

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092828** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.11

(51) Int. Cl. *C07K 14/005* (2006.01)
A61K 39/25 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.22

(54) АНТИГЕННЫЙ ВАРИАНТ ВИРУСА VARICELLA ZOSTER И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10-2018-0058219

(72) Изобретатель:

(32) 2018.05.23

Нам Хио Дзунг, Дзи Га Юнг, Ким

(33) KR

Эюнми (KR)

(86) PCT/KR2019/006113

(87) WO 2019/225962 2019.11.28

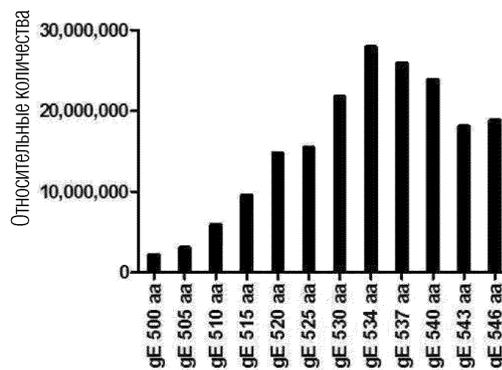
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**МОГАМ ИНСТИТУТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)**

(57) Настоящее изобретение относится к антигенному варианту и его применению, где антигенный вариант представляет собой белок из поверхностных белков (gE) вируса Varicella zoster, проявляющий высокий уровень экспрессии и высокую иммуногенность, и таким образом, при использовании антигенного варианта в качестве вакцинной композиции данная вакцина имеет более высокую безопасность по сравнению с живой противовирусной вакциной, антигенный вариант демонстрирует более высокий уровень экспрессии в клетке-хозяине по сравнению с другими антигенами и, таким образом, пригоден в качестве вакцины для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, вызванных вирусом Varicella zoster.



A1

202092828

202092828

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565774EA/011

АНТИГЕННЫЙ ВАРИАНТ ВИРУСА VARICELLA ZOSTER И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к антигенному варианту вируса *Varicella zoster* и его применению, и более конкретно к варианту антигена *Varicella zoster*, имеющему высокий уровень экспрессии и высокую иммуногенность, который выбран среди антигенных вариантов поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*, и вакцинной композиции для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего герпеса, которая содержит антигенный вариант вируса *Varicella zoster* в качестве активного ингредиента.

Уровень техники

Вирус *Varicella zoster* (VZV) представляет собой вирус, который вызывает ветряную оспу, и в основном у детей и подростков. Как только происходит заражение, VZV остается в «спящем» состоянии в сенсорных корешках и ганглиях черепных нервов в течение нескольких лет, и реактивируется и вызывает опоясывающий лишай уже во взрослом возрасте, когда снижается иммунитет. Ветряная оспа является очень контагиозным заболеванием; и как только происходит заражение, она вызывает появление везикулезной сыпи по всему телу с лихорадкой и недомоганием. У большинства нормальных детей ветряная оспа редко переходит в тяжелое состояние и в конечном итоге переходит в самокупируемое заболевание. Однако известно, что во многих случаях ветряная оспа прогрессирует до тяжелых симптомов, которые возникают у пациентов, перенесших трансплантацию органов или химиотерапию (Adriana Weinberg et al., *J. Infectious Diseases*, 200(7):1068, 2009; Judith Breuer et al., *Expert Review of Vaccines*, 2017, DOI:10.1080/14760584.2017.13948433).

Первоначальные симптомы опоясывающего лишая проявляются в виде ломоты и болей во всем теле, таких как ломота в теле, или ощущение сильного зуда, покалывания и жжения, с сильной болью, как от удара ножом. Опоясывающий лишай представляет заболевание, при котором через несколько дней появляются волдыри, боль усиливается по мере увеличения кожных поражений, и пациенты пожилого возраста, как правило, жалуются на более сильную боль. Даже в случае излечения опоясывающего лишая, невралгия может остаться как последствие инфекции. Известно, что у людей в возрасте 60 лет и старше невралгия может вызывать беспокойный сон, жаловаться на хроническую усталость, вызывать сильную боль даже при легком контакте или трении, или даже вызывать депрессию, хотя такая невралгия бывает относительно редко у взрослых в возрасте 40 лет и моложе.

Репрезентативные профилактические вакцины против ветряной оспы включают такие продукты, как VARIVAX (Merck & Co, Inc.) и VARILRIX (GlaxoSmithKline Biologicals SA), которые были разработаны с использованием штамма Ока, аттенуированного штамма, полученного в 1970 году. В Корее такой продукт, как Suduvax

(Green Cross), который был получен с использованием штамма MAV/06, разработанного в 1980 году, является коммерчески доступным. Рассматриваемые коммерчески доступные живые вакцины проявляют в среднем 80% протективную эффективность, означая, что у 20% вакцинированных субъектов заражение может иметь место даже после вакцинации. Постоянно отмечались проблемы со стабильностью, такие как развитие ветряной оспы и опоясывающего лишая, вызванных живыми вирусами, входящими в состав вакцин.

ZOSTAVAX (Merck & Co, Inc.), которая представляет собой живую аттенуированную вакцину, полученную с использованием штамма Ока, была разработана в качестве профилактической вакцины против опоясывающего лишая. Эта вакцина была разрешена к применению и продается в США и Корее при условии, что ее можно использовать для взрослых в возрасте 50 лет и старше, а не для детей или подростков, поскольку в вакцине содержится большое количество вируса. Недавно компания GlaxoSmithKline Biologicals SA разработала вакцину, состоящую из поверхностного вирусного белка (gE) и адьюванта, которая предназначена для взрослых в возрасте 50 лет и старше, и в клинических испытаниях она доказала свою профилактическую эффективность (патент США № 7939084, от 7 января 2011 г.).

На ранних этапах разработки вакцин в качестве антигенов в основном использовались живые аттенуированные клетки или убитые клетки. Однако за счет проблем с безопасностью и наличием иммуносупрессивных соединений в патогенах, разработка таких антигенов смещается в сторону разработки белковых антигенов, которые имеют структуру и состав в чистом виде и могут индуцировать иммунитет, необходимый для защиты от болезней.

Следовательно, авторы настоящего изобретения предприняли интенсивные усилия для разработки белковых антигенов с высоким уровнем экспрессии в клетках-хозяевах, которые могут способствовать повышению продукции, не влияя на иммуногенность, из антигенов поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*. В результате заявители изобретения получили антигенные варианты поверхностного белка вируса *Varicella zoster* разной длины и оценили уровни их экспрессии, тем самым идентифицируя специфические аминокислотные последовательности с высоким уровнем экспрессии среди антигенных вариантов; и таким образом, осуществили настоящее изобретение.

Описание

Техническая задача

Целью настоящего изобретения является получение специфического антигенного варианта, имеющего высокий уровень экспрессии и высокую иммуногенность, который выбран из антигенных вариантов поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*.

Другой целью настоящего изобретения является получение гена, кодирующего антигенный вариант, рекомбинантного вектора, содержащего ген, и клетки-хозяина, трансформированной рекомбинантным вектором.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение вакцинной композиции для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая,

содержащей антигенный вариант в качестве активного ингредиента.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка способа профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая с использованием вакцинной композиции, которая содержит антигенный вариант в качестве активного ингредиента.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка применения вакцинной композиции, которая содержит антигенный вариант в качестве активного ингредиента, для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка применения вакцинной композиции, которая содержит антигенный вариант в качестве активного ингредиента, для производства лекарственного средства для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

Решение технической задачи

Для достижения вышеуказанных целей изобретение относится к антигенному варианту поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, который отличается тем, что антигенный вариант включает вариацию, которая представляет собой усечение карбоксиконца от любого аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящий из аминокислотных остатков 525-543 в антигене поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*, представленного аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Кроме того, настоящее изобретение относится к гену, кодирующему антигенный вариант, рекомбинантному вектору, содержащему ген, и клетке-хозяину, трансформированной рекомбинантным вектором.

Кроме того, изобретение относится к вакцинной композиции для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, содержащей антигенный вариант в качестве активного ингредиента.

Кроме того, изобретение относится к способу профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая с использованием вакцинной композиции, которая содержит антигенный вариант в качестве активного ингредиента.

Кроме того, изобретение относится к применению вакцинной композиции, которая включает антигенный вариант в качестве активного ингредиента, для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

Кроме того, изобретение относится к применению вакцинной композиции, которая содержит антигенный вариант в качестве активного ингредиента, для производства лекарственного средства для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 схематично показан экспериментальный процесс по настоящему изобретению.

На фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности антигенов поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster* разной длины.

На фиг. 3 приведены результаты вестерн-блоттинга, проведенного для сравнения уровней экспрессии фрагментов gE, которые являются антигенами вируса *Varicella zoster*.

На фиг. 4 приведены результаты вестерн-блоттинга, проведенного для сравнения уровней экспрессии поверхностного белкового антигена (GSK gE 546 aa), который входит в состав продукта Shingrix, представляющего вакцину против вируса *Varicella zoster* производства компании GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигенного варианта (mogam gE 537 aa), полученного заявителями настоящего изобретения.

На фиг. 5 приведены результаты анализа gE-специфического IgG с использованием ELISA, проведенного для сравнения гуморального иммунного ответа на поверхностный белковый антиген (GSK gE 546 aa), который входит в состав продукта Shingrix, представляющего вакцину против вируса *Varicella zoster* производства компании GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигенного варианта (mogam gE 537 aa), полученного заявителями настоящего изобретения.

На фиг. 6 приведены результаты определения мышинового IFN- γ с использованием ELISA, проведенного для сравнения клеточно-опосредованного иммунного ответа (CMI) на поверхностный белковый антиген (GSK gE 546 aa), который входит в состав продукта Shingrix, представляющего вакцину против вируса *Varicella zoster* производства компании GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигенного варианта (mogam gE 537 aa), полученного заявителями настоящего изобретения.

На фиг.7 показаны результаты анализа анти-gE-специфического IgG с использованием ELISA, проведенного для сравнения гуморального иммунного ответа на фрагменты gE, которые являются антигенами вируса *Varicella zoster*.

На фиг. 8 приведены результаты, полученные при выполнении анализа анти-gE-специфического IgG с использованием ELISA для сравнения гуморального иммунного ответа на фрагменты gE, которые являются антигенами вируса *Varicella zoster*, с последующим обобщением числа респондеров, которые демонстрируют антигенспецифическую ответную продукцию антител.

Описание предпочтительного варианта осуществления изобретения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, использованные здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение. В общем, номенклатура, использованная здесь, хорошо известна и широко используется в данной области.

В настоящем изобретении для разработки антигенов с высоким уровнем экспрессии в клетках-хозяевах, что может способствовать повышению продукции, не влияя на иммуногенность, из белковых антигенов вируса *Varicella zoster*, был проведен эксперимент, в котором получали антигенные варианты поверхностного белка (gE) различной длины, и затем определяли уровни их экспрессии. В результате было установлено, что среди антигенных вариантов поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, полученных заявителями настоящего изобретения, антигены, представленные специфическими аминокислотными последовательностями, проявляли более высокий уровень экспрессии,

чем другие антигены (фиг. 3).

Кроме того, для выбора антигенных вариантов, обладающих высокой иммуногенностью, проводили определение титра антител (фиг. 7) и оценку антигенспецифических респондеров (фиг. 8). В результате было идентифицировано, что антигены от *mogam gE 534 aa* до *gE 540 aa* имели более высокую иммуногенность.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенному варианту поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, который включает вариацию, представляющую усечение карбоксиконца от любого аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аминокислотных остатков 525-543 в антигене поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*, представленного аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В частности, изобретение относится к антигенному варианту поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, отличающемуся тем, что антигенный вариант включает вариацию, выбранную из группы, состоящей из:

- a) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 525;
- b) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 526;
- c) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 527;
- d) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 528;
- e) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 529;
- f) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 530;
- g) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 531;
- h) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 532;
- i) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 533;
- j) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 534;
- k) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 535;
- l) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 536;
- m) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 537;
- n) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 538;
- o) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 539;
- p) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 540;
- q) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 541;
- r) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 542; и
- s) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 543.

Антигенный вариант может отличаться тем, что он предпочтительно включает вариацию, выбранную из группы, состоящей из j) усечения карбоксиконца от аминокислотного остатка 534; k) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 535; l) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 536; m) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 537; n) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 538; o) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 539; и p) усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 540; однако вариация этим не ограничивается.

SEQ ID NO: 1: mgtvnpkvvg vlmfgiitg tlrtnpvra svlryddfhX1 dedkldtnsv yepyyhsdha
 esswvnrge srkaydhnsr yiwprndydg flenahehhg vynqgrgids gerlmqptqm saqedlgddt gihvptlng
 ddrhkivnvd qrqygdvfkq dlmpkpqqqr lievsveenh pflrapiqr iygvrytetw sflpsltctg daapaihic
 lkhttcfqdv vvdvdcaent kedqlaeisy rfqgkheadq pwivvntstl fdeleldppe iepgvklvrl tekqylgyvi
 wnmrgsdgts tyatflvtwk gdekrnptp avtpqprgae fhmwnyhshv fsvgdtdfsla mhlqykihea pfdlllewly
 vpidptcqpml rlystclyhp napqclshmn sgctftsphl aqrvastvyq ncehadnyta yclgishmep sfgllhdgg
 ttlkfvdtpe slsglyvfvv yfngheava ytvsvtdhf vnaieergfp ptagqpatt kpkeitvnp gtsplX2ryaa
 wtgglaavvl lclviflict akrmrkayr vdkspynqsm yuaglpvddf edsestdtee efgnaiggsh ggssytvyid ktr
 (где X₁ представляет собой T или I, и X₂ представляет собой L или I).

В настоящем изобретении антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* может отличаться тем, что он представляет собой антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, состоящий из 534-540 аминокислот, который получен из антигена поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, представленного аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, состоящей из 623 аминокислот, или вариацию, которая представляет собой усечение некоторых карбоксиконцевых аминокислотных остатков. Например, как здесь используется, термин «вариация, которая представляет собой усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 534» означает, что в направлении от аминоконца (N-конец) к карбоксиконцу (C-конец), аминокислотные остатки с 1 по 534 остаются, а смежные аминокислотные остатки от аминокислотного остатка 535 до карбоксиконца усекаются.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения аминокислотный остаток 40 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой треонин.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения аминокислотный остаток 536 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой лейцин.

В настоящем изобретении антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* может отличаться тем, что он представлен любой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2-8 и SEQ ID NO: 21-23, а именно:

- a) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 534;
- b) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 535;
- c) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 536;
- d) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 537;
- e) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, которая получена усечением карбоксиконца аминокислотного остатка 538;
- f) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 7, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 539;

g) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 8, которая получена усечением карбоксиконца аминокислотного остатка 540;

h) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 21, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 525;

i) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 22, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 530;

или

j) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 23, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 543.

Поверхностный белок по настоящему изобретению происходит из гликопротеина, составляющего оболочку вируса *Varicella zoster*, происходящего из клды 1, и представляет собой пептидный фрагмент (усеченный белок), состоящий из 534-540 аминокислот, который получают усечением части карбоксильного конца.

С учетом биологически эквивалентных аминокислотных вариаций аминокислотная последовательность, использованная в настоящем изобретении, интерпретируется как включающая последовательности, имеющие существенную идентичность с последовательностями SEQ ID NO: 2-8 и SEQ ID NO: 21-23. Вышеуказанная существенная идентичность означает, что в случае, когда последовательность по настоящему изобретению, как здесь описано выше, и любая другая последовательность выравниваются для максимального соответствия и выровненные последовательности анализируются с использованием алгоритма, обычно используемого в данной области, то другая последовательность имеет, по меньшей мере, 70% гомологию, более конкретно 80% гомологию, еще более конкретно 90% гомологию и наиболее конкретно 95% гомологию с последовательностью по настоящему изобретению, при этом обладая той же функцией.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения было установлено, что следующий антигенный вариант обладает высокой иммуногенностью: а) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 534; б) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 535; в) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 536; д) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 537; е) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 538; ф) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, которая получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 539; или г) антигенный вариант, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, которая

получена усечением карбоксиконца от аминокислотного остатка 540.

На ранних этапах разработки вакцин в качестве антигенов в основном использовали живые аттенуированные клетки или убитые клетки. Однако за счет проблем с безопасностью разработка таких антигенов смещается в сторону разработки белковых антигенов, имеющих структуру и состав в чистом виде. Однако белковые антигены обычно проблематичны в том отношении, что они обладают низкой иммуногенностью по сравнению с обычными вакцинами. С точки зрения превосходной стабильности и иммуногенности, а также высокой экспрессии в клетках-хозяевах антигенный вариант по настоящему изобретению можно эффективно использовать в качестве вакцины для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, вызванных вирусом *Varicella zoster*.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к гену, кодирующему антигенный вариант, рекомбинантному вектору, содержащий его, и клетке-хозяину, трансформированной рекомбинантным вектором.

В настоящем изобретении ген может отличаться тем, что он представлен любой нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO: 9-15.

В рамках изобретения, термин «вектор» относится к ДНК конструкции, содержащей последовательность ДНК, которая функционально связана с соответствующей контрольной последовательностью, способной оказывать влияние на экспрессию последовательности ДНК в подходящем хозяине. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или может, в некоторых случаях, интегрироваться в геном. В настоящем описании «плазида» и «вектор» иногда используются взаимозаменяемо, поскольку плазида в настоящее время является наиболее часто используемой формой вектора. Для целей настоящего изобретения предпочтительно использовать плазмидный вектор. Типичные плазмидные векторы, которые можно использовать для этой цели, имеют структуру, включающую (а) ориджин репликации, который обеспечивает эффективную репликацию, так что продуцируется несколько сотен плазмидных векторов на одну клетку-хозяина, (b) ген устойчивости к антибиотикам, который обеспечивает селекцию клетки-хозяина, трансформированной плазмидным вектором, и (с) сайт расщепления рестриктазой, который обеспечивает вставку чужеродного фрагмента ДНК. Даже если подходящий сайт расщепления рестриктазой отсутствует в векторе, то использование синтетического олигонуклеотидного адаптера или линкера в соответствии с обычным способом позволяет легко лигировать вектор и чужеродную ДНК.

В рамках изобретения, термин «рекомбинантный вектор» обычно относится к рекомбинантному носителю, в который вставлен фрагмент гетерологичной ДНК, где рекомбинантный носитель обычно находится в форме фрагмента двухцепочечной ДНК. В данном случае гетерологичная ДНК относится к чужеродной ДНК, которая в природе не встречается в клетке-хозяине. Рекомбинантный вектор, попав в клетку-хозяин, может

реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, так что можно получить несколько копий вектора и (гетерологичной) ДНК, вставленной в него.

После лигирования ген или рекомбинантный вектор трансформируют или трансфектируют в клетку-хозяин. Для «трансформации» или «трансфекции» можно использовать несколько типов различных методов, обычно применяемых для введения экзогенной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, и их примеры включают электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с DEAE- декстраном и липофекцию.

Как хорошо известно в данной области, для повышения уровня экспрессии трансфектированного гена в клетке-хозяине рассматриваемый ген должен быть операбельно связан с последовательностью транскрипционного и трансляционного контроля экспрессии, которая выполняет свою функцию в выбранном экспрессирующем хозяине.

В рамках изобретения, термин «трансформация» относится к введению ДНК в хозяина таким образом, чтобы ДНК могла реплицироваться в виде внехромосомного фактора или посредством хромосомной интеграции. Конечно, следует понимать, что не все векторы одинаково функционируют в экспрессии последовательности гена по настоящему изобретению. Аналогично не все хозяева одинаково функционируют по отношению к одной и той же экспрессионной системе. Однако специалисты в данной области могут сделать соответствующий выбор среди различных векторов, контрольных последовательностей экспрессии и хозяев, не выходя за рамки настоящего изобретения, и без чрезмерной экспериментальной нагрузки. Например, вектор должен быть выбран с учетом хозяина, потому что вектор должен реплицироваться в нем. В этом отношении необходимо также учитывать количество копий вектора, его способность регулировать число копий и экспрессию других белков, кодированных вектором.

В настоящем изобретении клетка-хозяин, подлежащая трансформации, предпочтительно выбрана из группы, без ограничения, состоящей из клеток животных, клеток растений, дрожжей, *E. coli* и клеток насекомых.

В частности, в настоящем изобретении в качестве микроорганизма, используемого в качестве клетки-хозяина, подлежащей трансформации, можно использовать любой микроорганизм при условии, что он является нетоксичным или аттенуированным микроорганизмом при применении к живому организму. Их примеры могут включать грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium bovis* и *Shigella*; и грамположительные бактерии, такие как *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* и *Streptococcus*. Их предпочтительный пример может включать молочнокислые бактерии, которые являются съедобными микроорганизмами. Однако микроорганизм этим не ограничивается.

Молочнокислые бактерии могут включать *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Bifidobacterium sp.* Репрезентативные примеры *Lactobacillus sp.* могут включать *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus*

delbrueckii, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Lactobacillus casei*; репрезентативные примеры *Streptococcus* sp. могут включать термофилы *Streptococcus thermophiles*; и репрезентативные примеры *Bifidobacterium* sp. могут включать *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis* и *Bifidobacterium adolescentis*, где *Lactobacillus casei* являются более предпочтительными. Однако молочнокислые бактерии указанными видами не ограничиваются.

Микроорганизм также может представлять собой эукариотические клетки, включая грибы, такие как *Aspergillus* sp., дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp. и *Neurospora crassa*, другие низшие эукариотические клетки и высшие эукариотические клетки, такие как клетки насекомых.

Микроорганизм может происходить от растений или млекопитающих. Их предпочтительные примеры могут включать клетки почки обезьяны (клетки COS-7), клетки NS0, SP2/0, клетки яичника китайского хомячка (CHO), W138, клетки почки новорожденного хомячка (ВНК), MDCK, линии миеломных клеток, клетки HuT78 и клетки HEK293, где предпочтительными являются клетки CHO. Однако микроорганизм этим не ограничивается.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антигена вируса *Varicella zoster*, включающему стадию культивирования клетки-хозяина.

В случае, когда рекомбинантный вектор, способный экспрессировать антиген вируса *Varicella zoster*, вводится в клетку-хозяин, то антиген можно получить культивированием клетки-хозяина в течение периода, достаточного для обеспечения экспрессии антигена в ней, или, более предпочтительно, в течение периода времени, достаточного для обеспечения секреции антигена в культуральную среду, в которой культивируется клетка-хозяин.

В некоторых случаях экспрессированный антиген можно выделить из клетки-хозяина и очистить до гомогенности. Выделение или очистка антигена может выполняться обычными методами выделения и очистки, используемыми для белков, например хроматографией. Примеры хроматографии могут включать аффинную хроматографию, включая хроматографию на колонке с протеином А или колонке с протеином G, ионообменную хроматографию и гидрофобную хроматографию. Антиген может быть выделен и очищен дополнительным комбинированием фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, диализа и т.п. в дополнение к вышеуказанной хроматографии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцинной композиции для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, содержащей в качестве активного ингредиента антигенный вариант вируса *Varicella zoster*.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая с использованием вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант вируса *Varicella zoster*.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант вируса *Varicella zoster*, для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант, для производства лекарственного средства для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

В рамках изобретения, термин «профилактика» означает подавление развития патологического состояния или заболевания у субъекта, у которого не было диагностировано патологическое состояние или заболевание, и который, вероятно, может иметь такое патологическое состояние или заболевание.

В рамках изобретения, термин «лечение» означает (а) ингибирование прогрессирования патологического состояния или заболевания или его симптомов; (b) облегчение патологического состояния или заболевания или его симптомов; или (с) устранение патологического состояния или заболевания или его симптомов. Композиция по настоящему изобретению активирует иммунный ответ против вируса *Varicella zoster* у субъекта, страдающего ветряной оспой или опоясывающим лишаем, которые являются заболеванием, вызванным инфекцией, вызванной вирусом *Varicella zoster*, тем самым подавляя прогрессирование, устраняя или облегчая симптомы заболевания. Следовательно, композиция по настоящему изобретению сама может представлять собой терапевтическую композицию для лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая или может применяться в качестве терапевтического средства для лечения заболевания, которую вводят в комбинации с другими фармакологическими ингредиентами.

Таким образом, в настоящем описании термин «лечение» или «терапевтическое средство» также включает значение «адьювантное лечение» или «лечебное средство».

В рамках изобретения, термин «активный ингредиент» относится к вакцинной композиции, достаточной для получения желаемого эффекта, который включает, не ограничиваясь этим, индукцию или усиление иммунного ответа против вируса *Varicella zoster* у пациента, предупреждение, ослабление или устранение реактивации вируса *Varicella zoster* у пациента, инфицированного этим вирусом или которому была введена живая вакцина против вируса *Varicella zoster*, предупреждение опоясывающего лишая (HZ) и/или постгерпетической невралгии (PHN), а также снижение тяжести или продолжительности HZ и/или PHN. Специалисты в данной области понимают, что уровень такого желаемого эффекта может варьироваться.

В рамках изобретения, термин «иммунный ответ» относится к клеточно-опосредованному (Т-клеточному) иммунному ответу и/или ответной продукции антител (В-клетками).

Вакцинная композиция по настоящему изобретению пригодна для профилактики ветряной оспы, и/или HZ, и/или PHN, или уменьшения тяжести или продолжительности

ветряной оспы, и/или HZ, и/или PHN в популяциях иммунокомпетентных пациентов и пациентов с ослабленным иммунитетом, которые включают, не ограничиваясь ими, здоровых субъектов и пациентов с ослабленным иммунитетом, которые перенесли трансплантацию гемопоэтических клеток (HCT) или трансплантацию солидных органов (SOT), ВИЧ-инфицированных пациентов, пациентов с аутоиммунным заболеванием и субъектов с раком крови; субъектов, которые проходят химиотерапию по поводу широкого ряда солидных злокачественных новообразований; и пациентов, которые проходят хроническую иммуносупрессивную терапию по поводу широкого ряда патологических состояний, включая ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), болезнь Крона, псориаз и рассеянный склероз.

В настоящем изобретении вакцинная композиция может отличаться тем, что она дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вакцинную композицию по настоящему изобретению можно получить в виде разовой лекарственной формы посредством ее формуляции с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или эксципиента в соответствии со способом, который может легко осуществить специалист в области, к которой относится настоящее изобретение, или может быть приготовлена в виде помещения в контейнер с множеством доз. В данном случае лекарственная форма может быть составлена в виде препаратов для перорального введения, таких как порошки, гранулы, таблетки, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропы и аэрозоли, препаратов для наружного применения, суппозиторий и стерильных растворов для инъекций в соответствии с общепринятыми и используемыми методами. Подходящие составы, известные в данной области, могут представлять собой составы, описанные в монографии Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA.

Твердые препараты для перорального введения включают таблетки, пилюли, порошки, гранулы, капсулы и т.п., и эти твердые препараты получают смешиванием по меньшей мере с одним эксципиентом, таким как крахмал, карбонат кальция, сахароза, лактоза и желатин. В дополнение к простым вспомогательным веществам для твердых препаратов также используются смазывающие вещества, такие как стеарат магния и тальк.

Жидкие препараты для перорального введения включают суспензии, жидкости для перорального введения, эмульсии, сиропы и т.п., и эти жидкие препараты могут содержать различные вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, подсластители, ароматизаторы и консерванты, в дополнение к воде и вазелиновому маслу, которые представляют обычно используемые простые разбавители.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные растворы, неводные растворители, суспензии, эмульсии, лиофилизированные препараты и суппозитории. В качестве основы для суппозиторий можно использовать витепсол, макрогол, твин 61, какао-масло, лаурин, глицерожелатин и тому подобное.

В настоящем изобретении вакцинная композиция может отличаться тем, что она

дополнительно содержит адъювант. Как правило, иммунный ответ не индуцируется эффективно одним белковым антигеном, и таким образом, эффект вакцинной композиции усиливается при смешивании с адъювантом.

В рамках изобретения, термин «адъювант» относится к веществу, которое неспецифически способствует развитию иммунного ответа на антиген в процессе начальной активации иммунных клеток, включая агент, молекулу и т.п., каждое из которых не является иммуногеном для хозяина и усиливает иммунитет за счет повышения активности клеток иммунной системы (Warren et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 4: 369, 1986). Адъювант, используемый в настоящем изобретении, который может усиливать иммунный ответ, можно вводить одновременно с вакцинной композицией или можно вводить последовательно через определенный интервал времени.

Адъювант по настоящему изобретению может отличаться тем, что он выбран, не ограничиваясь этим, из группы, состоящей из гидроксид-фосфата кальция, минерального масла, сквалена, антагониста Toll-подобных рецепторов (TLR), детергента, липосом, сапонины, цитокина и их комбинации.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или расстройства у пациента, включающему стадию введения пациенту терапевтически эффективного количества вакцинной композиции.

Оптимальную дозу вакцинной композиции по настоящему изобретению можно определить стандартными исследованиями, включающими наблюдение за соответствующим иммунным ответом у субъекта. После первоначальной вакцинации субъект может быть подвергнут одной или более бустер-иммунизациям через соответствующие интервалы времени.

Подходящая доза вакцинной композиции по настоящему изобретению варьирует в зависимости от таких факторов, как способ формуляции, способ введения, возраст пациента, масса тела, пол, патологическое состояние, диета, время введения, путь введения, скорость выведения и ответная чувствительность, и может быть надлежащим образом определена специалистами в данной области техники с учетом вышеуказанных факторов.

Вакцинную композицию по настоящему изобретению можно вводить путем, обычно используемым в области медицины. Парентеральное введение является предпочтительным, и введение может осуществляться, например, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, пероральным, внутрисердечным, интрамедуллярным, интрадуральным, трансдермальным, энтеральным, подкожным, сублингвальным или местным путем. В общем, вакцинная композиция по настоящему изобретению может отличаться тем, что она содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по настоящему изобретению в терапевтически эффективном количестве.

Способ по изобретению

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью примеров. Эти примеры предназначены только для иллюстративных целей, и специалистам в данной

области техники будет очевидно, что объем настоящего изобретения не истолковывается как ограничиваемый этими примерами.

Пример 1: получение конструкций поверхностного белка (gE)

Для получения конструкций поверхностного белка (gE) проводили ПЦР для получения желаемых фрагментов gE. Затем каждый из фрагментов gE расщепляли рестриктазой и вставляли в вектор pcDNA3.1. Последовательность фрагмента gE, вставленного в вектор pcDNA3.1, идентифицировали секвенированием. ДНК-вектор pcDNA3.1, содержащий идентифицированную последовательность фрагмента gE, получали с использованием набора midiprep. Аминокислотные последовательности фрагментов поверхностного белка (gE) приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Антигенный вариант VZV gE	Вариация в антигене VZV gE с SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
gE 534 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 534	2
gE 535 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 535	3
gE 536 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 536	4
gE 537 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 537	5
gE 538 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 538	6
gE 539 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 539	7
gE 540 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 540	8
gE 500 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 500	16
gE 505 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 505	17
gE 510 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 510	18
gE 515 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 515	19
gE 520 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 520	20
gE 525 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 525	21
gE 530 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 530	22
gE 543 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 543	23
gE 546 aa	Усечение карбоксиконца от аминокислотного остатка 546	24

Пример 2: транзientная трансфекция

Для определения уровней экспрессии фрагментов gE выполняли транзientную трансфекцию в клетки 293 с использованием липофектамина 3000. В каждую лунку 6-луночного планшета вносили 5×10^5 клеток и проводили культивирование. Затем, на следующий день, готовили образцы для трансфекции. 0,2 мкг ДНК и 0,4 мкг Р3000 добавляли в пробирку и затем разбавляли 125 мкл среды орtiMEM; и 3,75 мкл липофектамина 3000 вносили в другую пробирку и затем разводили 125 мкл среды орtiMEM. Разбавленную ДНК переносили в пробирку с равным количеством разведенного

липофектамина 3000. Затем пробирку инкубировали при перемешивании при комнатной температуре в течение 10 мин для приготовления смеси ДНК-липофектамин. После завершения инкубации смесь ДНК-липофектамин добавляли в 6-луночный планшет, содержащий клетки 293, и затем проводили культивирование в термостате с CO₂ в течение 2 суток. После завершения культивирования получали супернатант, к нему добавляли 4 мкл буфера для образцов, содержащего б-меркаптоэтанол, и затем нагревали при 100°C в течение 5 мин. После нагревания полученный продукт хранили замороженным до проведения вестерн-блоттинга.

Пример 3: вестерн-блоттинг

Проводили вестерн-блоттинг для сравнения уровней экспрессии фрагментов gE. Проводили электрофорез каждого образца в геле NuPAGE 4-12% Bis-Tris, и затем переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали в течение 1 ч 5% обезжиренным молоком, инкубировали с моноклональным антителом к gE (1 мкг/мл) в течение 2 ч, промывали TBST (твин 0,05%), и затем инкубировали в течение 1 ч с козым антимышиным IgG-HRP, разбавленным 5000×. Инкубированную мембрану промывали TBST и затем проявляли субстратом ECL. Детектирование проводили на приборе Chemidoc. В результате выполнения вестерн-блоттинга, результаты которого приведены на фиг. 3, было обнаружено, что антигены gE 534 aa, gE 537 aa и gE 540 aa демонстрируют более высокий уровень экспрессии.

Пример 4: сравнение по уровню экспрессии с поверхностным белковым антигеном вируса Varicella zoster, входящего в состав вакцины производства GlaxoSmithKline Biologicals SA

Для сравнения, в отношении уровня экспрессии, поверхностного белкового антигена (GSK gE 546 aa), входящего в состав продукта Shingrix, который в настоящее время является коммерциализированной вакциной против вируса Varicella zoster GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигена (mogam gE 537 aa), полученного заявителями настоящего изобретения, проводили вестерн-блоттинг аналогично тому, как описано в примере 3. Различия между поверхностным белковым антигеном (GSK gE 546 aa), входящим в состав Shingrix производства компании GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигеном (mogam gE 537 aa), полученным заявителями настоящего изобретения, показаны в таблице 2 ниже. В результате выполнения вестерн-блоттинга, результаты которого приведены на фиг. 4, было обнаружено, что антиген, полученный заявителями настоящего изобретения, проявлял более высокий уровень экспрессии, чем поверхностный белковый антиген GlaxoSmithKline Biologicals SA.

Таблица 2

	mogam gE 537 aa	GSK gE 546 aa
Источник	Клада (дикого типа, штамм Dumas)	Клада 3 (дикого типа)
аминокислота 40	T	I
аминокислота 536	L	I

С-концевая	в/м YAAWTGGLA	YAAWTGGLA
------------	---------------	-----------

Пример 5: сравнение по иммуногенности с поверхностным белковым антигеном вируса *Varicella zoster*, входящего в состав вакцины производства GlaxoSmithKline Biologicals SA

Для сравнения, в отношении иммуногенности, поверхностного белкового антигена (GSK gE 546 aa), входящего в состав продукта Shingrix, который в настоящее время является коммерциализированной вакциной против вируса *Varicella zoster* GlaxoSmithKline Biologicals SA, и антигена (mogam gE 537 aa), полученного заявителями настоящего изобретения, проводили эксперимент на животных. С учетом того, что у людей в анамнезе бывает ветряная оспа, для имитации ветряной оспы у мышей, самок мышей C57BL/6 подвергали прайм-иммунизации (праймирование LAV) однократной подкожной инъекцией живой аттенуированной вакцины (LAV, 3000 БОЕ). Через 28 суток после праймирования LAV (сутки 0) мышей подвергали вторичной иммунизации внутримышечной инъекцией антигенной композиции mogam gE или GSK gE с адъювантом или без него. Образцы крови отбирали через 42 суток (на сутки 42) после праймирования LAV для оценки гуморального иммунного ответа на gE; и собирали лейкоциты из образцов селезенки через 42 суток (на сутки 42) после праймирования LAV для оценки клеточно-опосредованного иммунного ответа (СМІ) на gE или VZV. День иммунизации и день отбора образцов крови и селезенки определяли, исходя из дня праймирования LAV, который принимали за сутки 0. Общий экспериментальный метод на животных приведен в таблице 3 ниже.

Таблица 3

Группа	Прайм-иммунизация (праймирование LAV*)	Вторичная иммунизация		День вторичной иммунизации	День отбора образцов крови и селезенки
		антиген	адъювант		
PBS	только PBS	X	X	Сутки 28	Сутки 42
LAV	LAV	LAV (15000 БОЕ)	X		
gE (GSK)	LAV	gE (5 мкг)	X		
gE (mogam)	LAV	gE (5 мкг)	X		
gE (GSK) + адъювант А	LAV	gE (5 мкг)	Адъювант А		
gE (mogam) + адъювант А	LAV	gE (5 мкг)	Адъювант А		

*Прайм-иммунизация (праймирование LAV): доза 100 мкл/голову. 3000 БОЕ

*Вторичная иммунизация: доза 100 мкл/голову

Пример 5-1: сравнение гуморальных иммунных ответов

После выполнения первичной и вторичной иммунизации проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для оценки активности gE антиген-специфического IgG. Рекомбинантные белки gE (1 мкг/мл) вносили в планшеты для постановки ELISA и проводили инкубацию в течение ночи при 4°C для обеспечения их покрытия белковыми антигенами. Каждый из покрытых антигеном планшетов для ELISA промывали три раза и затем блокировали фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 2% бычий сывороточный альбумин (BSA), в течение 1 ч. После завершения реакции блокирования с помощью BSA планшет для ELISA промывали. Затем в него добавляли разбавленный образец сыворотки и проводили инкубацию в течение 2 ч. В планшеты добавляли козьи антимышьиные IgG, IgG1 или IgG2c антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и инкубацию проводили в течение 1 ч. После последней инкубации планшет для ELISA промывали и реакцию HRP развивали добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB, производство KPL), который является субстратом для HRP. Затем добавляли стоп-раствор TMB для остановки реакции HRP, и измеряли оптическую плотность (OD) при 450 нм с использованием ридера для микропланшетов ELISA (Spectramax 250, Molecular Device) для определения количества продуцированных антител. В результате, как показано на фиг. 5, было установлено, что G6, содержащий антиген (mogam gE 537 aa), полученный заявителями настоящего изобретения, и адъювант, имел самую высокую интенсивность люминесценции. На основании этих результатов было обнаружено, что самый высокий гуморальный иммунный ответ был индуцирован на G6.

Пример 5-2: сравнение клеточно-опосредованных иммунных ответов

После выполнения первичной и вторичной иммунизации проводили анализ ELISA IFN- γ для определения секретированного количества IFN- γ , который является репрезентативным цитокином, секретлируемым Т-клетками при стимуляции антигеном. Лейкоциты, отобранные у мышей, стимулировали лизатом VZV в течение 3 суток. Затем проводили центрифугирование для получения супернатанта, и супернатант анализировали с помощью набора для определения мышинового IFN- γ ELISA. Захватывающее IFN- γ антитело (4 мкг/мл) вносили в планшеты для ELISA и проводили инкубацию в течение ночи при комнатной температуре для обеспечения их покрытия захватывающим IFN- γ антителом. Каждый из покрытых антителами планшетов для ELISA промывали три раза и затем блокировали PBS, содержащим 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), в течение 1 ч. После завершения реакции блокирования с помощью BSA планшет для ELISA промывали. Затем в него добавляли супернатант, полученный после стимуляции лейкоцитов, и проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения инкубации планшет для ELISA промывали и проводили инкубацию с биотинилированным антителом для детектирования мышинового IFN- γ (400 нг/мл) при комнатной температуре в течение 2 ч. Проводили промывание, и затем инкубацию со стрептавидином-HRP еще в течение 20 мин. После последней инкубации планшет для ELISA промывали и затем подвергали взаимодействию с раствором субстрата в течение 20

мин при комнатной температуре. В планшет добавляли стоп-раствор для остановки реакции, и затем измеряли оптическую плотность (OD) при 450 нм с использованием ридера для микропланшетов ELISA (Spectramax 250, Molecular Device) для определения количества продуцированного цитокина IFN- γ . В результате, как показано на фиг. 6, было установлено, что G6, содержащий антиген (mogam gE 537 aa), полученный заявителями настоящего изобретения, и адъювант, демонстрировал наибольшее количество цитокина IFN- γ . На основании этих результатов было установлено, что самый высокий клеточно-опосредованный иммунный ответ был индуцирован на G6.

Пример 6: идентификация антигенспецифической иммуногенности фрагментов антигена gE

Пример 6-1: транзистентная трансфекция для продукции антигена

Для экспрессии фрагментов gE выполняли транзистентную трансфекцию в клетки 293 с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ 293. Клетки с титром 2×10^6 клеток/мл помещали в колбу емкостью на 125 мл и культивировали. Затем, на следующий день проводили трансфекцию. Клетки 293 разводили до объема 25,5 мл с титром $2,9 \times 10^6$ клеток/мл и готовили комплексы для трансфекции. 30 мкг ДНК отбирали в пробирку емкостью 15 мл и доводили до объема 1,5 мл средой Opti-MEM. Таким образом, был приготовлен комплекс 1. 81 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 помещали в другую пробирку емкостью 15 мл и доводили до 1,5 мл с помощью среды Opti-MEM. Таким образом, был приготовлен комплекс 2. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Через 5 мин комплекс 1 переносили в пробирку, содержащую комплекс 2, и перемешивали. Затем пробирку инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин для приготовления комплекса ДНК-липид. После завершения инкубации весь комплекс ДНК-липид помещали в колбу емкостью 125 мл, содержащую клетки 293, и проводили культивирование в термостате. Через 20 ч проводили обработку усилителями. 150 мкл усилителя трансфекции 1 ExpiFectamine™ 293 помещали в пробирку емкостью 1,5 мл и добавляли в нее усилитель трансфекции 2 ExpiFectamine™ 293 до 1,5 мл. Затем полученный продукт добавляли к клеткам 293 и проводили инкубацию в термостате в течение 5 суток. Через 5 суток получали культуральный супернатант, фильтровали через фильтр 0,45 мкм и хранили замороженным до очистки.

Пример 6-2: очистка для получения антигенов

Культуральный раствор, который хранился в замороженном состоянии, оттаивали, и к культуральному раствору добавляли равное количество PBS. Фильтрацию проводили с использованием фильтра 0,22 мкм, и затем проводили анионообменную хроматографию. К элюату добавляли 5 М NaCl и проводили хроматографию гидрофобных взаимодействий. Элюат, прошедший хроматографию, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и хранили замороженным до проведения экспериментов на животных.

Пример 6-3: иммунизация

Проводили эксперименты на животных для оценки иммуногенности фрагментов антигена gE. Самкам мышей C57BL/6 внутримышечно вводили фрагменты антигена gE с

интервалом в 2 недели, и образцы крови отбирали у мышей через 2 недели после вторичной иммунизации. Сыворотки отделяли от собранных образцов крови и хранили замороженными до измерения титра антител.

Пример 6-4: измерение антигенспецифической активности IgG и оценка респондеров

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) проводили для оценки антигенспецифической активности IgG. Поверхностные белки VZV (1 мкг/мл) вносили в планшеты для постановки ELISA, проводили инкубацию в течение ночи при 4°C, и каждый из планшетов для ELISA промывали 3 раза. Затем планшет для ELISA блокировали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 2% бычий сывороточный альбумин (BSA), в течение 1 ч. Планшет для ELISA промывали. Затем в планшет добавляли разбавленный образец сыворотки и проводили инкубацию в течение 2 ч. В планшет добавляли козьи антитела против мышинового IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и проводили инкубацию в течение 1 ч. После последней инкубации планшет для ELISA промывали и реакцию HRP развивали добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB), который является субстратом. Затем в планшет для ELISA добавляли стоп-раствор для остановки реакции HRP, и измеряли оптическую плотность (OD) с использованием спектрометра при 450 нм.

Для определения различий в антигенспецифической иммуногенности, индуцированной последовательностями фрагментов антигена gE, животных иммунизировали, как описано в примере 6-3. Титр антигенспецифических антител измеряли с использованием сывороток, полученных в экспериментах на животных, в соответствии с вышеописанным методом измерения титра антител. В результате, как показано на фиг. 7, значение OD после иммунизации gE 534 aa или gE 543 aa было выше, чем значение OD после иммунизации gE 500 aa, gE 510 aa, gE 525 aa или gE 546 aa.

После измерения титра антител особи со значением OD 0,6 или выше считались респондерами, и результаты обобщали. В результате отсутствовал антигенспецифический респондер на gE 500 aa, и количество респондеров после иммунизации gE 510 aa было таким же, как после иммунизации gE 546 aa. Число респондеров после иммунизации gE 525 aa, gE 534 aa, gE 537 aa или gE 540 aa было выше, чем количество респондеров после иммунизации gE 510 aa или gE 546 aa. То есть, было установлено, что для фрагментов от gE 525 aa до gE 540 aa проявляется большее количество респондеров (фиг. 8).

В результате, фрагменты от gE 534 aa до gE 543 aa показали более высокие значения при измерении титра антител, и фрагменты от gE 525 aa до gE 540 aa показали более высокие значения у антигенспецифических респондеров. Следовательно, в случае, когда два вышеуказанных результата объединяются, то можно определить, что gE 534 aa - 540 aa демонстрируют более высокую иммуногенность.

Промышленная применимость

Антигенный вариант поверхностного белка (gE) вируса ветряной оспы по настоящему изобретению представляет собой собой белковый антиген. В случае

применения в качестве вакцинной композиции антигенный вариант демонстрирует превосходную безопасность и высокий уровень экспрессии в клетках-хозяевах по сравнению с живой противовирусной вакциной. Таким образом, данный антигенный вариант пригоден в качестве вакцины для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, вызванных вирусом *Varicella zoster*.

Как указано выше, конкретные части настоящего изобретения были описаны подробно. Однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, что такое конкретное описание предназначено только для иллюстрации предпочтительных вариантов осуществления, и объем настоящего изобретения этим не ограничивается. Следовательно, фактический объем настоящего изобретения будет определяться прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Свободный текст перечня последовательностей

Прилагаемый электронный файл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster*, который включает вариацию, которая представляет собой усечение карбоксиконца от любого аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аминокислотных остатков 525-543 антигена поверхностного белка (gE) вируса *Varicella zoster*, представленного аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

2. Антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по п.1, где аминокислотный остаток 40 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой треонин.

3. Антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по п.1, где аминокислотный остаток 536 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой лейцин.

4. Антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по п.1, где антигенный вариант представлен любой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2-8 и SEQ ID NO: 21-23.

5. Ген, кодирующий антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по любому из пп. 1-4.

6. Ген по п.5, где ген представлен любой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9-15.

7. Рекомбинантный вектор, содержащий:
ген по п.5.

8. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором по п.7.

9. Вакцинная композиция для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, содержащая в качестве активного ингредиента:

антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по любому из пп. 1-4.

10. Способ профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая, включающий:

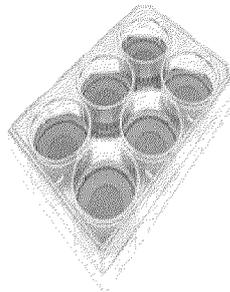
стадию введения пациенту вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по любому из пп. 1-4.

11. Применение вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по любому из пп. 1-4, для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

12. Применение вакцинной композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антигенный вариант поверхностного белка вируса *Varicella zoster* по любому из пп. 1-4, для получения лекарственного средства для профилактики или лечения ветряной оспы или опоясывающего лишая.

ФИГ. 1

клетка 293

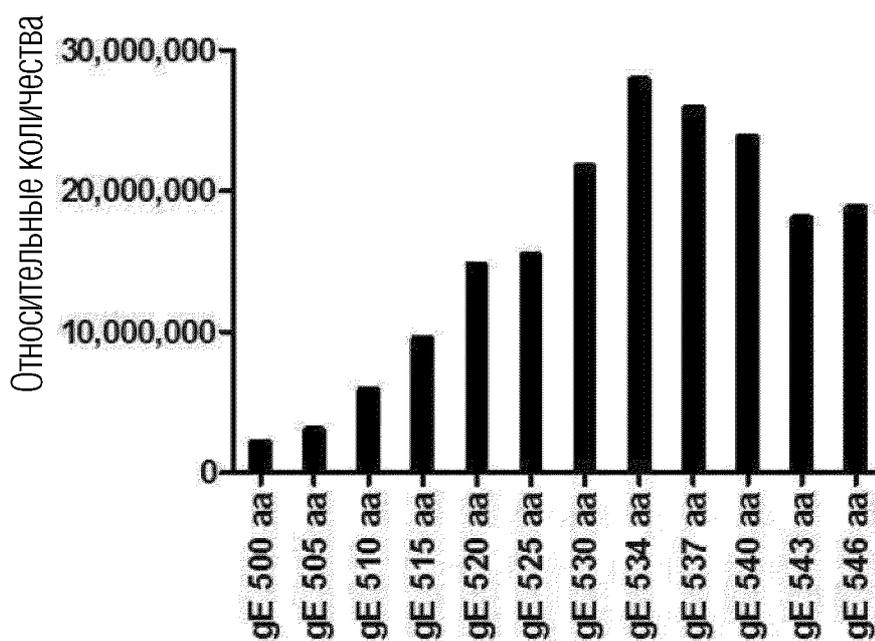


Трансфекция ДНК
 - 0,2 мкг

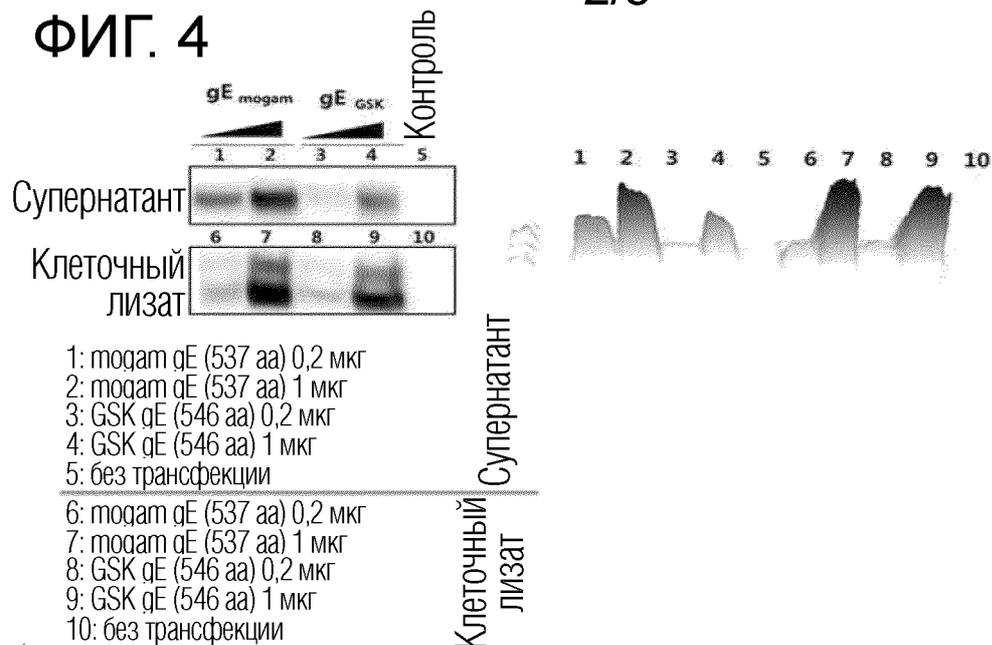
ФИГ. 2

	386	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540
gE 500 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 505 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 510 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 515 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 520 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 525 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 530 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 534 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 537 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 540 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 543 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																
gE 546 aa	TCQFMHLVSTCLYHFNAPQCLSDMNSGCTFTSPHLAQVASTVYQNCENADNYTAYCIGISNMEPSFGLIHDGGTLLKPVDTPELSGLYVFTVYFNHVEAVAYTVSTVDHFVMAIEERGFPTTACPPATTFPHLITFVNHGTSPLLRVAANTGGLA																

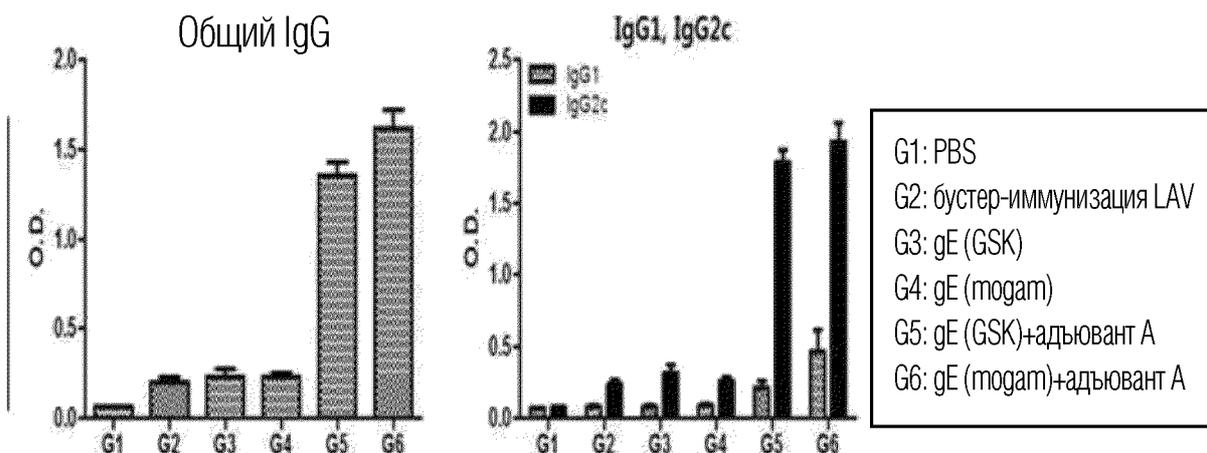
ФИГ. 3



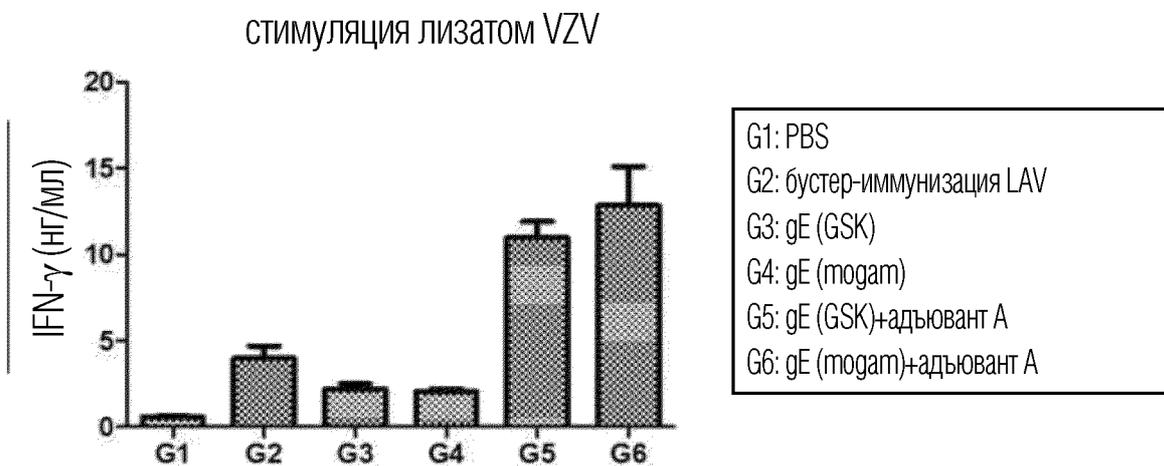
ФИГ. 4



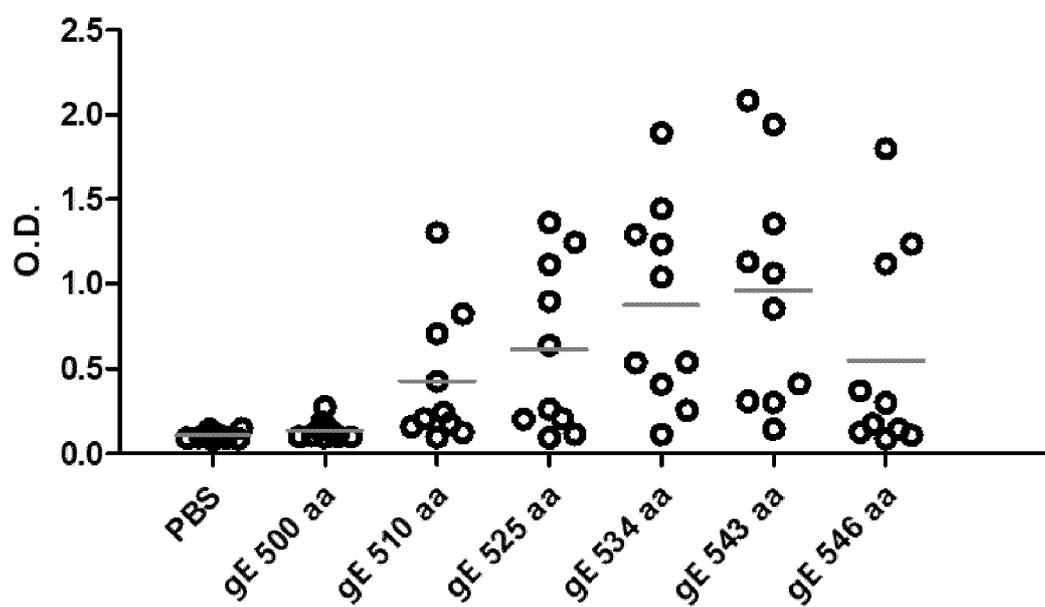
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

