

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202193119** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.02.18**

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.05.14**

(54) **ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ, ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА**

(31) **62/848,186**

(32) **2019.05.15**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2020/063408**

(87) **WO 2020/229579 2020.11.19**

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Каллендре Бенуа Кристоф Стефан,  
Садофф Джеральд С. (NL), Де Папе  
Элс (BE)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Описаны способы индуцирования защитного иммунного ответа против респираторно-синцициального вируса (RSV) и способы предупреждения инфекции и/или репликации RSV без индуцирования тяжелого нежелательного явления у субъектов-людей. Способы включают введение субъектам эффективного количества аденовирусного вектора, кодирующего рекомбинантный F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.



202193119

A1

A1

202193119

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571282EA/042

### **ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ, ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА**

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к вакцинам на основе аденовируса и путям их применения для профилактического лечения инфекции, вызванной респираторно-синцициальным вирусом (RSV).

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Респираторно-синцициальный вирус (RSV) считается наиболее важной причиной развития тяжелых острых респираторных заболеваний у младенцев и детей в возрасте до 5 лет (Hall, et al., *N Engl J Med.* 2009;360;588-598; Shay et al., *JAMA.* 1999;282;1440-1446; Stockman et al., *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31;5-9). Ежегодно RSV обуславливает около 3,4 миллиона случаев госпитализации по всему миру. Каждый год в Соединенных Штатах Америки инфекция, вызванная RSV, является причиной от 57000 до 175000 случаев госпитализации, 500000 обращений в отделение неотложной помощи и приблизительно 500 смертельных исходов у детей в возрасте до 5 лет (Paramore et al., *Pharmacoeconomics.* 2004;22;275-284; Shay et al., *JAMA.* 1999;282;1440-1446; Stockman et al., *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31;5-9). В США 60% младенцев инфицируются при первом контакте с RSV (Glezen et al., *Am J Dis Child.* 1986;140;543-546), и почти все дети будут инфицированы вирусом к 2-3 годам. Иммуитет к RSV является временным, и повторное инфицирование происходит на протяжении всей жизни (Hall et al., *J Infect Dis.* 1991;163;693-698). У детей в возрасте до 1 года RSV представляет собой наиболее важную причину развития бронхоолита, и уровень госпитализации при инфекции RSV наиболее высок среди детей в возрасте до 6 месяцев (Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV) - Infection and Incidence*; доступна по ссылке <http://www.cdc.gov/rsv/about/infection.html> (дата последнего доступа 2 июня 2016 года); Hall, et al., *N Engl J Med.* 2009;360;588-598). Почти все связанные с RSV смертельные исходы (99%) у детей в возрасте до 5 лет наблюдаются в развивающихся странах (Nair et al., *Lancet.* 2010;375;1545-1555). Тем не менее, в развитых странах уровень заболеваемости, обусловленный RSV, является значительным, при этом инфекция, вызванная RSV, перенесенная в детстве, связана с развитием бронхолегочной обструкции, гиперреактивности дыхательных путей и астмы (Peebles et al., *J Allergy Clin Immunol.*

2004;113;S15-18; Regnier and Huels, *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32;820-826; Sigurs et al., *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171;137-141; Simoes et al., *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126;256-262; Simoes et al., *J Pediatr.* 2007;151;34-42, 42 e31).

Наряду с поражением детей, RSV является важной причиной развития респираторных инфекций у пожилых людей, лиц с ослабленным иммунитетом и у лиц, страдающих хроническими сердечно-легочными заболеваниями (Falsey et al., *N Engl J Med.* 2005;352;1749-1759). Согласно оценкам, в учреждениях по оказанию долгосрочного ухода инфицированию RSV подвергаются 5-10% проживающих в год, что сопровождается значительными уровнями развития пневмонии (10-20%) и смертельного исхода (2-5%) (Falsey et al., *Clin Microbiol Rev.* 2000;13;371-384). В ходе одного эпидемиологического исследования заболеваемости, обусловленной RSV, было подсчитано, что в США от RSV ежегодно умирают 11000 пожилых людей (Thompson et al., *JAMA.* 2003;289;179-186). Эти данные подтверждают важность разработки эффективной вакцины для определенных групп взрослого населения.

Способ профилактики путем пассивной иммунизации с применением нейтрализующего моноклонального антитела к гликопротеину слияния (F) RSV (Synagis® [паливизумаб]) является доступным, однако он показан для применения только у недоношенных младенцев (с гестационным возрастом менее 29 недель), детей с тяжелым сердечно-легочным заболеванием или лиц, которые имеют глубоко ослабленный иммунитет (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics.* 2014;134;415-420). Было показано, что Synagis снижает риск госпитализации на 55% (Prevention. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. *Pediatrics.* 1998;102;1211-1216).

Несмотря на высокий уровень заболеваемости и активный интерес к разработке вакцины против RSV, разрешенная для применения вакцина против RSV отсутствует. В конце 1960-х годов была начата серия исследований по оценке инактивированной формалином вакцины против RSV (FI-RSV), содержащей квасцы в качестве адьюванта, и результаты данных исследований оказали большое влияние на область науки, изучающей вакцину против RSV. Четыре исследования проводили параллельно с участием детей из разных возрастных групп, где вакцина FI-RSV доставлялась посредством внутримышечной инъекции (Chin et al., *Am J Epidemiol.* 1969;89;449-463; Fulginiti et al., *Am*

J Epidemiol. 1969;89;435-448; Kapikian et al., Am J Epidemiol. 1969;89;405-421; Kim et al., Am J Epidemiol. 1969;89;422-434). Восьмидесяти процентам реципиентов FI-RSV, инфицированных RSV, потребовалась госпитализация, и двое детей умерли в течение следующего зимнего периода (Chin et al., Am J Epidemiol. 1969;89;449-463). Только 5% детей из контрольной группы, инфицированной RSV, потребовалась госпитализация. Механизмы развития наблюдаемого усиленного респираторного заболевания (ERD) среди реципиентов FI-RSV при повторном инфицировании были исследованы и, как полагают, являются результатом aberrантного иммунного ответа в контексте бронхов малого диаметра, присутствующих в данной возрастной группе. Данные, полученные в результате анализа образцов, полученных от пациентов, и животных моделей, позволяют предположить, что вызванное FI-RSV ERD характеризуется низкими титрами нейтрализующих антител, наличием антител, отличных от нейтрализующих, характеризующихся низкой авидностью, способствующих отложению иммунных комплексов в дыхательных путях, снижением примирования цитотоксических CD8+ Т-клеток, имеющего доказанную важность для элиминации вируса, и усилением перекоса ответов в сторону CD4+ Т-хелперов 2 типа (Th2) с признаками эозинофилии (Beeler et al., Microb Pathog. 2013;55;9-15; Connors et al., J Virol. 1992;66;7444-7451; De Swart et al., J Virol. 2002;76;11561-11569; Graham et al., J Immunol. 1993;151;2032-2040; Kim et al., Pediatr Res. 1976;10;75-78; Murphy et al., J Clin Microbiol. 1986;24;197-202; Murphy et al., J Clin Microbiol. 1988;26;1595-1597; Polack et al., J Exp Med. 2002;196;859-865). Считается, что химическое взаимодействие формалина и белковых антигенов RSV может представлять собой один из механизмов, посредством которого вакцина FI-RSV способствовала развитию ERD при последующем инфицировании RSV (Moghaddam et al., Nat Med. 2006;12;905-907). По данным причинам формалин больше не используется в разработке вакцины против RSV.

Наряду с вакциной FI-RSV, несколько живых аттенуированных и субъединичных вакцин против RSV исследовали на животных моделях и в ходе исследований с участием людей, но многие из них были запрещены по причине отсутствия возможности достичь надлежащего баланса безопасности и иммуногенности/эффективности. Разработка живых аттенуированных вакцин особенно усложнялась из-за трудностей, связанных с чрезмерной и недостаточной аттенуацией у младенцев (Belshe et al., J Infect Dis. 2004;190;2096-2103; Karron et al., J Infect Dis. 2005;191;1093-1104; Luongo et al., Vaccine. 2009;27;5667-5676). Что касается субъединичных вакцин, белок слияния (F) и белок гликопротеина (G) RSV, оба из которых являются мембранными белками, представляют собой единственные белки RSV, которые индуцируют выработку нейтрализующих

антител (Shay et al., JAMA. 1999;282;1440-1446). В отличие от G-белка RSV, F-белок является консервативным среди штаммов RSV. Разнообразные вакцины на основе F-субъединицы RSV были разработаны на основе известной превосходной иммуногенности, обеспечения защитного иммунитета и высокой степени консервативности F-белка среди штаммов RSV (Graham, Immunol Rev. 2011;239;149-166). Доказательство концепции, обеспеченное с помощью доступного в настоящее время способа профилактики с применением нейтрализующих моноклональных антител к F-белку, поддерживает идею о том, что вакцина, индуцирующая высокие уровни нейтрализующих антител длительного действия, может предупреждать развитие заболевания, вызванного RSV (Feltus et al., Pediatr Res. 2011;70;186-191; Groothuis et al., J Infect Dis. 1998;177;467-469; Groothuis et al., N Engl J Med. 1993;329;1524-1530). В ходе нескольких исследований было сделано предположение, что снижение защиты против RSV у пожилых людей может быть обусловлено связанным с возрастом снижением выработки интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), снижением соотношения CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток и уменьшением количества циркулирующих специфических в отношении RSV CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (De Bree et al., J Infect Dis. 2005;191;1710-1718; Lee et al., Mech Ageing Dev. 2005;126;1223-1229; Looney et al., J Infect Dis. 2002;185;682-685). Высокие уровни сывороточного нейтрализующего антитела связаны с развитием менее тяжелых инфекций у пожилых людей (Walsh и Falsey, J Infect Dis. 2004;190;373-378). Также было продемонстрировано, что после инфицирования RSV у взрослых титры сывороточных антител быстро повышаются, но затем медленно возвращаются к уровням до инфицирования через 16-20 месяцев (Falsey et al., J Med Virol. 2006;78;1493-1497). Принимая во внимание наблюдаемое ранее развитие ERD в ходе исследований вакцины FI-RSV в 1960-х годах, будущие вакцины должны способствовать развитию сильного антигенспецифического ответа с участием CD8<sup>+</sup> Т-клеток и предупреждать развитие перекоса ответа в сторону CD4<sup>+</sup> Т-клеток типа Th2 (Graham, Immunol Rev. 2011;239;149-166).

F-белок RSV обеспечивает слияние мембран вируса и клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Структуры обеих конформаций были определены для F-белка RSV (McLellan et al., Science 2013;342, 592-598; McLellan et al., Nat Struct Mol Biol 2010;17, 248-250; McLellan et al., Science 340, 2013:1113-1117; Swanson et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011;108, 9619-9624), а также для белков слияния из родственных парамиксовирусов, что обеспечивает понимание механизма данного сложного аппарата по осуществлению слияния. Подобно

другим белкам слияния типа I, для неактивного предшественника, F0 RSV, требуется расщепление с помощью фуриноподобной протеазы в ходе внутриклеточного созревания. RSV F0 содержит два сайта расщепления фурином (например, между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137 F0 RSV под номером доступа в Genbank ACO83301), которое приводит к образованию трех полипептидов: F2, p27 и F1, при этом последний содержит гидрофобный пептид слияния (FP) на своем N-конце. Для рефолдинга из конформации до слияния в конформацию после слияния участок рефолдинга 1 (RR1), находящийся между остатками 137 и 216, который включает FP и гептадный повтор A (HRA), подлежит трансформации из сборки в виде спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. FP, расположенный на N-концевом сегменте RR1, в дальнейшем способен вытягиваться от вирусной мембраны и встраиваться в проксимальный участок мембраны целевой клетки. Затем участок рефолдинга 2 (RR2), который образует C-концевую петлю в шиповидном отростке F-белка до слияния и включает гептадный повтор B (HRB), перемещается на другую сторону головки F-белка RSV и связывает суперспиральный тример HRA с доменом HRB с образованием пучка из шести спиралей. Образование суперспиральной структуры RR1 и перемещение RR2 с образованием пучка из шести спиралей представляют собой наиболее важные структурные изменения, которые происходят в ходе процесса рефолдинга.

Большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови человека направлены против конформации до слияния, однако из-за ее нестабильности конформация до слияния характеризуется склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов. Описаны F-полипептиды RSV, стабилизированные в конформации до слияния. См., например, WO 2014/174018, WO 2014/202570 и WO 2017/174564. Однако сообщение о безопасности, эффективности/иммуногенности таких полипептидов у людей отсутствует. Существует потребность в безопасной и эффективной вакцине против RSV.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В одном общем аспекте в настоящей заявке описан способ индуцирования защитного иммунного ответа против инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий внутримышечное введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащей аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния, при этом эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно

$1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор является неспособным к репликации и содержит делецию в по меньшей мере одном из аденовирусного раннего участка 1 (участка E1) и раннего участка 3 (участка E3).

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad26, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad35, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный F-полипептид RSV, кодируемый аденовирусным вектором, имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-полипептид RSV, содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции содержит приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, после начального введения.

В определенных вариантах осуществления субъект является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта при воздействии RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV.

В определенных вариантах осуществления введение не вызывает развития какого-

либо тяжелого нежелательного явления.

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения инфекции и/или репликации RSV без индуцирования тяжелого нежелательного эффекта у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающим профилактическое внутримышечное введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, при этом аденовирусный вектор является неспособным к репликации.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad26, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-полипептид RSV, содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции содержит приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, после начального введения.

В определенных вариантах осуществления субъект является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта при воздействии RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

В определенных вариантах осуществления защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Вышеизложенное краткое описание, а также следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, однако, что настоящая заявка не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На фигуре 1 показаны коробчатые диаграммы AUC вирусной нагрузки, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, для выборки, подлежащей контрольному заражению, где р-значение рассчитывали с помощью точного критерия суммы рангов Уилкоксона.

На фигуре 2 показана вирусная нагрузка, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, с течением времени для выборки, подлежащей контрольному заражению, где показано среднее значение +/- SE.

На фигуре 3 показаны коробчатые диаграммы пиковой вирусной нагрузки, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, для выборки, подлежащей контрольному заражению, где р-значение рассчитывали с помощью точного критерия суммы рангов Уилкоксона.

На фигуре 4 показана вирусная нагрузка, которую определяли посредством количественного анализа культуры RSV из образцов назального смыва, с течением времени для выборки, подлежащей контрольному заражению, где показано среднее значение +/- SE.

На фигуре 5 показаны коробчатые диаграммы AUC вирусной нагрузки, которую определяли посредством количественного анализа культуры RSV из образцов назального смыва, для выборки, подлежащей контрольному заражению, где р-значение рассчитывали с помощью точного критерия суммы рангов Уилкоксона.

На фигуре 6 показано общее количество баллов по шкале оценки клинических симптомов с течением времени для выборки, подлежащей контрольному заражению, где показано среднее значение +/- SE.

На фигуре 7 показаны коробчатые диаграммы AUC общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов для выборки, подлежащей контрольному заражению, где р-значение рассчитывали с помощью точного критерия суммы рангов Уилкоксона.

На фигуре 8 показаны форест-диаграммы процентной доли субъектов с симптоматической инфекцией, вызванной RSV, и разницы средних значений (с соответствующим 95% CI) между группами, получавшими Ad26.RSV.preF и плацебо, для двух определений инфекции, вызванной RSV, для выборки, подлежащей контрольному

заражению, где разницу в % инфицированных рассчитывали по методу оценки Уилсона.

На фигуре 9 показаны коробчатые диаграммы AUC VL, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, сгруппированных по определению симптоматической инфекции, вызванной RSV, для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 10 показаны коробчатые диаграммы AUC VL, которую определяли посредством количественного анализа культуры RSV из образцов назального смыва, сгруппированных по определению симптоматической инфекции, вызванной RSV, для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 11 показаны коробчатые диаграммы AUC общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов, сгруппированных по определению симптоматической инфекции, вызванной RSV, для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 12 показан вес слизи, выработанной с течением времени, для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 13 показано количество бумажных носовых платков, использованных с течением времени, для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 14 показаны коробчатые диаграммы AUC веса слизи, выработанной от исходного уровня до завершения участия, для выборки, подлежавшей контрольному заражению, где р-значение рассчитывали с помощью точного критерия суммы рангов Уилкоксона.

На фигуре 15 показан ответ в виде сывороточного антитела IgG к Pre-F, который оценивали посредством ELISA, с течением времени для выборки для анализа иммуногенности без отклонений от протокола, где показаны средние геометрические значения титров с 95% CI, и где N представляет собой количество субъектов с данными на исходном уровне.

На фигуре 16 показаны титры нейтрализующих антител к штамму A2 RSV с течением времени для выборки для анализа иммуногенности без отклонений от протокола, где показаны средние геометрические значения титров с 95% CI, и где N представляет собой количество субъектов с данными на исходном уровне.

На фигуре 17 показана диаграмма рассеяния AUC вирусной нагрузки, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, по сравнению с титрами нейтрализующих антител к штамму A2 RSV для выборки, подлежавшей контрольному заражению.

На фигуре 18 показан ответ в виде сывороточного антитела IgG к Pre-F, который

оценивали посредством ELISA, через 28 дней после вакцинации, сгруппированный по определению симптоматической инфекции, вызванной RSV, для выборки для анализа иммуногенности без отклонений от протокола; и

на фигуре 19 показаны титры нейтрализующих антител к штамму A2 RSV через 28 дней после вакцинации, сгруппированные по определению симптоматической инфекции, вызванной RSV, для выборки для анализа иммуногенности без отклонений от протокола.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из данных литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист средней квалификации в области, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании.

Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает все значения в диапазоне от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Таким же образом диапазон концентраций от 1% до 10% (вес/об.) включает диапазон от 0,9% (вес/об.) до 11% (вес/об.). Как используется в данном документе, применение числового диапазона однозначно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии.

Специалистам в данной области будет известно или же они смогут установить с помощью постановки стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления описанного в данном документе настоящего изобретения. Такие эквиваленты подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением.

В данном контексте подразумевается, что термины "предусматривает", "предусматривающий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит", "содержащий" или любые другие их вариации означают, что они охватывают указанное целое число или группу целых чисел, но не исключают любые другие целые числа или группу целых чисел, и подразумевается, что они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, содержащие перечень элементов, не обязательно ограничиваются только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса, способа, изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, "или" относится к включающему или, а не исключающему или. Например, условию А или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или в наличии), и оба А и В истинны (или в наличии).

Термины "приблизительно", "примерно", "как правило", "по сути" и подобные им, используемые в данном контексте в отношении размера или свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как указывающие на то, что описываемый размер/свойство не представляет собой строго установленное ограничение или параметр и не исключает небольшие отклонения от него, которые функционально являются идентичными или сходными, как это будет понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовые параметры, будут включать вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в области техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при производстве и т. п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

В настоящем изобретении предусмотрены способы индуцирования защитного иммунного ответа против инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающие внутримышечное введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащей аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

Используемые в данном документе термины "белок слияния RSV", "F-белок RSV", "полипептид слияния RSV" или "F-полипептид RSV" относятся к белку слияния (F) из любой группы, подгруппы, изолята, типа или штамма респираторно-синцитиального вируса (RSV). RSV встречается в виде одного серотипа, включающего две антигенных подгруппы, А и В. Примеры F-белка RSV включают без ограничения F RSV из А RSV, например, F-белок А1 RSV и F-белок А2 RSV, и F RSV из В RSV, например, F-белок В1 RSV и F-белок В2 RSV. Используемый в данном документе термин "F-белок RSV" включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного F-белка RSV дикого типа.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-полипептиды RSV, которые стабилизированы в конформации до слияния, получены из штамма А RSV. В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV получены из штамма А2 RSV. F-полипептиды RSV, которые стабилизированы в конформации до слияния, которые являются применимыми в настоящем изобретении, представляют собой F-белки RSV, содержащие по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-белком RSV дикого типа, в частности, по сравнению с F-белком RSV, имеющим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-полипептиды RSV, которые стабилизированы в конформации до слияния, которые являются применимыми в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из K66E, N67I, I76V, S215P, K394R, S398L, D486N, D489N и D489Y.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-полипептиды RSV, которые стабилизированы в конформации до слияния, содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфическим в отношении конформации до слияния, например, CR9501. CR9501 содержит связывающие участки антител, упоминаемые как 58C5 в WO 2011/020079 и WO 2012/006596, которые специфически связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния.

В конкретных вариантах осуществления F-полипептиды RSV дополнительно содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с усеченным доменом F1, что описано в WO 2014/174018 и WO 2014/202570. Как используется в данном документе, "усеченный" домен F1 относится к домену F1, который не является полноразмерным доменом F1, т. е. при этом на N-конце или C-конце были подвергнуты делеции один или несколько аминокислотных остатков. В соответствии с конкретными вариантами осуществления по меньшей мере трансмембранный домен и цитоплазматический хвост

подвергают делеции для обеспечения экспрессии продукта в виде растворимого эктодомена. В определенных вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 2 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV либо непосредственно, либо посредством линкера. В определенных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SAIG (SEQ ID NO: 3).

Примеры F-белков RSV, стабилизированных в конформации до слияния, включают без ограничения таковые, описанные в WO 2014/174018, WO 2014/202570 и WO 2017/174564, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 95%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

Примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей F-белок RSV, стабилизированный в конформации до слияния, включают SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7. Специалисту в данной области будет понятно, что несколько различных молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же полипептид по причине вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут с применением стандартных методик осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидами, описанными в данном документе для отражения частоты применения кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды должны экспрессироваться. Следовательно, если не указано иное, то выражение "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать интроны. В данном документе последовательности приведены в направлении от 5' до 3', как принято в данной области.

Используемый в данном документе термин "вакцина" относится к композиции, содержащей активный компонент, который является эффективным в отношении индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета против определенного патогена или заболевания, что приведет по меньшей мере к снижению, и вплоть до полного отсутствия, тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, связанных с инфекцией, вызванной патогеном, или заболеванием. Согласно настоящему изобретению вакцина содержит аденовирус, содержащий нуклеиновую кислоту,

кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния. В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки вакцина может применяться для предупреждения развития тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижения частоты развития осложнений, таких как пневмония и бронхиолит, обусловленных инфекцией и репликацией RSV у субъекта. В определенных вариантах осуществления вакцина может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют защитный иммунный ответ, например, в отношении других белков RSV и/или других возбудителей инфекции. Введение дополнительных активных компонентов можно осуществлять, например, путем отдельного введения или путем введения комбинированных продуктов на основе вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

В данном контексте термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфицирование патогенным возбудителем, в отношении которого была проведена вакцинация. Обычно у субъекта, у которого выработался "защитный иммунный ответ", развиваются только клинические симптомы от легкой до умеренной степени тяжести или симптомы вовсе не развиваются. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" в отношении определенного возбудителя или "защитный иммунитет" к нему, не погибает в результате инфицирования данным возбудителем.

Используемый в данном документе термин "индуцировать" и его варианты относятся к любому измеряемому повышению клеточной активности. Индуцирование защитного иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию или созревание популяции иммунных клеток, увеличение выработки цитокина и/или другой индикатор усиления иммунной функции. В определенных вариантах осуществления индуцирование иммунного ответа может включать усиление пролиферации В-клеток, продуцирующих антигенспецифические антитела, усиление пролиферации антигенспецифических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или увеличение уровня экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

Способность индуцировать защитный иммунный ответ против F-белка RSV можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием ряда анализов, которые являются стандартными в данной области техники. Общее описание имеющихся методик для оценки начала проявления 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 выполнять способами, хорошо известными из уровня техники, например, путем измерения профилей цитокина, секретируемого активированными эффекторными клетками, в том числе клетками, происходящими из CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (например, путем количественного определения клеток, продуцирующих IL-4 или IFN гамма, с помощью ELISPOT), путем измерения пролиферации РВМС, путем измерения активности НК-клеток, путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, с помощью анализов пролиферации Т-клеток на основе классического поглощения [3H]-тимидина), путем анализа на наличие антигенспецифических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного субъекта (например, определение пептидспецифического лизиса в анализе цитотоксичности и т. д.). Кроме того, уровень клеток, секретирующих антитела IgG и IgA, с маркерами хоминга для локальных участков, которые могут указывать на миграцию в ткани кишечника, легкого и носа, может быть измерен в крови в разные моменты времени после иммунизации как показатель местного иммунитета, и уровень антител IgG и IgA может быть измерен в выделениях из носа; может быть определена характеристика функции Fc антител и измерения уровня взаимодействия антител с клетками, такими как PMN, макрофаги и НК-клетки, или с системой комплемента; анализ результата секвенирования РНК одиночной клетки может быть использован для анализа репертуаров В-клеток и Т-клеток.

Способность индуцировать защитный иммунный ответ против F-белка RSV может быть определена путем тестирования биологического образца (например, назального смыва, крови, плазмы крови, сыворотки крови, РВМС, мочи, слюны, фекалий, спинномозговой жидкости, жидкости, полученной при проведении бронхоальвеолярного лаважа, или лимфы) от субъекта на наличие антител, например, антител IgG или IgM, направленных на F-белок(белки) RSV, вводимых в композиции, например, нейтрализующего вирус антитела к A2 RSV (VNA A2), VNA RSV A Memphis 37b, RSV B, антител к pre-F, антител к post-F (см., например, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, могут быть измерены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), других анализов на основе ELISA (например, MSD-Meso Scale Discovery), дот-блоттинга, гелей для SDS-PAGE, ELISPOT, измерения уровня взаимодействия Fc с комплементом, PMN, макрофагами и НК-клетками, при усилении посредством комплемента и без него, или анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). Иллюстративные способы описаны в примере 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления индуцированный иммунный ответ

характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления защитный иммунный ответ характеризуется присутствием нейтрализующих антител к RSV и/или наличием защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых через 8-35 дней после введения фармацевтической композиции, например, через 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней после введения фармацевтической композиции.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта и/или отсутствием или снижением нежелательных эффектов инфекции, вызванной RSV, при воздействии RSV по сравнению с таковыми у субъекта, которому не вводили фармацевтическую композицию, при воздействии RSV. Способность предупреждать или снижать вирусную нагрузку, обусловленную RSV, может быть определена, например, посредством расчета площади под кривой зависимости вирусной нагрузки от времени (VL-AUC в  $\log_{10}$  копий/мл) RSV, как определено посредством количественного анализа RT-PCR или посредством количественного анализа культуры из образцов назального смыва. Иллюстративные способы описаны в примере 1.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV. Клинические симптомы, вызванные RSV, включают, например, симптомы со стороны верхних дыхательных путей, в том числе, например, насморк, заложенность носа, чихание, боль в горле, боль в ухе; симптомы со стороны нижних дыхательных путей, в том числе, например, кашель, одышку, чувство стеснения в груди, свистящее дыхание, выделение мокроты; и системные симптомы, в том числе, например, недомогание, головную боль, боль в мышцах и/или суставах, озноб/жар.

Используемый в данном документе термин "нежелательное явление" (AE) относится к любому нежелательному медицинскому явлению у субъекта, которому вводят фармацевтический продукт, и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с лечением. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения AE оценивают по 4-балльной шкале возрастания степени тяжести с использованием следующих определений. Легкая (1 степень): отсутствие нарушения активности; умеренная (2 степень): некоторое нарушение активности, не требующее медицинского вмешательства; тяжелая (3 степень): нарушение повседневной активности и

необходимость медицинского вмешательства; потенциально угрожающая жизни (4 степень): наличие симптомов, обуславливающих неспособность выполнять основные функции самообслуживания, или наличие показаний для медицинского или оперативного вмешательства для предупреждения необратимого нарушения функции, стойкая утрата трудоспособности. "Тяжелое нежелательное явление", "тяжелое АЕ", "SAE" может представлять собой любое АЕ, возникающее при введении любой дозы, которое приводит к любому из следующих исходов: смерти, где смерть является исходом, а не явлением; угрожающему жизни явлению, относящемуся к событию, при котором пациент подвергается риску смертельного исхода во время события; оно не относится к событию, которое гипотетически могло бы вызвать смертельный исход, если бы было более тяжелым; госпитализации в стационарное отделение, т. е. внеплановой госпитализации, госпитализации для наблюдения в течение ночи или продлению текущей госпитализации; стойкой или значительной утрате трудоспособности или существенному нарушению способности осуществлять нормальную жизнедеятельность; врожденной аномалии/врожденному пороку; важному медицинскому явлению (по мнению исследователя), которое может представлять опасность для пациентов или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предупреждения одного из других исходов, перечисленных выше (например, интенсивной терапии в отделении неотложной помощи или на дому по поводу аллергического бронхоспазма, или патологических изменений крови, или судорог, которые не приводят к госпитализации). Госпитализация представляет собой официальное поступление в больницу. Госпитализация или продление госпитализации представляют собой критерии тяжести АЕ; однако сами по себе они не считаются SAE. При отсутствии АЕ госпитализация или продление госпитализации не считаются SAE. Это может иметь место в следующих ситуациях: госпитализация или продление госпитализации необходимы для выполнения процедуры, требуемой протоколом; или госпитализация или продление госпитализации являются частью стандартной процедуры, соблюдаемой центром (например, удаление стента после хирургического вмешательства). Госпитализация с целью планового лечения ранее имеющегося состояния, которое не ухудшилось во время исследования, не считается АЕ. Осложнения, возникающие во время госпитализации, представляют собой АЕ. Если развитие осложнения обуславливает продление госпитализации или соответствует любому из других критериев SAE, то явление представляет собой SAE.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Выбор конкретной эффективной дозы

может быть определен (например, посредством клинических испытаний) специалистами в данной области на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, которое подлежит лечению или предупреждению, связанные с ним симптомы, массу тела пациента, состояние иммунитета пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза для применения в составе также будет зависеть от способа введения, пути введения, целевого участка, физиологического состояния пациента, других вводимых лекарственных препаратов и степени тяжести заболевания. Например, эффективное количество фармацевтической композиции также зависит от того, вводится ли также адъювант, при этом при отсутствии адъюванта требуются более высокие дозировки.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное количество фармацевтической композиции включает количество фармацевтической композиции, достаточное для индуцирования защитного иммунного ответа против F-белка RSV без индуцирования тяжелого нежелательного явления. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

Предпочтительно рекомбинантный F-полипептид RSV имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор относится к серотипу 26, как, например, рекомбинантный Ad26.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект-человек является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV. В определенных вариантах осуществления субъект-человек, который является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV, включает без ограничения субъекта-человека пожилого возраста, например, субъекта-человека в возрасте  $\geq 50$  лет,  $\geq 60$  лет, предпочтительно  $\geq 65$  лет; субъекта-человека молодого возраста, например, субъекта-человека в возрасте  $\leq 5$  лет,  $\leq 1$  года; и/или субъекта-человека, который госпитализирован, или субъекта-человека, который получал лечение противовирусным соединением, но показал неадекватный противовирусный ответ. В определенных вариантах осуществления субъект-человек, который является восприимчивым к инфекциям, вызванным RSV, включает без ограничения субъекта-человека с хроническим заболеванием сердца, хроническим заболеванием легких и/или видами иммунодефицита.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтическая композиция содержит аденовирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека, также называемый рекомбинантными аденовирусными векторами. Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе по отношению к аденовирусу, подразумевает, что он был модифицирован человеком, например, он имеет измененные концевые участки, активно клонированные в него, и/или он содержит гетерологичный ген, т. е. он не является встречающимся в природе аденовирусом дикого типа.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор по настоящему изобретению является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену из участка E1, например, участка E1a и/или участка E1b, аденовирусного генома, который требуется для репликации вируса. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор по настоящему изобретению является дефектным по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно важным. В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену из участка E1 и по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно важным. В аденовирусном векторе

может иметь место "множественный дефицит", что означает, что аденовирусный вектор является дефектным по одному или нескольким существенно важным функциональным генам из каждого из двух или более участков аденовирусного генома. Например, вышеупомянутые аденовирусные векторы, дефектные по E1 или дефектные по E1 и E3, могут дополнительно являться дефектными по меньшей мере по одному существенно важному гену из участка E4 и/или по меньшей мере по одному существенно важному гену из участка E2 (например, участка E2A и/или участка E2B).

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913 и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", главы 67 и 68 соответственно, в *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), а также в других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов предусматривает использование стандартных молекулярно-биологических методик, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также в других источниках, упомянутых в данном документе.

В определенных вариантах осуществления аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26 или 35.

Получение векторов на основе rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., *Virol.* 2007:81(9): 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 представлены в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Получение векторов на основе rAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al, *J Virol.* 2003:77(15): 8263-71. Иллюстративные последовательности генома Ad35 представлены в GenBank под номером доступа AC 000019 и на фиг. 6 в WO 00/70071.

Рекомбинантный аденовирус по настоящему изобретению может являться компетентным по репликации или дефектным по репликации. В определенных вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например, по причине того, что он содержит делецию в участке E1 генома. Как известно специалисту в данной области, в случае делеций существенно важных участков в геноме аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими участками, должны быть обеспечены в

транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, т. е. если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, быть встроенными в ее геном или находиться в виде так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательных плазмид. Аденовирус также может содержать делецию в участке E3, который не является существенным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует компенсировать.

В определенных вариантах осуществления аденовирус представляет собой не способный к репликации аденовирус. В соответствии с конкретными вариантами осуществления аденовирус представляет собой не способный к репликации аденовирус Ad26. В соответствии с конкретными вариантами осуществления аденовирус представляет собой не способный к репликации аденовирус Ad35.

Клетка-продуцент (также иногда упоминаемая в уровне техники и в данном документе как "пакующая клетка", или "дополняющая клетка", или "клетка-хозяин"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение рекомбинантных аденовирусных векторов осуществляют в клетках-продуцентах, которые компенсируют дефекты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты содержат в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса и, таким образом, они способны к компенсации дефектов рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно использовать любую E1-дополняющую клетку-продуцент, например, клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с помощью E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см. патент США № 5994128), E1-трансформированные амниоциты (см. патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao et al., Human Gene Therapy 2000:11: 213-219), 293 и т. п. В определенных вариантах осуществления клетки-продуценты представляют собой, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т. п.

Для дефектных по E1 аденовирусов, не относящихся к подгруппе C, таких как Ad35 (подгруппа B) или Ad26 (подгруппа D), предпочтительной является замена кодирующей последовательности E4-orf6 этих аденовирусов, не относящихся к подгруппе C, на E4-orf6 аденовируса подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 из Ad5, таких как клетки 293 или клетки PER.C6 (см., например, . Navenga et al., J. Gen. Virol. 2006:87: 2135-2143; WO 03/104467, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах

осуществления аденовирус, который можно использовать, представляет собой аденовирус человека серотипа 35, содержащий делецию в участке E1, в который была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген белка F RSV, и участок E4 orf6 из Ad5. В определенных вариантах осуществления аденовирус в композиции на основе вакцины по настоящему изобретению представляет собой аденовирус человека серотипа 26 с делецией в участке E1, в который была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген белка F RSV, и с участком E4 orf6 из Ad5.

В альтернативных вариантах осуществления отсутствует необходимость помещать гетерологичный участок E4orf6 (например, из Ad5) в аденовирусный вектор, а вместо этого дефектный по E1 вектор, не относящийся к подгруппе C, размножают в линии клеток, которые экспрессируют как E1, так и совместимый E4orf6, например, в линии клеток 293-ORF6, которые экспрессируют как E1, так и E4orf6 из Ad5 (см., например, Brough et al, J Virol. 1996:70: 6497-501, где описано получение клеток 293-ORF6; Abrahamsen et al, J Virol. 1997:71: 8946-51, и Nan et al, Gene Therapy 2003:10: 326-36, в каждой из которых описано получение не относящихся к подгруппе C аденовирусных векторов с удаленным E1).

В качестве альтернативы можно использовать дополняющую клетку, которая экспрессирует E1 из серотипа, подлежащего размножению (см., например, WO 00/70071, WO 02/40665).

Для аденовирусов подгруппы B, таких как Ad35, содержащих делецию в участке E1, предпочтительным является сохранение 3'-конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п. о., расположенных непосредственно выше открытой рамки считывания pIX, или фрагмента, включающего их, например, фрагмента из 243 п. о., расположенного непосредственно выше старт-кодона pIX (ограниченных на 5'-конце сайтом рестрикции Bsu36I в геноме Ad35), так как это повышает стабильность аденовируса, потому что промотор гена pIX частично расположен в данной области (см., например, Havenga et al, 2006, J. Gen. 87: 2135-2143; WO 2004/001032, включенные в данный документ посредством ссылки).

Рекомбинантный аденовирус можно получать и размножать в клетках-хозяевах в соответствии с хорошо известными способами, которые предусматривают клеточную культуру клеток-хозяев, которые инфицируют аденовирусом. Клеточная культура может представлять собой любой тип клеточной культуры, в том числе адгезивную клеточную культуру, например, клетки, прикрепленные к поверхности сосуда для культивирования или к микроносителям, а также суспензионную культуру.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтическая

композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или вспомогательное вещество в применяемых дозах и концентрациях не будет вызывать каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым они вводятся. Такие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Предпочтительный состав фармацевтической композиции зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции могут включать фармацевтически приемлемые, нетоксические носители или разбавители, которые определяют как среды-носители, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животному или человеку. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не оказывал влияния на биологическую активность комбинации. Примеры таких разбавителей представляют собой дистиллированную воду, физиологический фосфатно-солевой буферный раствор, виды раствора Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав также могут включать в другие носители, адъюванты или нетоксические, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т. п. Будет понятно, что характеристики носителя, вспомогательного вещества или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель включает одну или несколько солей, таких как хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, одну или несколько аминокислот, таких как аргинин, глицин, гистидин и/или метионин, один или несколько углеводов, таких как лактоза, мальтоза, сахароза, одно или несколько поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат 20, полисорбат 80, один или несколько хелатирующих средств, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и этилендиамин-N, N'-диянтарная кислота (EDDS), и один или несколько спиртов, таких как этанол и метанол. Предпочтительно фармацевтическая композиция имеет pH от 5 до 8, например, pH равняется 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, или любому значению, находящемуся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит хлорид натрия, хлорид калия и/или хлорид магния в концентрации от 1 мМ до 100 мМ, от 25 мМ до 100 мМ, от 50 мМ до 100 мМ или от 75 мМ до 100 мМ. Например, концентрация хлорида натрия, хлорида калия и/или хлорида магния может составлять 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30

мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ или любое значение концентрации, находящееся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит гистидин, аргинин и/или глицин в концентрации от 1 мМ до 50 мМ, от 5 мМ до 50 мМ, от 5 мМ до 30 мМ, от 5 мМ до 20 мМ или от 10 мМ до 20 мМ. Например, концентрация гистидина, аргинина и/или глицина может составлять 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 37 мМ, 38 мМ, 39 мМ, 40 мМ, 41 мМ, 42 мМ, 43 мМ, 44 мМ, 45 мМ, 46 мМ, 47 мМ, 48 мМ, 49 мМ, или 50 мМ, или любое значение концентрации, находящееся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит сахарозу, лактозу и/или мальтозу в концентрации от 1% до 10% веса по отношению к объему (вес/об.) или от 5% до 10% (вес/об.). Например, концентрация сахарозы, лактозы и/или мальтозы может составлять 1% (вес/об.), 1,5% (вес/об.), 2% (вес/об.), 2,5% (вес/об.), 3% (вес/об.), 3,5% (вес/об.), 4% (вес/об.), 4,5% (вес/об.), 5% (вес/об.), 5,5% (вес/об.), 6% (вес/об.), 6,5% (вес/об.), 7% (вес/об.), 7,5% (вес/об.), 8% (вес/об.), 8,5% (вес/об.), 9% (вес/об.), 9,5% (вес/об.), или 10% (вес/об.), или любое значение концентрации, находящееся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит полисорбат 20 (PS20) и/или полисорбат 80 (PS80) в концентрации от 0,01% (вес/об.) до 0,1% (вес/об.), от 0,01% (вес/об.) до 0,08% (вес/об.) или от 0,02% (вес/об.) до 0,05% (вес/об.). Например, концентрация полисорбата 20 и/или полисорбата 80 может составлять 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, или 0,1% (вес/об.), или любое значение концентрации, находящееся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и/или этилендиамин-N, N'-диянтарную кислоту (EDDS) в концентрации от 0,1 мМ до 5 мМ, от 0,1 мМ до 2,5 мМ или от 0,1 мМ до 1 мМ. Например, концентрация EDTA и/или EDDS может составлять 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ, 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, или 5 мМ, или любое значение концентрации, находящееся между указанными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении содержит этанол и/или метанол в концентрации от 0,1% до 5% веса по отношению к объему (вес/об.) или от 0,5% до 5% (вес/об.). Например, концентрация сахарозы, лактозы и/или мальтозы может составлять 0,1% (масс./об.), 0,2% (масс./об.), 0,3% (масс./об.), 0,4% (масс./об.), 0,5% (масс./об.), 0,6% (масс./об.), 0,7% (масс./об.), 0,8% (масс./об.), 0,9% (масс./об.), 1% (масс./об.), 1,5% (масс./об.), 2% (масс./об.), 2,5% (масс./об.), 3% (масс./об.), 3,5% (масс./об.), 4% (масс./об.), 4,5% (масс./об.) или 5% (масс./об.), или представлять собой любую концентрацию, равную значениям между указанными.

Фармацевтические композиции, содержащие аденовирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния, для применения в настоящем изобретении могут быть получены любым способом, известным из уровня техники в свете настоящего изобретения. Например, аденовирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния, может быть смешан с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями с получением раствора. Раствор можно хранить в виде замороженной жидкости при контролируемой температуре в диапазоне от  $-55^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  до  $-85^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  в подходящем флаконе до введения субъекту.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант применяют для усиления защитного иммунного ответа в отношении F-полипептидов RSV, содержащихся в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде масляных эмульсий (или композиции типа "масло в воде"), в том числе скваленовые эмульсии, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы с сапонидами, такие как, например, QS21, и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примеры которых представляют собой монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды,

содержащие мотив CpG, АДФ-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ и т. п.; белки эукариотов (например, антитела или их фрагменты (например, направленные против самого антигена или CD1a, CD3, CD7, CD80) и лиганды к рецепторам (например, CD40L, GMCSF, GCSF и т. д.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с реципиентными клетками. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат алюминий в качестве адъюванта, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинаций, в концентрациях 0,05-5 мг, например 0,075-1,0 мг, алюминия на дозу.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно применять, например, в отдельной профилактике заболевания или состояния, вызванного RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами для лечения, такими как (существующие или будущие) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

Используемый в данном документе термин "в комбинации" в контексте введения двух и более терапевтических средств субъекту относится к применению более чем одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором эти терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе) может быть введено перед введением (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с введением или после введения (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) второго терапевтического средства субъекту.

Интервал между введениями может значительно варьировать и может составлять от одного раза в день до одного раза в год, до одного раза в десятилетие. Типичный режим введения состоит из иммунизации с последующими бустерными инъекциями с временными интервалами, такими как интервалы, составляющие от 1 до 24 недель. Другой режим введения состоит из иммунизации с последующими бустерными инъекциями через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 месяцев. Другой режим введения предусматривает выполнение инъекции каждые два месяца на протяжении жизни. Другой режим введения предусматривает выполнение инъекции каждый год или каждые 2, 3, 4 или 5 лет. В

качестве альтернативы бустерные инъекции могут выполняться на нерегулярной основе по показаниям при мониторинге иммунного ответа.

Специалистам в данной области будет без труда понятно, что режим примирующих и бустерных введений можно корректировать на основании измеренных показателей иммунного ответа после введений. Например, бустерные композиции обычно вводят через несколько недель или месяцев после введения примирующей композиции, например, через приблизительно 1 неделю, или 2-3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 32 недели, или 36 недель, или 40 недель, или 44 недели, или 48 недель, или 52 недели, или 56 недель, или 60 недель, или 64 недели, или 68 недель, или 72 недели, или 76 недель, или от одного до двух лет после введения примирующей композиции.

В соответствии с конкретными аспектами можно осуществлять одну или несколько бустерных иммунизаций. Антигены в соответствующих примирующих и бустерных композициях, несмотря на то, что используется много бустерных композиций, не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или должны быть в значительной степени схожими друг с другом.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии со способами, известными из уровня техники в свете настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут быть введены подходящим способом для профилактического и/или терапевтического лечения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как внутрикожное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту в данной области известны различные возможные варианты введения фармацевтической композиции с целью индуцирования иммунного ответа в отношении антигена(антигенов), присутствующего(присутствующих) в фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению вводится внутримышечно.

Также в настоящем изобретении представлены способы предупреждения инфекции и/или репликации RSV без индуцирования тяжелого нежелательного эффекта у субъекта-человека, нуждающегося в этом. В конкретных вариантах осуществления способ включает профилактическое введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащей аденовирусный

вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния. Это будет снижать нежелательные эффекты, возникающие в результате инфекции, вызванной RSV, у субъекта и, таким образом, способствовать защите субъекта от таких нежелательных эффектов при введении фармацевтической композиции.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления предупреждение инфекции и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта и/или отсутствием или снижением симптомов инфекции, вызванной RSV, при воздействии RSV по сравнению с таковыми у субъекта, которому не вводили фармацевтическую композицию, при воздействии RSV. В определенных вариантах осуществления отсутствие вирусной нагрузки, обусловленной RSV, или отсутствие нежелательных эффектов инфекции, вызванной RSV, означает снижение до таких низких уровней, что они не являются клинически значимыми.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления предупреждение инфекции и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления предупреждение инфекции и/или репликации RSV характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых через 8-35 дней после введения фармацевтической композиции, например, через 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней после введения фармацевтической композиции. Более предпочтительно, нейтрализующие антитела к RSV выявляются через от приблизительно 6 месяцев до 5 лет после введения фармацевтической композиции, например, через 6 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или 5 лет после введения фармацевтической композиции.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное количество фармацевтической композиции включает количество фармацевтической композиции, достаточное для предупреждения инфекции и/или репликации RSV без индуцирования тяжелого нежелательного явления. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния. Предпочтительно рекомбинантный F-полипептид RSV имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор относится к серотипу 26, как, например, рекомбинантный Ad26.

Также в настоящем изобретении предусмотрены способы вакцинирования субъекта против инфекции, вызванной RSV, без индуцирования тяжелого нежелательного эффекта у субъекта-человека, нуждающегося в этом. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное количество фармацевтической композиции включает количество фармацевтической композиции, достаточное для вакцинирования субъекта против инфекции, вызванной RSV, без индуцирования тяжелого нежелательного явления. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния.

В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эффективное

количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния. Предпочтительно рекомбинантный F-полипептид RSV имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор относится к серотипу 26, как, например, рекомбинантный Ad26.

#### ПРИМЕРЫ

Следующие примеры настоящего изобретения дополнительно иллюстрируют характер данного изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают настоящее изобретение и что объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

#### **Пример 1. Исследование фазы 2а, предусматривающее контрольное заражение людей**

Проводили поисковое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 2а для оценки профилактической эффективности однократной внутримышечной иммунизации с применением Ad26.RSV.preF, неспособного к репликации Ad26, содержащего трансген ДНК, который кодирует стабилизированный в конформации до слияния F-белок (pre-F) штамма A2 RSV, против инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом, на модели контрольного заражения вирусом с участием здоровых взрослых в возрасте 18-50 лет.

#### План/обзор исследования -

Проводили одноцентровое рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование фазы 2а, предусматривающее контрольное заражение людей с

участием по меньшей мере 44 здоровых субъектов мужского и женского пола в возрасте 18-50 лет, которых подвергали предварительному скринингу в отношении восприимчивости к инфекции, вызванной RSV, т. е. имеющих уровни нейтрализующих антител к RSV, соответствующих восприимчивости к инфекции, вызванной RSV. Схематический обзор плана исследования и групп представлен в таблице 1 ниже:

**Таблица 1**

<i>Группа</i>	<i>N</i>	<i>День -28</i>	<i>День 0*</i>
Группа 1	22	Ad26.RSV.preF (1 x 10 <sup>11</sup> в. ч.)	Контрольное заражение с помощью RSV-A Memphis 37b**
Группа 2	22	Плацебо	

\* т. е. не менее чем 24 или не более чем 90 дней после вакцинации.

\*\* Субъекты будут подвергаться контрольному заражению в двух или более когортах, содержащих не более чем 22 субъекта на когорт. В пределах каждой когорты субъекты будут подвергаться рандомизации в соотношении 1:1 в группы лечения 1 x 10<sup>11</sup> в. ч. Ad26.RSV.preF или плацебо.

*Рандомизация:* Субъектов включали в две разные группы (Ad26.RSV.preF или плацебо), каждая из которых предусматривала по меньшей мере 22 здоровых взрослых субъекта при соотношении рандомизации 1:1.

*Схемы вакцинации/продолжительность исследования:* Исследование состояло из фазы скрининга (от 56 до 3 дней до вакцинации), фазы вакцинации в течение которой субъектов подвергали вакцинации в день -28 с применением Ad26.RSV.preF, вектора на основе неспособного к репликации (дельта-ранний участок 1/ранний участок 3 [E1/E3]) Ad26, содержащего последовательность, кодирующую полноразмерный F-белок штамма A2 RSV, стабилизированный в конформации до слияния; и фазы контрольного заражения вирусом, в течение которой субъектов помещали в карантинное отделение и подвергали контрольному заражению в день 0 (через 24-90 дней после вакцинации) с помощью RSV-A Memphis 37b. Через 12 дней после контрольного заражения субъекты завершали участие и подвергались последующему наблюдению в течение 6 месяцев после вакцинации.

*Первичная конечная точка эффективности:* Оценивали площадь под кривой зависимости вирусной нагрузки от времени (VL-AUC в log<sub>10</sub> копий/мл) для RSV, определенную посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва. Образцы назального смыва собирали каждые 12 (±1) часов, начиная через два дня после инокуляции вируса для контрольного заражения. VL-AUC рассчитывали на основе значений вирусной нагрузки, измеряемых дважды в день, начиная со значения исходного уровня (последнее доступное измерение перед контрольным заражением) и заканчивая последним доступным значением перед завершением участия.

*Основные вторичные и поисковые конечные точки:* оценивали пиковую вирусную нагрузку; вирусную нагрузку, обусловленную RSV-A Memphis 37b, определенную посредством количественного анализа культуры RSV из образцов назального смыва, и

соответствующую AUC; общее количество баллов по шкале оценки клинических симптомов и соответствующую AUC с течением времени; общий вес выработанной слизи и количество бумажных носовых платков; долю субъектов с симптоматической инфекцией, вызванной RSV; безопасность и переносимость, оцениваемые с помощью запрашиваемых АЕ, незапрашиваемых АЕ и SAE; гуморальные иммунные ответы, вызванные Ad26.RSV.preF, и ответы на контрольное заражение с помощью RSV-A Memphis 37b.

#### Результаты -

Всего рандомизации и вакцинации подвергались 63 субъекта, 31 субъект в группе, получавшей активное средство, 32 субъекта в группе, получавшей плацебо. 4 субъекта в группе, получавшей активное средство, и 6 субъектов в группе, получавшей плацебо, выбыли из исследования до контрольного заражения (причина: утрата контакта для последующего наблюдения (6 субъектов), решение врача (3 субъекта) и отклонение от протокола (1 субъект)), в результате контрольному заражению подвергались 27 субъектов в группе, получавшей активное средство, и 26 субъектов в группе, получавшей плацебо.

1. *Эффективность:* Анализ эффективности был основан на популяции, подлежащей контрольному заражению (ИТТс), которая определялась как все субъекты, которые подвергались рандомизации, вакцинации и контрольному заражению. Популяция ИТТс включала 53 субъекта: 27 субъектов в группе, получавшей Ad26.RSV.preF, и 26 субъектов в группе, получавшей плацебо. Эффект первичной конечной точки, который являлся значимым на уровне 5% (односторонний), считали значимым эффектом. Эффект, который являлся значимым на уровне 20% (односторонний), считали тенденцией.

2. *Анализ первичной конечной точки эффективности:* Разница показателей AUC вирусной нагрузки (VL), определенной посредством RT-PCR образцов назального смыва, между группой, получавшей Ad26.RSV.preF, и группой, получавшей плацебо, приведена в таблице 2 и графически изображена на фигуре 1. Медиана (Q1; Q3) AUC VL от исходного уровня до завершения участия составляла 0 (0; 268,8) для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и 236 (20,3; 605,8) для группы, получавшей плацебо. р-значение одностороннего точного критерия суммы рангов Уилкоксона составляло 0,0012, что указывало на значительное снижение VL-AUC в группе, получавшей Ad26.RSV.preF, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

**Таблица 2. Первичная конечная точка эффективности: AUC вирусной нагрузки, определенной посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва; выборка ИТТс**

AUC вирусной нагрузки	N	Медиана (Q1;	Разница Ad26.RSV.preF - плацебо
-----------------------	---	--------------	---------------------------------

от исходного уровня до завершения участия		Q3)	p-значение*
Ad26.RSV.preF (1×10 <sup>11</sup> в. ч.)	27	0 (0,0, 268,8)	0,012
Плацебо	26	236 (20,3; 605,8)	

\*точный критерий суммы рангов Уилкоксона.

Среднее значение и стандартная ошибка (SE) VL, определенных посредством RT-PCR образцов назального смыва, по дням графически изображены на фигуре 2. Пиковую VL наблюдали в первом образце для RT-PCR, собранном в день 7 (утро) в обеих группах.

3. *Анализ вторичной и поисковой конечной точки эффективности:* Мощность исследования подразумевала только первичную конечную точку эффективности, и не подразумевала какой-либо из вторичных конечных точек. Следовательно, интерпретацию p-значений осуществляли с осторожностью.

3а. Пиковая вирусная нагрузка: Наблюдаемая в течение карантина разница показателей пиковой VL, полученных посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва, между группой, получавшей Ad26.RSV.preF, и группой, получавшей плацебо, показана на фигуре 3. Медиана (Q1; Q3) пиковой VL составляла 0 (0; 4,539) log<sub>10</sub> копий/мл для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и 5,365 (3,027; 6,665) log<sub>10</sub> копий/мл для группы, получавшей плацебо.

3б. AUC вирусной нагрузки: Среднее значение и SE для показателей VL RSV-A Memphis 37b, определенных посредством количественного анализа культуры RSV из образцов назального смыва, по дням от исходного уровня до завершения участия изображены на фигуре 4. Пиковую VL для группы, получавшей плацебо, наблюдали в день 6 вечером. Коробчатые диаграммы AUC представлены на фигуре 5. Медиана (Q1; Q3) AUC VL от исходного уровня до завершения участия составляла 0 (0; 20,3) для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и 109 (0; 227,5) для группы, получавшей плацебо.

3с. Общие клинические симптомы: Данные о наличии 13 симптомов, полученные посредством опросника, собирали в карту симптомов субъекта три раза в день (утром, днем вечером). Симптомы имели следующие определения:

симптомы со стороны верхних дыхательных путей: насморк, заложенность носа, чихание, боль в горле, боль в ухе;

симптомы со стороны нижних дыхательных путей: кашель, одышка, чувство стеснения в груди, хрипы;

системные симптомы: недомогание, головная боль, боль в мышцах и/или суставах, озноб/жар.

Общее количество баллов по шкале оценки клинических симптомов определяли как сумму баллов (степеней) 13 симптомов, данные о которых получали посредством опросника, в карте симптомов субъекта:

0="отсутствие симптома";

1="едва заметный";

2="время от времени он явно вызывает беспокойство, но он не мешает участию в повседневной деятельности";

3="он причиняет значительное беспокойство большую часть времени или все время и мешает мне участвовать в повседневной деятельности";

4="наличие симптома в состоянии покоя".

Значения общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов по дням показаны на фигуре 6, и AUC данных значений, собранных от момента контрольного заражения до завершения участия, изображены на фигуре 7. Медиана AUC общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов от исходного уровня до завершения участия составляла 35 для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и 167 для группы, получавшей плацебо. Значения общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов достигали пика во второй половине дня 6 для группы, получавшей плацебо.

3d. Доля субъектов с симптоматической инфекцией, вызванной RSV: Процентную долю субъектов с симптоматической инфекцией, вызванной RSV, определяли следующими способами:

Консервативный: субъект имеет два или более результата количественной RT-PCR для разных образцов, и субъект имеет одно из следующего:

- симптомы из двух разных категорий (со стороны верхних дыхательных путей, со стороны нижних дыхательных путей, системные, см. раздел 3с) из карты симптомов субъекта независимо от степени и момента проведения оценки или

- любой симптом 2 степени из любой категории.

Свободный (RT-PCR): два или более результата количественной RT-PCR и наличие любого клинического симптома любой степени тяжести из карты симптомов субъекта.

Процентная доля субъектов с симптоматической инфекцией, вызванной RSV, соответствующая консервативному и свободному способу определения, показана на фигуре 8. На основании консервативного способа определения 6/27 (22,2%) субъектов считали инфицированными в группе, получавшей Ad26.RSV.preF, и 12/26 (46,2%) субъектов считали инфицированными в группе, получавшей плацебо, следовательно, эффективность вакцины составляла 51,9% с соответствующим 95% CI (-7,4%, 83,2%). На

основании свободного способа определения 9/27 (33,3%) субъектов считали инфицированными в группе, получавшей Ad26.RSV.preF, и 16/26 (61,5%) субъектов считали инфицированными в группе, получавшей плацебо, следовательно, эффективность вакцины составляла 45,8% с соответствующим 95% CI (-1%, 73,8%).

Первичная конечная точка эффективности, AUC VL, которую определяли посредством RT-PCR образцов назального смыва, приведена в соответствии со способами определения симптоматической инфекции, вызванной RSV, на фигуре 9. AUC VL, которую определяли посредством количественного анализа культуры RSV из назального смыва, а также AUC общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов приведены в соответствии со способами определения симптоматической инфекции, вызванной RSV, на фигуре 10 и фигуре 11 соответственно.

3e. Вес слизи и количество бумажных носовых платков: Результаты определения веса слизи и количества бумажных носовых платков, которые анализировали в отношении веса слизи, приведены вместе со средним значением и SE по дням на фигуре 12 и фигуре 13 соответственно. Пик для обоих показателей наблюдали в день 7. Медианная AUC веса слизи от исходного уровня до завершения участия составляла 102 для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и 333 для группы, получавшей плацебо, как показано на фигуре 14.

*4. Конечные точки иммуногенности:* Анализ иммуногенности был основан на выборке для анализа иммуногенности без отклонений от протокола (PPI), которая включала 61 субъекта, которых подвергали рандомизации и вакцинации, для которых были доступны данные об иммуногенности.

При первичном анализе анализировали уровень нейтрализующих вирус антител против A2 RSV (VNA A2) и результаты ELISA для pre-F. Также анализировали дополнительные данные, такие как результаты ELISA для post-F, VNA RSV A Memphis 37b и Ad26 VNA.

Анализ иммуногенности проводили с использованием двух моментов времени: исходный уровень (вакцинация) и через 28 дней после вакцинации, при этом включали все оценки, полученные с 22 по 33 день после вакцинации.

Ответ в виде сывороточного антитела IgG к Pre-F, который оценивали посредством ELISA, показан на фигуре 15. Соотношение средних геометрических значений между 28 днем после вакцинации и исходным уровнем (с 95% CI) для результатов ELISA для pre-F составляло 6,9 (5,1; 9,4) относительной единицы ELISA и 1 (0,9; 1) относительную единицу ELISA для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и группы, получавшей плацебо, соответственно.

Титры нейтрализующих антител к штамму A2 RSV показаны на фигуре 16. Рост среднего геометрического значения и 95% CI для VNA A2 составлял 5,9 (4,4;8) и 0,9 (0,8;1) для группы, получавшей Ad26.RSV.preF, и группы, получавшей плацебо, соответственно.

AUC вирусной нагрузки, которую определяли посредством количественной RT-PCR образцов назального смыва, по сравнению с ответами через 28 дней после вакцинации VNA A2 представлена в виде графика на фигуре 17. Подобную взаимосвязь наблюдали между AUC VL и остальными результатами анализа показателей гуморального иммунитета, а также между AUC остальных конечных точек эффективности по сравнению с результатами анализа показателей гуморального иммунитета.

Для консервативного способа определения симптоматической инфекции, вызванной RSV, результаты анализа показателей гуморального иммунитета через 28 дней после вакцинации представлены на фигурах 18 и 19.

*5. Безопасность:* Сообщения о SAE отсутствовали. Один субъект в группе, получавшей активное средство, сообщал о развитии АЕ, которое привело к отсрочке контрольного заражения (инфекция мочевыводящих путей 2 степени, не связанные). Один субъект в группе, получавшей плацебо, сообщал о развитии АЕ, которые привели к отмене контрольного заражения (недомогание 1 степени и боль в орофарингеальной области 1 степени, оба не связанные). С последним субъектом впоследствии был утрачен контакт для последующего наблюдения.

Все незапрашиваемые АЕ после вакцинации или после контрольного заражения характеризовались степенью 1 или 2. Все запрашиваемые локальные АЕ характеризовались степенью 1 или 2. Наиболее частые запрашиваемые локальные АЕ, о которых сообщалось, представляли собой боль/болезненность и уплотнение в результате отека, о которых сообщали все субъекты (100%) и 29,0% субъектов в группе, получавшей активное средство, и 18,8% и 3,1% субъектов в группе получавшей плацебо, соответственно. Медианное значение времени до проявления симптома в группе, получавшей активное средство, составляло 1 день для боли/болезненности и 2 дня для уплотнения в результате отека. Медианное значение продолжительности в группе, получавшей активное средство, составляло 4 и 2 дня соответственно. Три субъекта в группе, получавшей активное средство, и 1 субъект в группе, получавшей плацебо, сообщали о развитии по меньшей мере одного запрашиваемого системного АЕ 3 степени. Все другие запрашиваемые системные АЕ характеризовались степенью 1 или 2. 3 наиболее часто сообщаемых запрашиваемых системных АЕ представляли собой миалгию, усталость и головную боль. Об их развитии сообщали, соответственно, 90,3%, 83,9% и

83,9% субъектов в группе, получавшей активное средство, и 12,5%, 37,5% и 25,0% субъектов в группе, получавшей плацебо. Медианное значение времени до наступления и длительность данных запрашиваемых системных АЕ составляли 2 дня.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от их общего изобретательского замысла. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификации в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

### **ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

#### **SEQ ID NO: 1 (полноразмерная последовательность F-белка A2 RSV)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN  
 YTLNNAKKTNTVTLSSKKRKRFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTN  
 KAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF  
 SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
 TCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
 YGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPII  
 NFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIILL  
 SLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

#### **SEQ ID NO: 2 (домен тримеризации)**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

#### **SEQ ID NO: 3 (линкер)**

SAIG

#### **SEQ ID NO: 4 (preF2.1 RSV)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN  
 YTLNNAKKTNTVTLSSKKRKRFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTN  
 KAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPIVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF  
 SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
 TCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
 YGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPII  
 NFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIILL

SLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIAFSN

**SEQ ID NO: 5 (preF2.2 RSV)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKEiKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN  
 YTLNNAKKTNTVTLSSKKRKRFLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTN  
 KAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF  
 SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
 TCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
 YGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPII  
 NFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIILL  
 SLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIAFSN

**SEQ ID NO: 6 (pre-F2.1 F RSV)**

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCG  
 TGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAGTTCTACCAGAGCACCT  
 GCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGGGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGC  
 GTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGATCAAGTGCAACGGCACCGACGC  
 CAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAG  
 CTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACAGAGCCAGAAGAGAGCT  
 GCCCAGATTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACGTGACCCTGA  
 GCAAGAAGAGAAAGAGAAGATTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATC  
 GCCAGCGGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGAT  
 CAAGAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACGGCGTGA  
 GCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGACCTGAAGA ACTACATCGACAAGCAGCTGCTG  
 CCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAACATCGAGACCGTGATCGAGTT  
 CCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATCACCAGAGAGTTCAGCGTGAACGCCG  
 GCGTGACCACCCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTG  
 ATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAGAAGCTGATGAGCAACAACGTGCA  
 GATCGTGAGACAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGG  
 CCTACGTGGTGCAGCTGCCCCGTGACGGCGTGATCGACACCCCCCTGCTGGAAGCTGC  
 ACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACC  
 AGAACCGACAGAGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCCA  
 GGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAGAGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCC  
 TGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTAC  
 GACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCAGCAGCGTGATCACCAGCCT

GGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACA  
GAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTG  
GACACCGTGAGCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGA  
GCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCCTCA  
GCGACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTG  
GCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGCAC  
CACCAACATCATGATCACCACCATCATCATCGTGATCATCGTGATCCTGCTGAGCCT  
GATCGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGAAGCACCCCGTGACCCTGA  
GCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCAGCAACTGA

**SEQ ID NO: 7 (pre-F2.2 F RSV)**

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCG  
TGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAGTTCTACCAGAGCACCT  
GCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGC  
GTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGATCAAGTGCAACGGCACCGACGC  
CAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAG  
CTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACAGAGCCAGAAGAGAGCT  
GCCAGATTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACGTGACCCTGA  
GCAAGAAGAGAAAGAGAAGATTCTGGGCTTCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATC  
GCCAGCGGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGAT  
CAAGAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACGGCGTGA  
GCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGACCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTG  
CCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAACATCGAGACCGTGATCGAGTT  
CCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATCACCAGAGAGTTCAGCGTGAACGCCG  
GCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTG  
ATCAACGACATGCCATCACCAACGACCAGAAGAAGCTGATGAGCAACAACGTGCA  
GATCGTGAGACAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGG  
CCTACGTGGTGCAGCTGCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGC  
ACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACC  
AGAACCGACAGAGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCA  
GGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAGAGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCC  
TGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTAC  
GACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCAGCAGCGTGATCACCAGCCT  
GGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACA  
GAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTG  
GACACCGTGAGCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGA

GCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCTGGTGTTCCTCA  
GCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTG  
GCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGCAC  
CACCAACATCATGATCACCACCATCATCATCGTGATCATCGTGATCCTGCTGAGCCT  
GATCGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGAAGCACCCCCGTGACCCTGA  
GCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCAGCAACTGA

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ индуцирования защитного иммунного ответа против инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий внутримышечное введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащей аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, который стабилизирован в конформации до слияния, при этом эффективное количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

2. Способ по п. 1, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации и содержит делецию в по меньшей мере одном из аденовирусного раннего участка 1 (участка E1) и раннего участка 3 (участка E3).

3. Способ по п. 2, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad26, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

4. Способ по п. 2, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad35, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где рекомбинантный F-полипептид RSV, кодируемый аденовирусным вектором, имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеиновая кислота, кодирующая F-полипептид RSV, содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где эффективное количество фармацевтической композиции содержит приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

8. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, после начального введения.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где субъект является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта при воздействии RSV.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где защитный иммунный ответ характеризуется

отсутствием или снижением клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где защитный иммунный ответ характеризуется присутствием нейтрализующих антител к RSV и/или наличием защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых через 8-35 дней после введения фармацевтической композиции.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где введение не индуцирует какое-либо тяжелое нежелательное явление.

14. Способ предупреждения инфекции и/или репликации RSV без индуцирования тяжелого нежелательного эффекта у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий профилактическое внутримышечное введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, предпочтительно вакцины, содержащей от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-полипептид RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, при этом аденовирусный вектор является неспособным к репликации.

15. Способ по п. 14, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad26, содержащий делецию участка E1 и участка E3.

16. Способ по любому из пп. 14-15, где нуклеиновая кислота, кодирующая F-полипептид RSV, содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

17. Способ по любому из пп. 14-16, где эффективное количество фармацевтической композиции содержит приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

18. Способ по любому из пп. 14-17, дополнительно включающий введение субъекту количества фармацевтической композиции, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, после начального введения.

19. Способ по любому из пп. 14-18, где субъект является восприимчивым к инфекции, вызванной RSV.

20. Способ по любому из пп. 14-19, где предупреждение инфекции и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта.

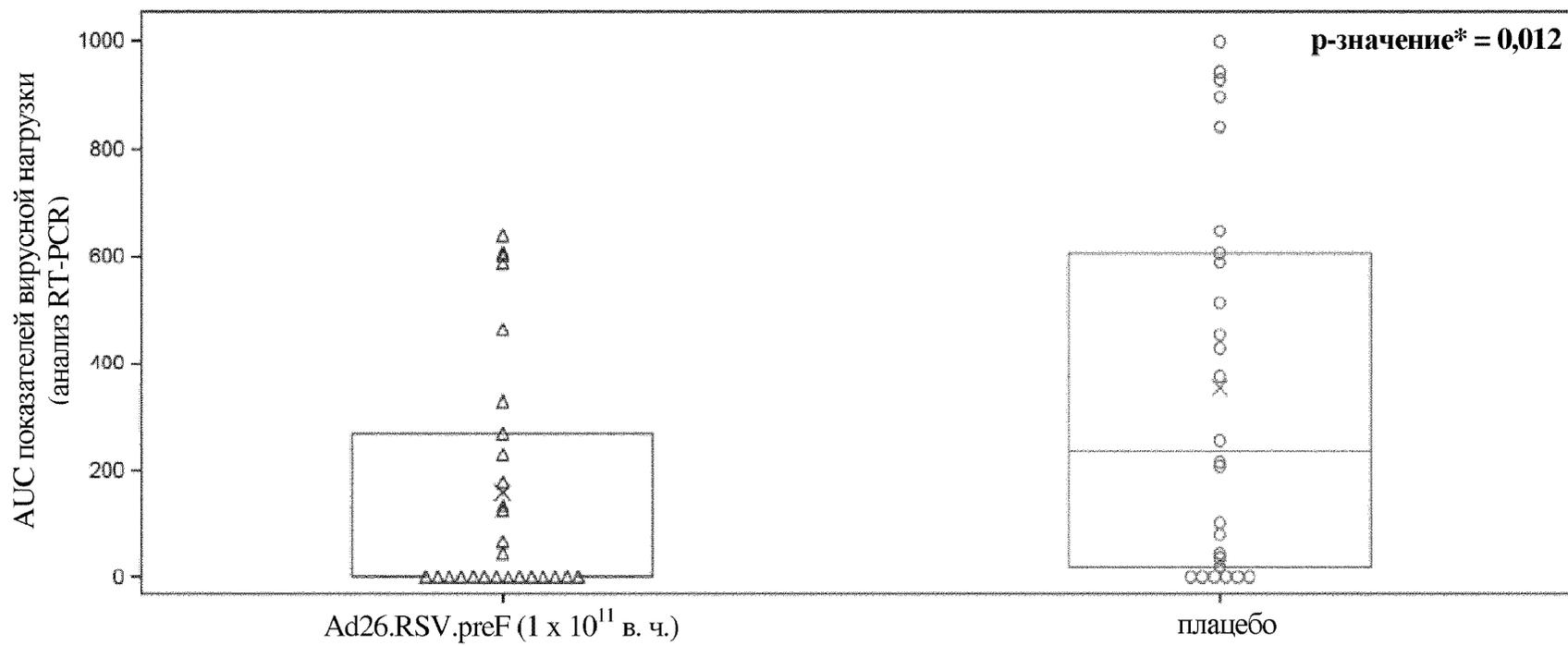
21. Способ по любому из пп. 14-20, где предупреждение инфекции и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением клинического симптома,

вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

22. Способ по любому из пп. 14-21, где защитный иммунный ответ характеризуется присутствием нейтрализующих антител к RSV и/или наличием защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых через 8-35 дней после введения фармацевтической композиции.

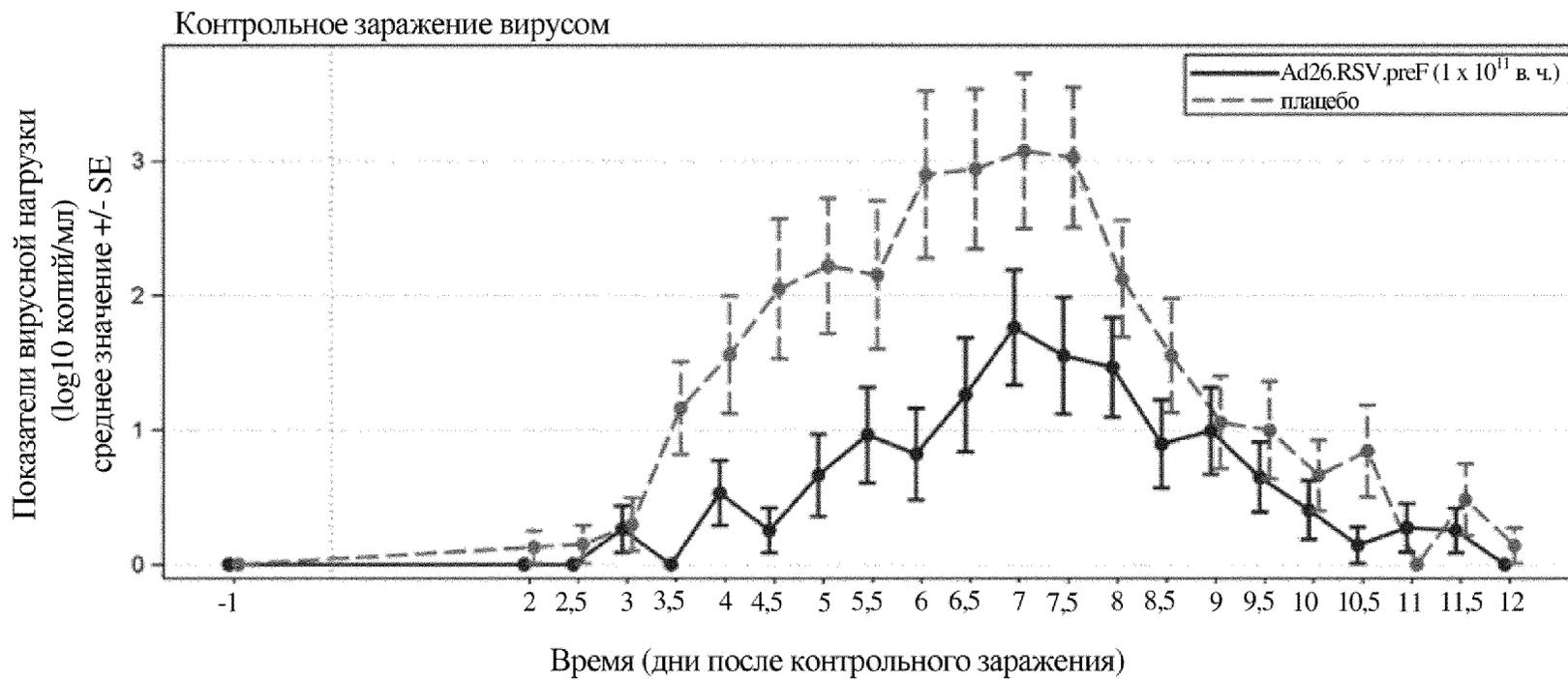
По доверенности

AUC вирусной нагрузки, определенной посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва



Фиг. 1

Вирусная нагрузка, определенная посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва



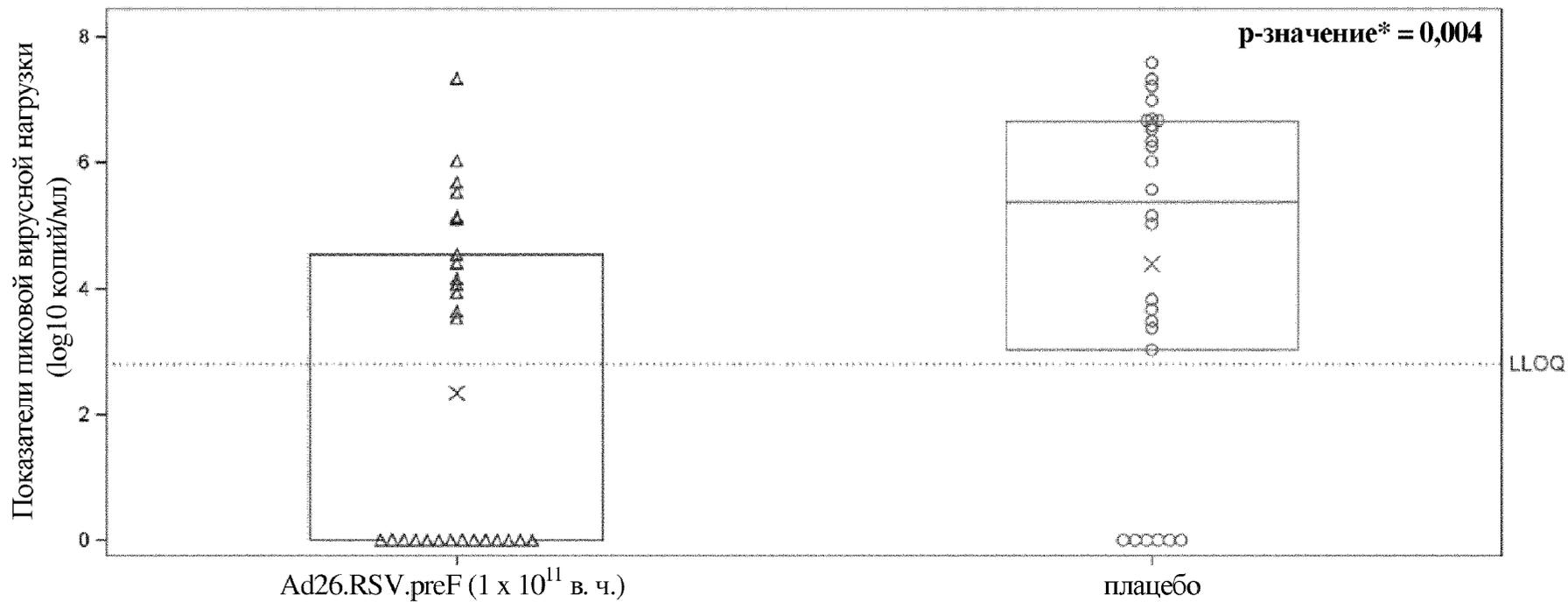
Число субъектов:

Ad26.RSV.preF 27  
 плацебо 26

27 27 27 26 27 27 27 27 27 26 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27  
 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 25 26 26 26 26 26 26 26 26 26

Фиг. 2

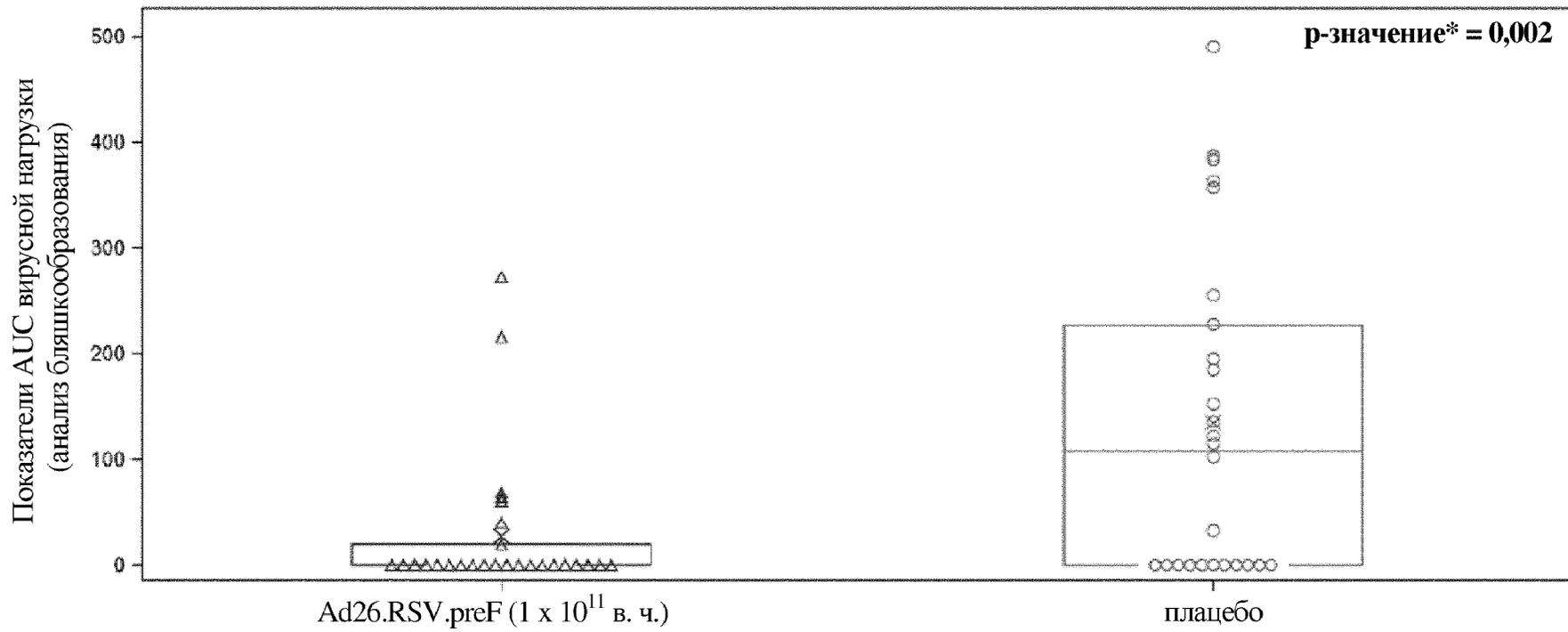
Пиковая вирусная нагрузка, определенная посредством количественного анализа RT-PCR образцов назального смыва



Фиг. 3



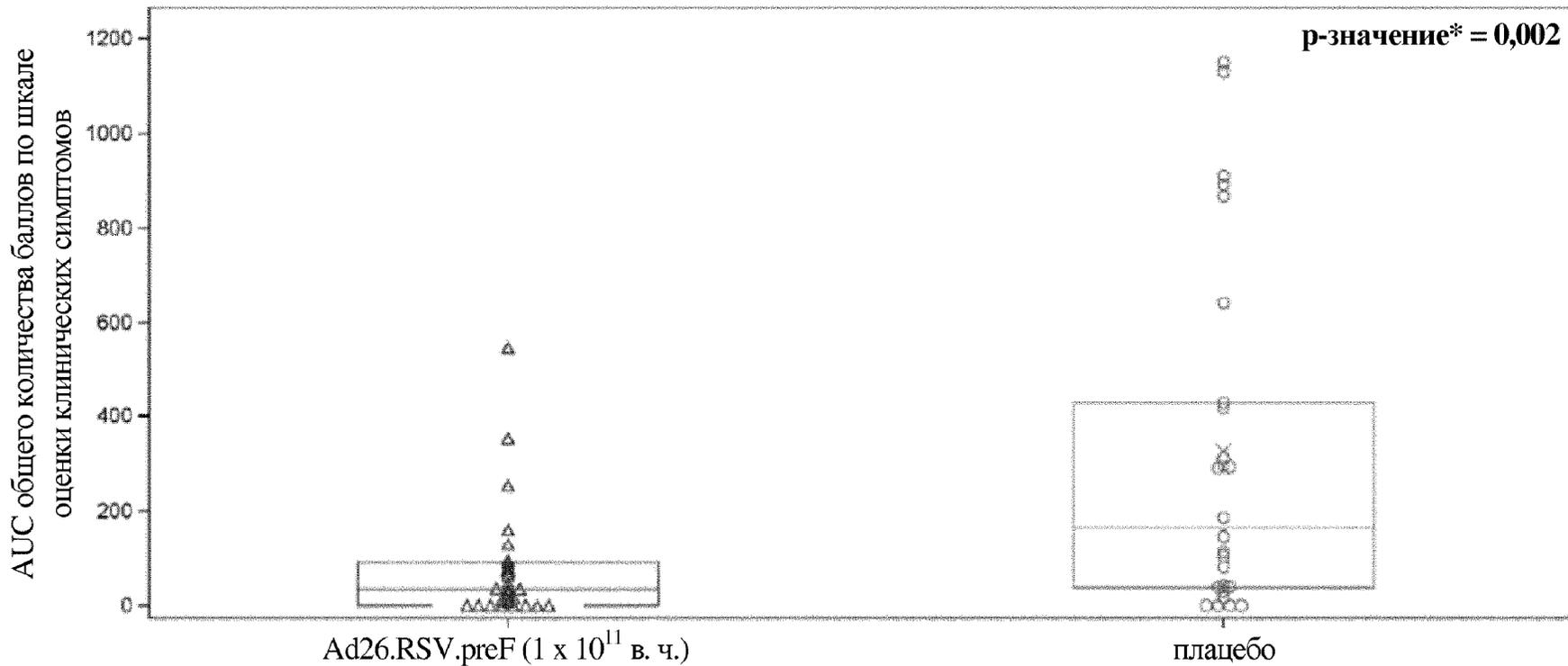
AUC вирусной нагрузки, определенной посредством количественного анализа культуры RSV  
из образцов назального смыва



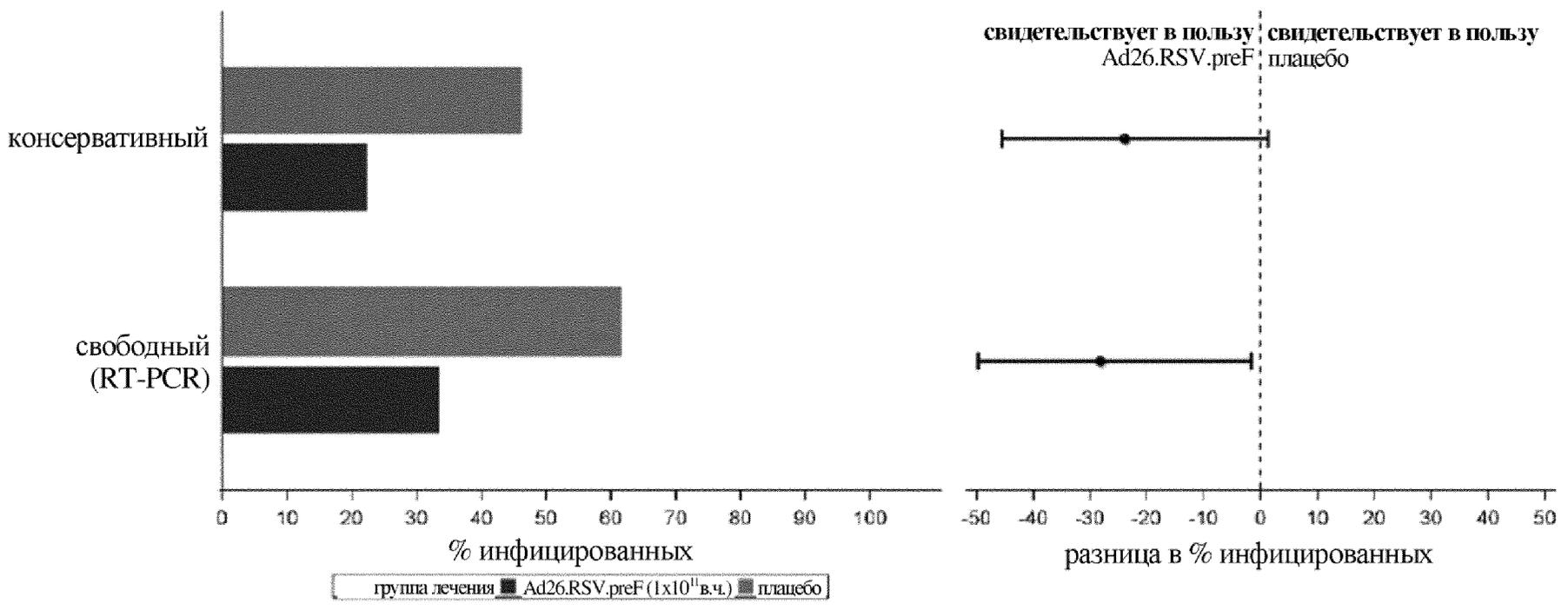
Фиг. 5



AUC общего количества баллов по шкале оценки клинических симптомов

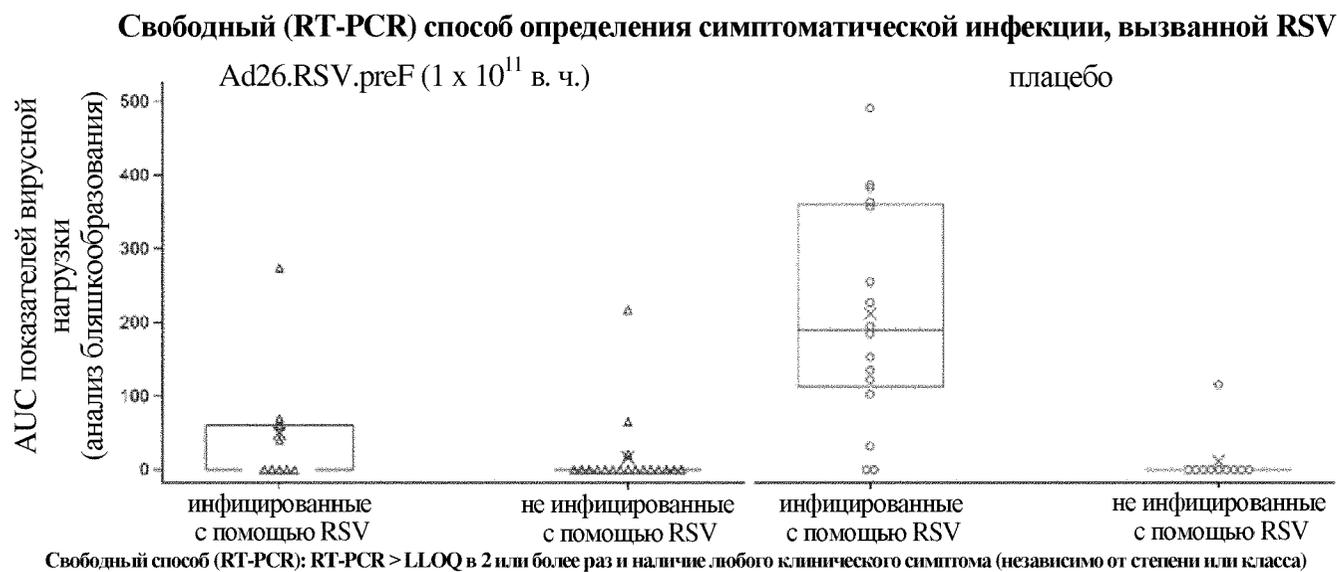
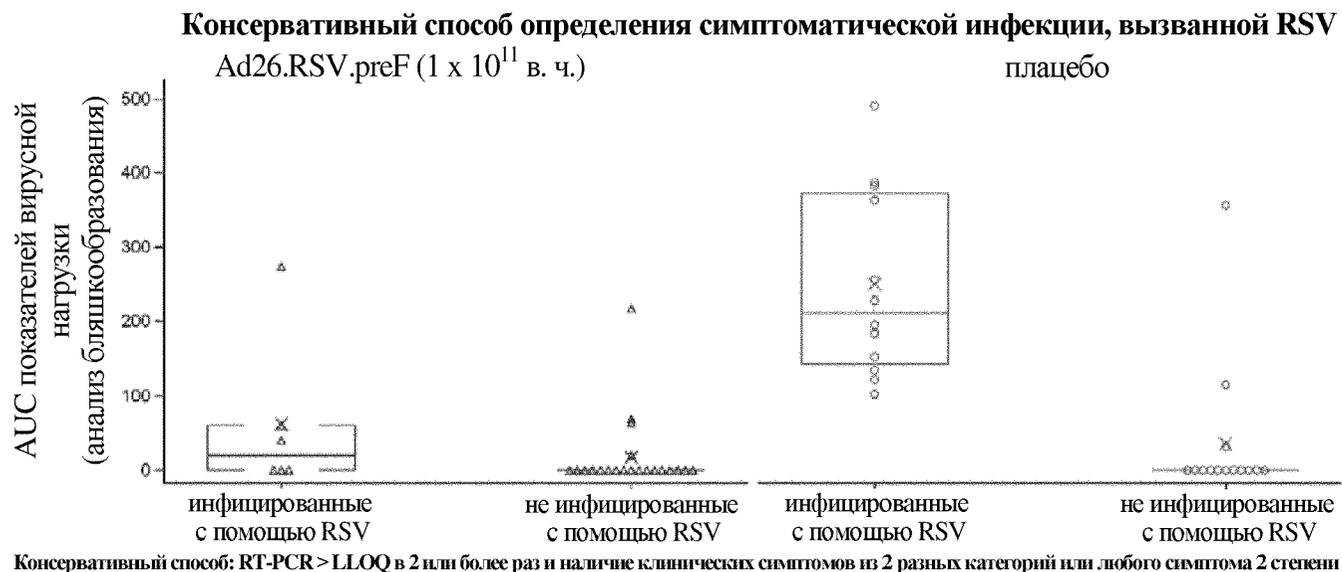


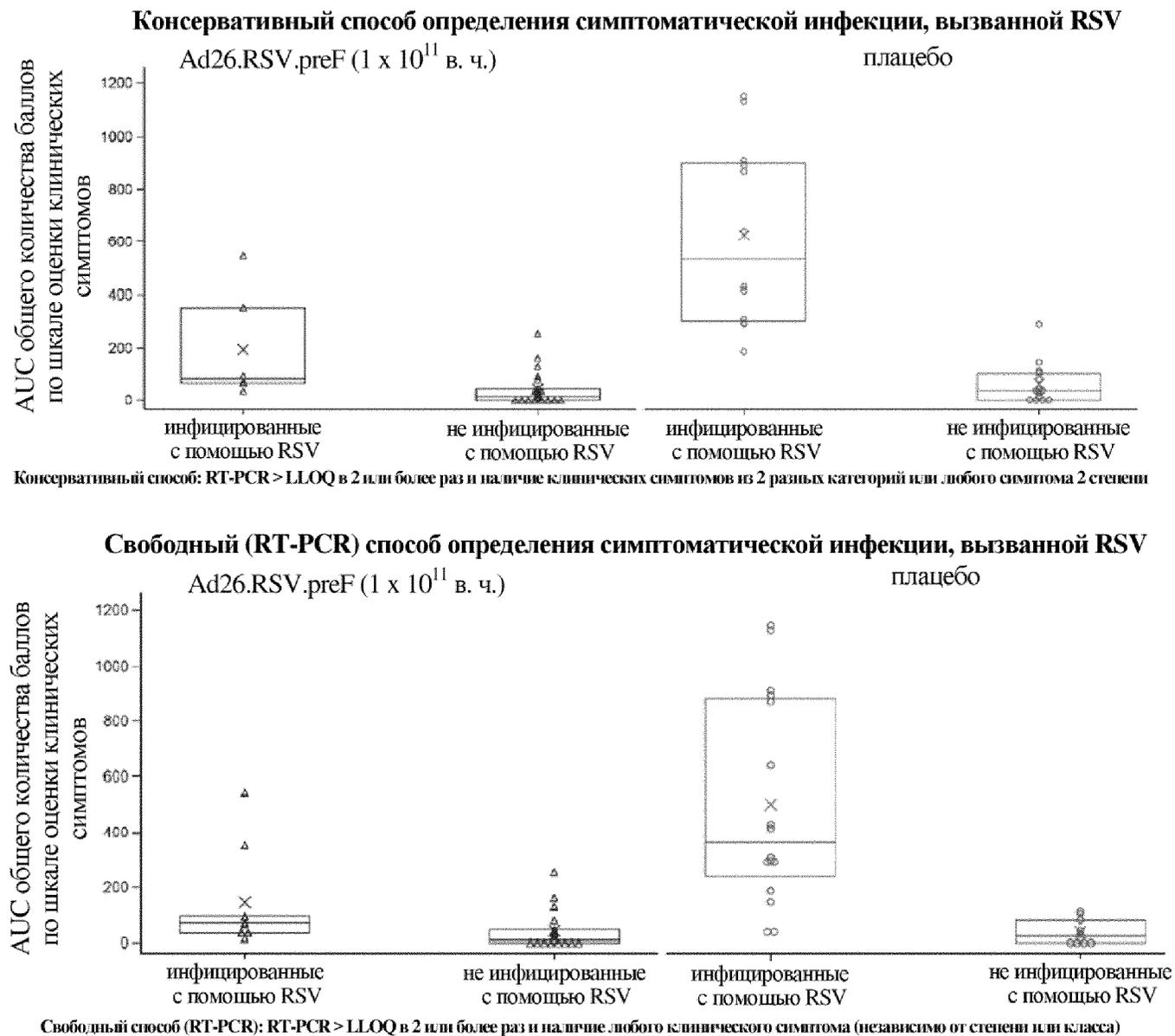
Фиг. 7

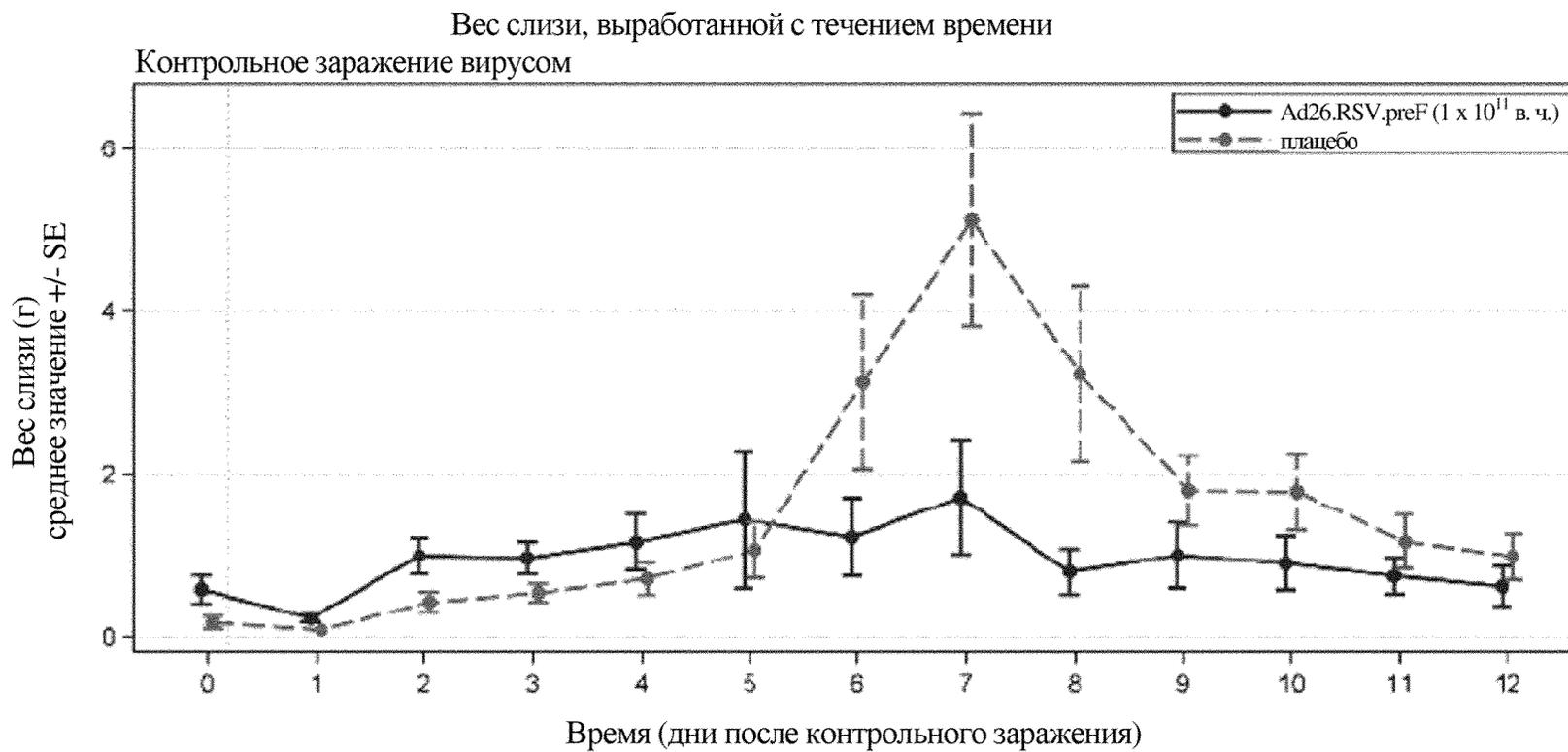


Фиг. 8





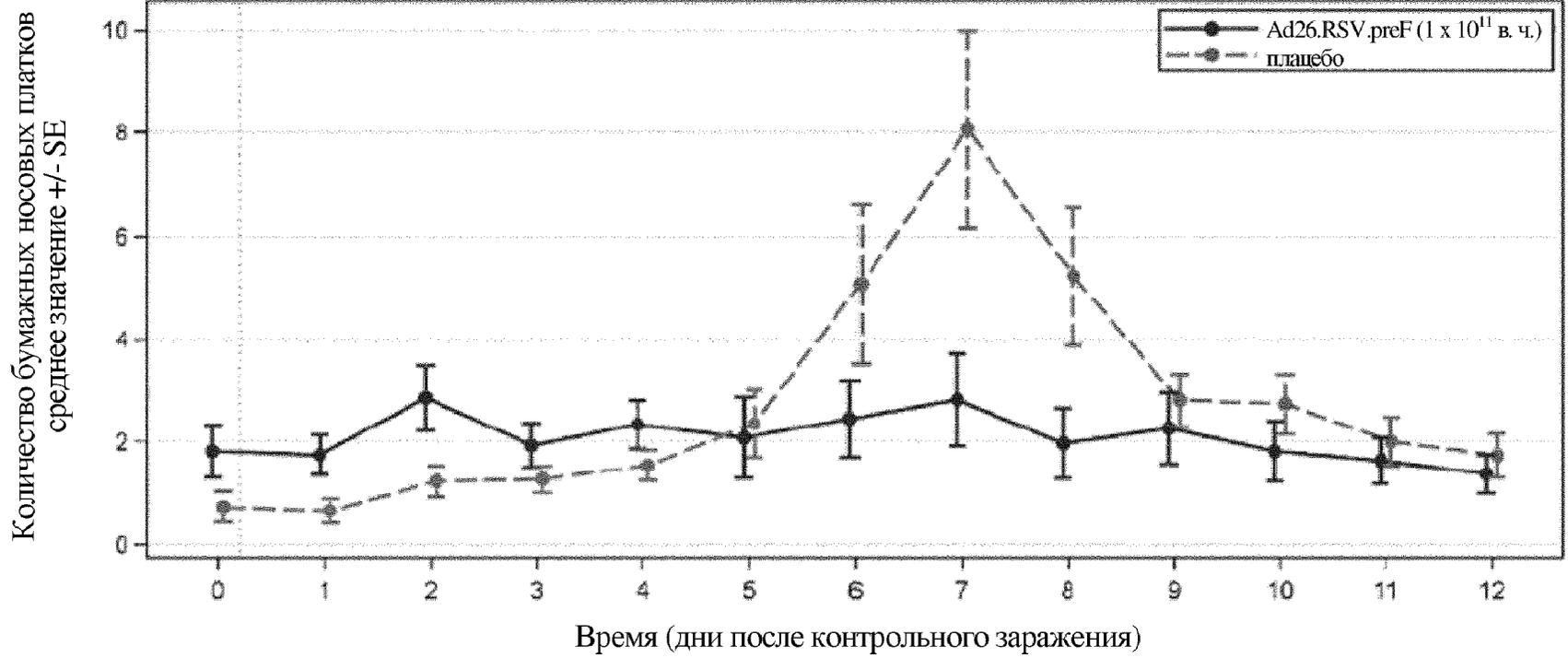




Число субъектов:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ad26.RSV.preF	27	26	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
платцебо	25	25	25	25	26	26	26	26	26	26	26	26	26

Фиг. 12

Количество бумажных носовых платков, использованных на каждый момент времени  
Контрольное заражение вирусом

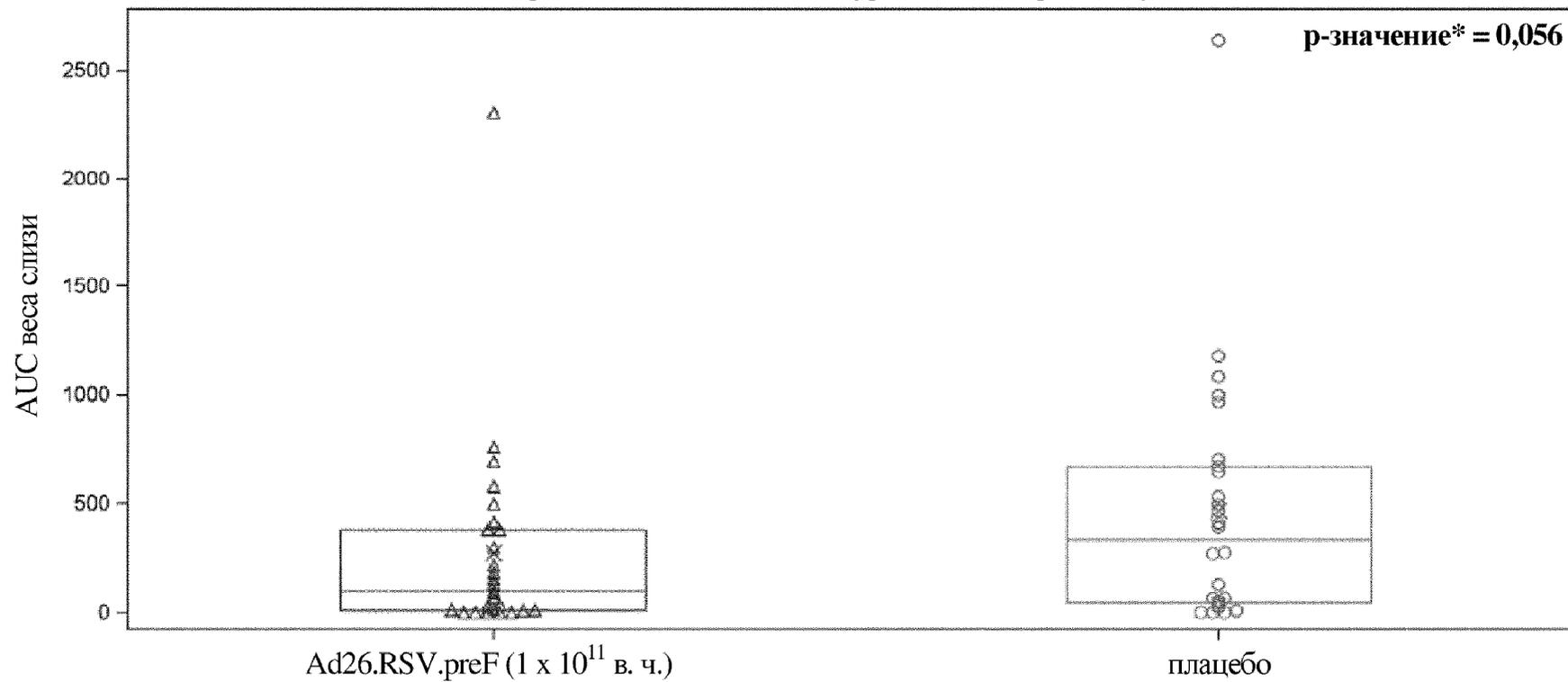


Число субъектов:

Ad26.RSV.preF	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
пlaceбо	26	26	26	26	26	26	26	25	26	26	25	26

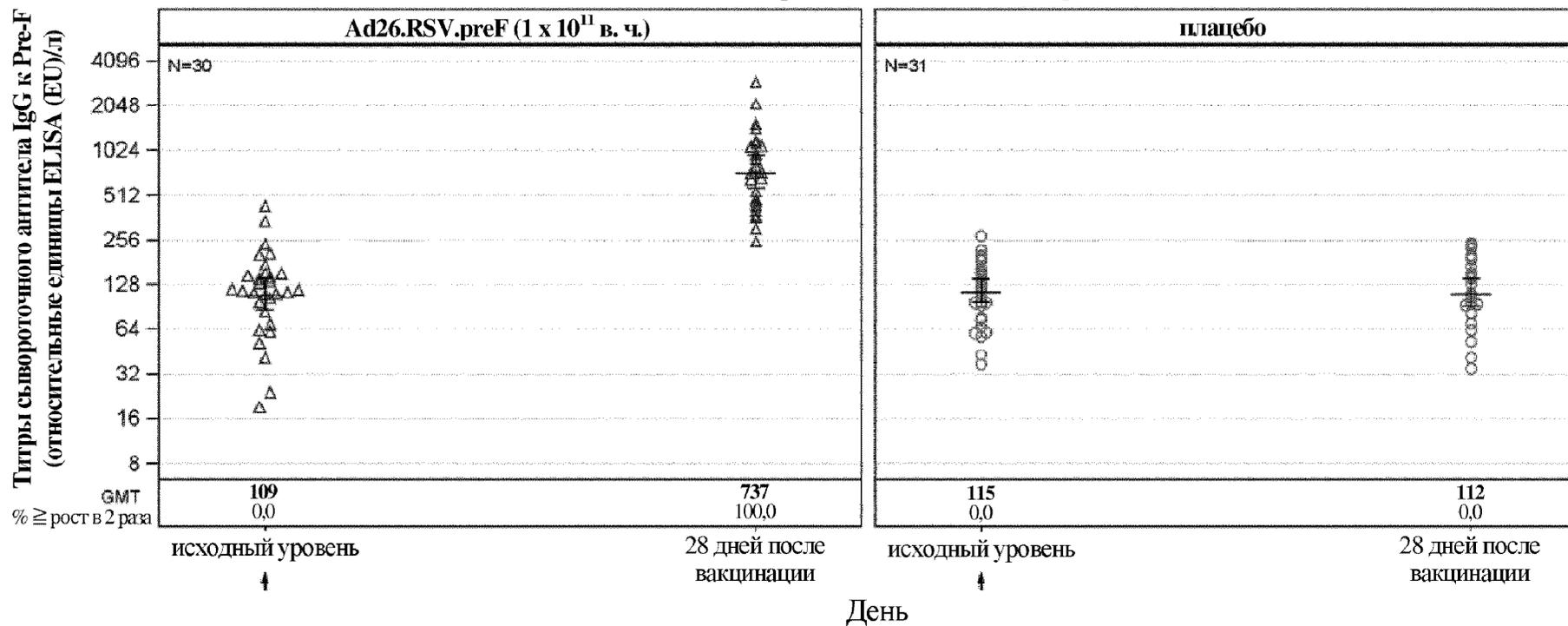
Фиг. 13

AUC веса слизи, выработанной от исходного уровня до завершения участия в исследовании



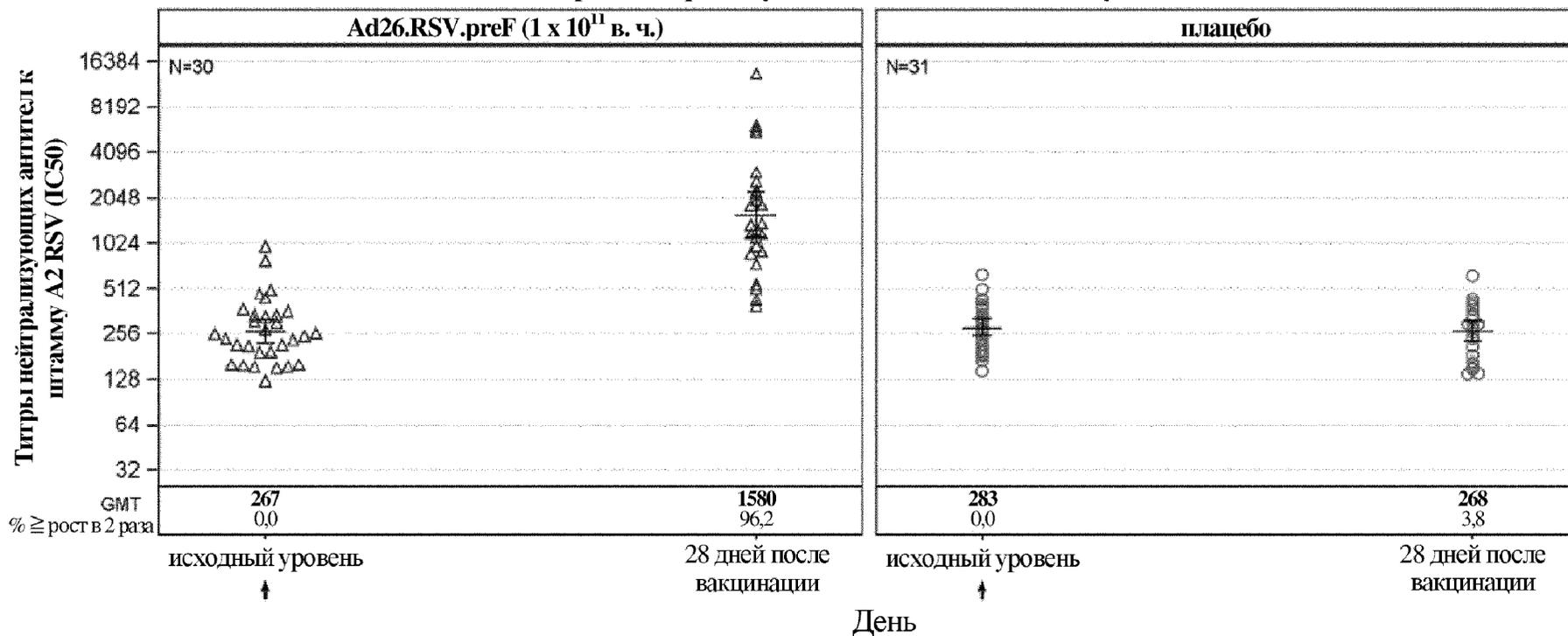
Фиг. 14

Ответ в виде сывороточного антитела IgG к Pre-F

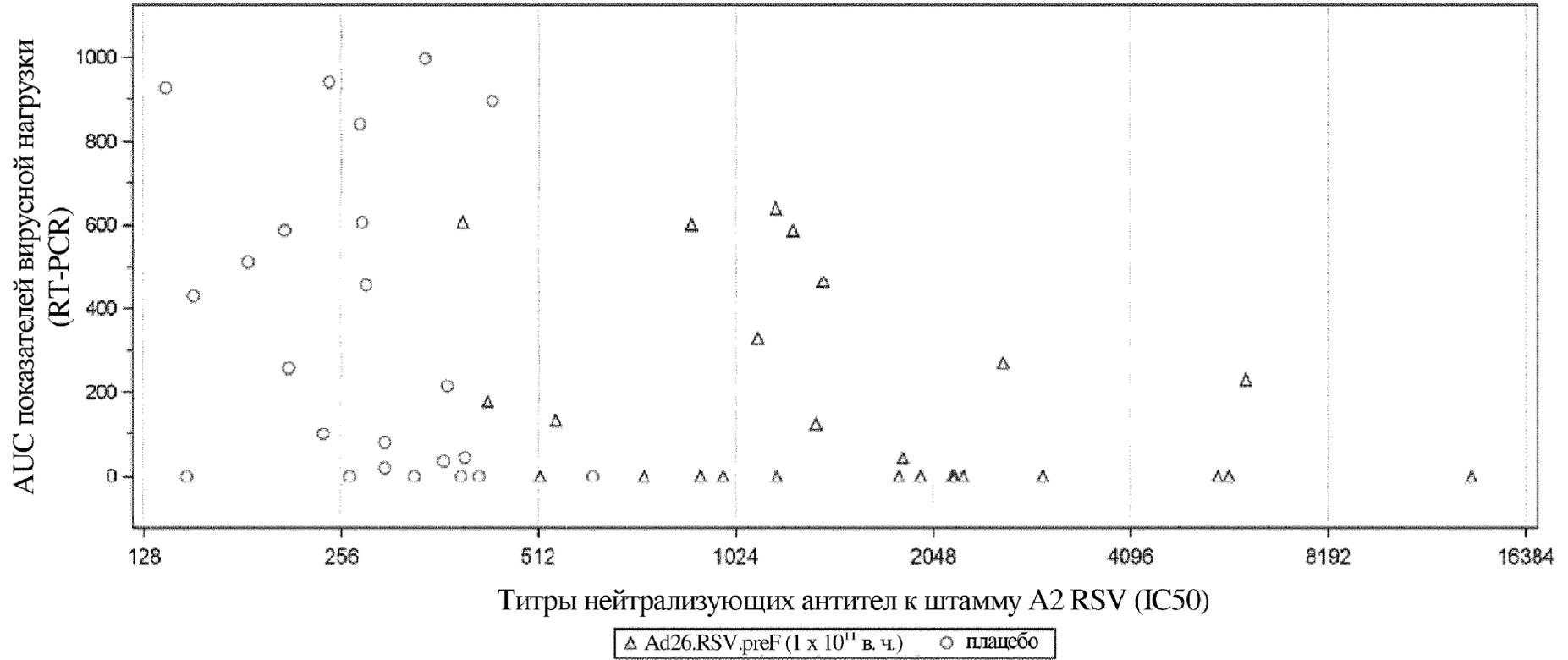


Фиг. 15

Титры нейтрализующих антител к штамму A2 RSV



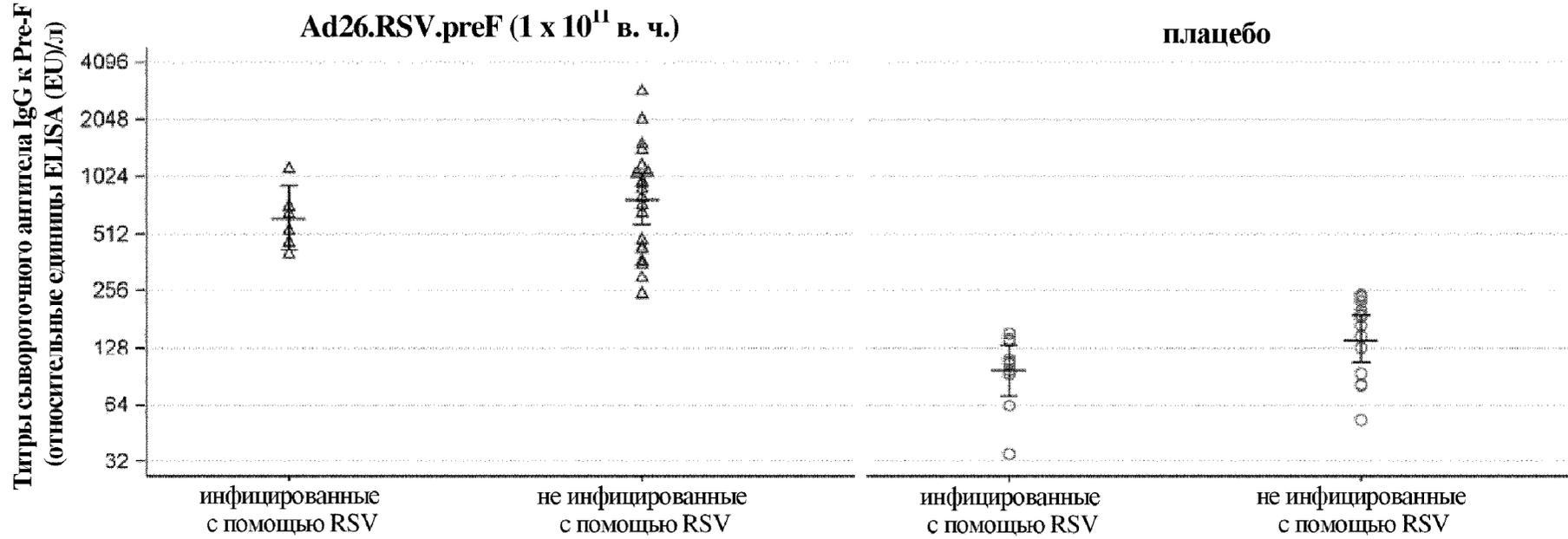
AUC VL (RT-PCR) по сравнению с VNA A2 (28 дней после вакцинации)



17/19

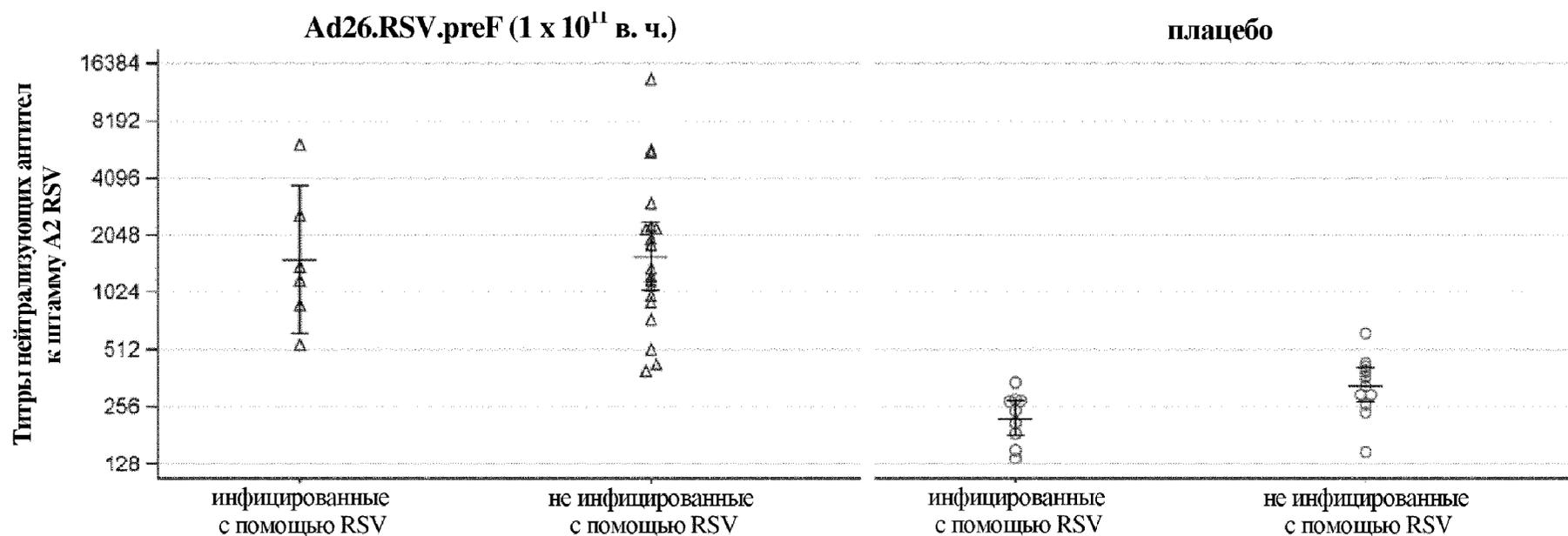
Фиг. 17

Симптоматическая инфекция, вызванная RSV, определенная консервативным способом



Консервативный способ: RT-PCR > LLOQ в 2 или более раз и наличие клинических симптомов из 2 разных категорий или любого симптома 2 степени. Вывод данных ограничен субъектами, которых подвергли контрольному заражению.

Симптоматическая инфекция, вызванная RSV, определенная консервативным способом



19/19

Консервативный способ: RT-PCR > LLOQ в 2 или более раз и наличие клинических симптомов из 2 разных категорий или любого симптома 2 степени.  
 Вывод данных ограничен субъектами, которых подвергли контрольному заражению.

Фиг. 19