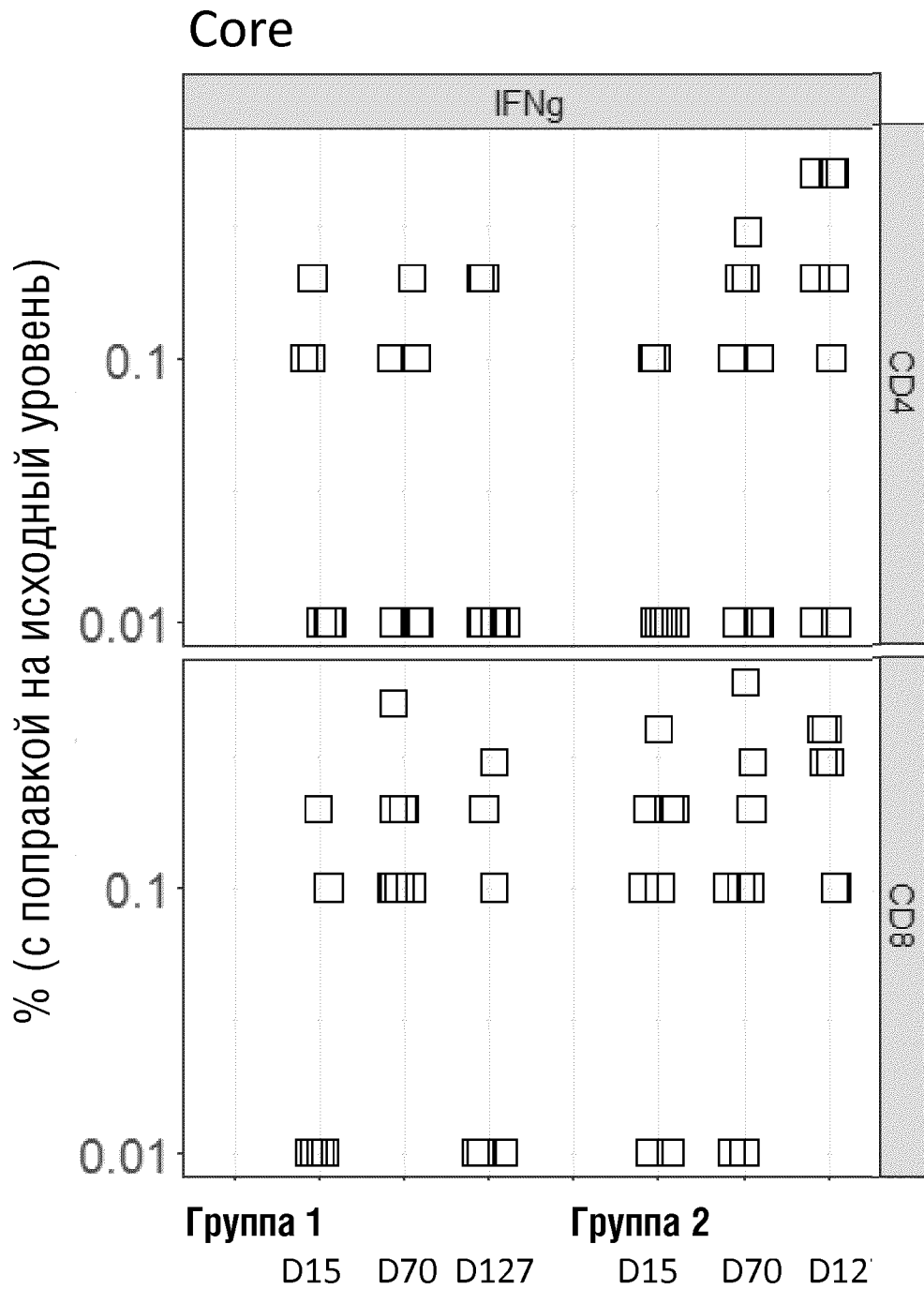


ФИГ.6



9/11

ФИГ.7А



ФИГ.7В

