

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290073 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.18

(54) КОМБИНАЦИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И АНТИТЕЛА К PD-1

(31) 62/862,774

(72) Изобретатель:
Хортон Хелен, Де Крес Ан Мартин М,
Ван Гюльк Эллен Розали А (BE)

(32) 2019.06.18

(33) US

(86) PCT/IB2020/055698

(87) WO 2020/255009 2020.12.24

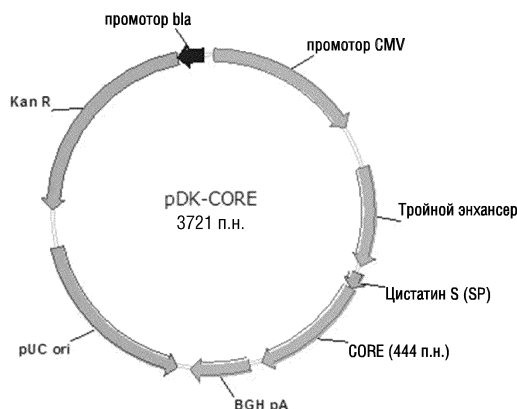
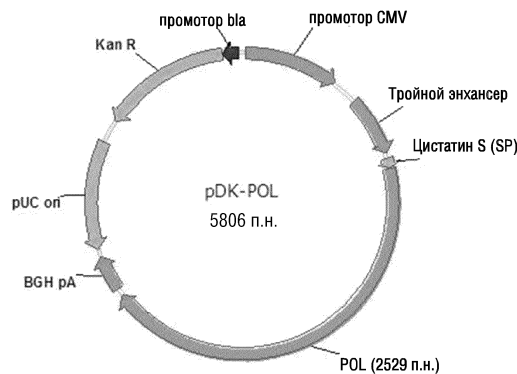
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(88) 2021.02.04

(71) Заявитель:

ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE)

(57) Описаны терапевтические комбинации вакцин против вируса гепатита В (HBV) и антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. Также описаны способы индукции иммунного ответа против HBV или способы лечения заболевания, вызванного HBV, в частности, у лиц, страдающих хронической инфекцией HBV, с использованием раскрытых терапевтических комбинаций.



202290073

A1

A1

202290073

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572727EA/032

КОМБИНАЦИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И АНТИТЕЛА К PD-1

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИВЕДЕНА В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Эта заявка содержит список последовательностей, который отправляется в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065814_14WO1_Sequence_Listing» и датой создания 15 июня 2020 г. и размером 55 Кб. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки № 62/862,754, поданной 18 июня 2019 г., описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой небольшой гепатотропный ДНК-вирус размером 3,2 т.п.н., который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Приблизительно 240 миллионов человек имеют хроническую инфекцию гепатита В (хронический HBV), характеризующуюся персистенцией вирусных и субвирусных частиц в крови более 6 месяцев (Cohen et al. *J. Viral Hepat.* (2011) 18(6), 377-83). Персистирующая инфекция HBV приводит к истощению Т-клеток в циркулирующих и внутрипеченочных HBV-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках посредством хронической стимуляции HBV-специфических Т-клеточных рецепторов вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате снижается полифункциональность Т-клеток (т. е. снижается уровень IL-2, фактора некроза опухоли (TNF)- α , IFN- γ и отсутствует пролиферация).

Безопасная и эффективная профилактическая вакцина против инфекции HBV доступна с 1980-х годов и является основой профилактики гепатита В (Всемирная организация здравоохранения, Гепатит В: информационный бюллетень № 204 [Интернет], март 2015 г.). Всемирная организация здравоохранения рекомендует вакцинировать всех детей грудного возраста, а в странах с низкой или средней эндемичностью по гепатиту В - всех детей и подростков (младше 18 лет), а также лиц из определенных категорий населения, подверженных риску. Благодаря вакцинации уровень заболеваемости во всем мире резко снизился. Однако профилактические вакцины не излечивают установленную инфекцию HBV.

Хронический HBV в настоящее время лечат интерфероном- α и аналогами нуклеозидов или нуклеотидов, но окончательного излечения не существует из-за сохранения в инфицированных гепатоцитах промежуточного продукта внутриклеточной репликации вируса, называемого ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), который играет фундаментальную роль в качестве матрицы для вирусных РНК и, таким

образом, новых вирионов. Считается, что индуцированные вирус-специфические Т- и В-клеточные ответы могут эффективно устранять гепатоциты, несущие кзкДНК. Современные терапии, нацеленные на полимеразу HBV, подавляют виремию, но оказывают ограниченное влияние на кзкДНК, которая находится в ядре, и связанную с этим продукцию циркулирующего антигена. Наиболее строгой формой лечения может быть элиминация кзкДНК HBV из организма, что не наблюдалось ни как естественное явление, ни как результат какого-либо терапевтического вмешательства. Однако потеря поверхностных антигенов HBV (HBsAg) является клинически достоверным эквивалентом излечения, поскольку рецидив заболевания может произойти только в случаях тяжелой иммуносупрессии, которую затем можно предотвратить с помощью профилактического лечения. Таким образом, по меньшей мере с клинической точки зрения, потеря HBsAg связана с наиболее строгой формой восстановления иммунитета против HBV.

Например, иммуномодуляция с помощью пегилированного интерферона (pegIFN)- α оказалась лучше по сравнению с терапией нуклеозидами или нуклеотидами с точки зрения устойчивого ответа без лечения с ограниченным курсом лечения. Сообщается, что помимо прямого противовирусного эффекта, IFN- α оказывает эпигенетическое подавление кзкДНК в культуре клеток и у гуманизированных мышей, что приводит к снижению продуктивности вирионов и транскриптов (Belloni et al. *J. Clin. Invest.* (2012) 122(2), 529-537). Однако эта терапия по-прежнему сопряжена с побочными эффектами, и общий ответ довольно низок, отчасти потому, что IFN- α оказывает лишь слабое модулирующее влияние на HBV-специфические Т-клетки. В частности, показатели излечения низкие ($< 10\%$), а токсичность высока. Аналогичным образом противовирусные препараты прямого действия против HBV, а именно ингибиторы полимеразы HBV энтекавир и тенофовир, эффективны в качестве монотерапии для индукции подавления вируса с высоким генетическим барьером для появления лекарственно-устойчивых мутантов и последовательного предотвращения прогрессирования заболевания печени. Однако излечение хронического гепатита В, определяемое по потере HBsAg или сероконверсии, редко достигается с помощью таких ингибиторов полимеразы HBV. Следовательно, эти противовирусные препараты теоретически необходимо принимать в течение неопределенного срока, чтобы предотвратить рецидив заболевания печени, аналогично антиретровирусной терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Терапевтическая вакцинация может элиминировать HBV у хронически инфицированных пациентов (Michel et al. *J. Hepatol.* (2011) 54(6), 1286-1296). Были изучены многие стратегии, но на сегодняшний день терапевтическая вакцинация не доказала свою эффективность.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, существует неудовлетворенная медицинская потребность в способе лечения вируса гепатита В (HBV), особенно хронического HBV, с конечным хорошо переносимым лечением с более высокой степенью излечения. Изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая терапевтические комбинации или композиции

и способы индукции иммунного ответа против инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Иммуногенные композиции/комбинации и способы по изобретению можно использовать для обеспечения терапевтического иммунитета у пациента, такого как пациент, страдающий хронической инфекцией HBV.

В общем аспекте заявка относится к терапевтическим комбинациям или композициям, содержащим один или более антигенов HBV или один или более полинуклеотидов, кодирующих антигены HBV, и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, для применения в лечении инфекции HBV у пациента.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична SEQ ID NO: 2,

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV;

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, а антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере один компонент из числа антигена полимеразы HBV и укороченного корового антигена HBV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация содержит антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере одну молекулу из числа первой молекулы нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы вируса гепатита В. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты не природного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную

последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV, а вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV, предпочтительно, сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15, более предпочтительно, сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, применимое по изобретению, а также соответствующая информация, такая как его структура, продукция, биологическая активность, терапевтическое применение и т. д., описаны Публикации заявки на патент США № 2017/0121409 (US20170121409), содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация содержит:

а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, как например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 2;

б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H; и

с) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и определяющую комплементарность область 1

легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно.

Предпочтительно терапевтическая комбинация содержит а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровий антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и (с) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: i) 32, 35, 38, 42, 48 и 53, соответственно; ii) 32, 35, 38, 43, 48 и 54, соответственно; iii) 32, 36, 38, 44, 49 и 55, соответственно; iv) 32, 36, 38, 44, 48 и 56, соответственно; v) 32, 36, 38, 45, 50 и 57, соответственно; vi) 32, 35, 39, 42, 48 и 53, соответственно; vii) 32, 35, 39, 42, 48 и 58, соответственно; viii) 32, 35, 39, 43, 48 и 54, соответственно; ix) 32, 35, 39, 43, 49 и 59, соответственно; x) 32, 35, 39, 45, 48 и 54, соответственно; xi) 32, 36, 39, 45, 50 и 57, соответственно; xii) 32, 36, 39, 44, 48 и 56, соответственно; или xiii) 32, 36, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

Предпочтительно терапевтическая комбинация содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Более предпочтительно, терапевтическая комбинация содержит а) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3; б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6; и с) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: i) 32, 35, 38, 42, 48 и 53, соответственно; ii) 32, 35, 38, 43, 48 и 54, соответственно; iii) 32, 36, 38, 44, 49 и 55, соответственно; iv) 32, 36, 38, 44, 48 и 56, соответственно; v) 32, 36, 38, 45, 50 и 57, соответственно; vi) 32, 35, 39, 42, 48 и 53, соответственно; vii) 32, 35, 39, 42, 48 и 58, соответственно; viii) 32, 35, 39, 43, 48 и 54, соответственно; ix) 32, 35, 39, 43, 49 и 59, соответственно; x) 32, 35, 39, 45, 48 и 54, соответственно; xi) 32, 36, 39, 45, 50 и 57, соответственно; xii) 32, 36, 39, 44, 48 и 56, соответственно; или xiii) 32, 36, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

В одном варианте осуществления каждая из первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК,

предпочтительно, молекула ДНК присутствует в плазмиде или вирусном векторе.

В другом варианте осуществления каждая из первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу РНК, предпочтительно мРНК или самореплицирующуюся молекулу РНК.

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо включена в состав вместе с липидной наночастицей (LNP).

В другом общем аспекте заявка относится к набору, включающему терапевтическую комбинацию согласно заявке.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору для применения для индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV); и к применению терапевтической комбинации, композиции или набора для применения в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV). Применение может дополнительно включать комбинацию с другим иммуногенным или терапевтическим агентом, предпочтительно, с другим антигеном HBV или с другой терапией HBV. Предпочтительно пациент страдает хронической инфекцией HBV.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору согласно заявке для применения в лечении HBV-индуцированного заболевания у пациента; и к применению терапевтической комбинации или набора согласно заявке в получении лекарственного средства для лечения HBV-индуцированного заболевания у пациента. Применение может дополнительно включать комбинацию с другим терапевтическим агентом, предпочтительно с другим антигеном против HBV. Предпочтительно пациент страдает хронической инфекцией HBV, и HBV-индуцированное заболевание выбрано из группы, состоящей из выраженного фиброза, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Заявка также относится к способу индукции иммунного ответа против HBV или к способу лечения HBV-инфекции или HBV-индуцированного заболевания, включающему введение пациенту терапевтической комбинации в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего описания, включая подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, а также прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность изобретения, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше понятны при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что применение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На ФИГ. 1А и ФИГ. 1В показаны схематические изображения ДНК-плазмид согласно вариантам осуществления заявки; На ФИГ. 1А показана ДНК-плазида,

кодирующая коровый антиген HBV, в соответствии с вариантом осуществления заявки; На ФИГ. 1В показана ДНК-плазмида, кодирующая антиген HBV-полимеразы (pol) в соответствии с вариантом осуществления заявки; коровый антиген HBV и pol-антигены экспрессируются под контролем промотора CMV с N-концевым сигнальным пептидом цистатина S, который отщепляется от экспрессированного антигена при секреции из клетки; транскрипционные регуляторные элементы плазмиды включают энхансерную последовательность, расположенную между промотором CMV и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV, и последовательность полиаденилирования bGH, расположенную ниже по ходу транскрипции полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV; вторая экспрессирующая кассета включена в плазмиду в обратной ориентации, включая ген устойчивости к канамицину под контролем промотора Amp^r(bla); последовательность точки начала репликации (pUC) также включена в обратной ориентации.

На ФИГ. 2А и ФИГ.2В. показаны схематические изображения экспрессирующих кассет в аденовирусных векторах согласно вариантам осуществления заявки; На ФИГ. 2А показана экспрессирующая кассета для укороченного корового антигена HBV, которая содержит промотор CMV, интрон (фрагмент, полученный из гена ApoA1 человека - номер доступа GenBank X01038, пары оснований 295-523, содержащий второй интрон ApoA1), сигнал секреции иммуноглобулина человека, за которым следует кодирующая последовательность для укороченного корового антигена HBV и сигнал полиаденилирования SV40; На ФИГ. 2В показана экспрессирующая кассета для слитого белка укороченного корового антигена HBV, функционально связанного с антигеном полимеразы HBV, которая во всем остальном идентична экспрессирующей кассете для укороченного корового антигена HBV, за исключением антигена HBV.

На ФИГ. 3 показаны ответы ELISPOT мышей Balb/c, иммунизированных различными ДНК-плазмидами, экспрессирующими коровый антиген HBV или pol-антиген HBV, как описано в Примере 3; пулы пептидов, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных из различных групп вакцинированных животных, показаны серым цветом; количество отвечающих Т-клеток указано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10^6 спленоцитов;

На ФИГ. 4А и ФИГ. 4В показаны иммунные ответы, измеренные с помощью ELISPOT у мышей, которым вводили ДНК-плазмиды в соответствии с вариантами осуществления заявки (в d0 и d21) вместе с антителом против PD-1 или изотипическими антителами в соответствии с вариантами осуществления заявки; На ФИГ. 4А показаны результаты для мышей, которые получили 3 инъекции антитела к PD-1 (показано черным) или изотипа (показано серым), начиная с 1 недели после первой вакцинации (т. е. d7, d14, d21); На ФИГ. 4В показаны результаты для мышей, которых обрабатывали антителом против PD-1 (показано черным) или изотипом (показано серым) одновременно с первой вакцинацией, а затем каждые 7 дней (т. е. d0, d7, d14, d21); и

На ФИГ. 5А, ФИГ. 5В, ФИГ. 5С, ФИГ. 5D, ФИГ. 5Е и ФИГ. 5F показаны иммунные

ответы, измеренные с помощью ICS спленоцитов, выделенных от мышей, которым вводили ДНК-плазмиды в соответствии с вариантами осуществления заявки (в d0 и d21) вместе с антителом против PD-1 или изотипическим антителом в соответствии с вариантами осуществления заявки, результаты представлены как среднее +/- SEM; спленоциты стимулировали core (ФИГ. 5A и ФИГ. 5D), pol1 (ФИГ. 5B и ФИГ. 5E) или pol2 (ФИГ. 5C и ФИГ. 5F) в течение 6 часов, и затем измеряли ответы против IFN- γ , IL-2 или TNF- α ; На ФИГ. 5A, ФИГ. 5B и ФИГ. 5C показаны результаты для спленоцитов, выделенных от мышей, которым сделали 3 инъекции антитела к PD-1 (показано черным) или изотипического антитела (показано серым), начиная с 1 недели после первой вакцинации (т. е. d7, d14, d21); На ФИГ. 5D, ФИГ. 5E и ФИГ. 5F показаны результаты для мышей, которых обрабатывали антителом против PD-1 (показано черным) или изотипическим антителом (показано серым) одновременно с первой вакцинацией, а затем каждые 7 дней (т. е. d0, d7, d14, d21).

На ФИГ. 6 показана пролиферативная способность CD8+Т-клеток во внутривенных лимфоцитах (IHL), выделенных от мышей, которым вводили ДНК-плазмиды согласно вариантам осуществления заявки (в дни 28 и 49) вместе с антителом против PD-1 или изотипическим антителом согласно вариантам осуществления заявки, результаты представлены как среднее значение +/- SEM.

На ФИГ. 7 показана пролиферативная способность CD8+ Т-клеток в спленоцитах, выделенных от мышей, которым вводили ДНК-плазмиды согласно вариантам осуществления заявки (в дни 28 и 49) вместе с антителом против PD-1 или изотипическим антителом согласно вариантам осуществления заявки, результаты представлены как среднее +/- SEM.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в уровне техники и по всему описанию; каждая из этих ссылок включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и т. п., которые были включены в настоящее описание, проводится с целью обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть предшествующего уровня техники в отношении любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в рамках изобретения, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом области, к которой относится настоящее изобретение. В остальном некоторые используемые в настоящем описании термины имеют значение, указанное в описании. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, цитируемые здесь, включены в качестве ссылки, как если бы они были изложены здесь полностью.

Следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисту в данной области понятно или он способен выявить с использованием не более чем обычного эксперимента много эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем изобретении. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены изобретением.

Во всем этом описании и в последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. Используемый в настоящем описании термин «содержащий» может быть заменен термином «включающий» или иногда термином «имеющий».

Используемый в настоящем описании термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в элементе формулы изобретения. Используемый в настоящем описании термин «состоящий по существу из» не исключает материалов или стадий, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов «содержащий», «включающий» и «имеющий», всякий раз, когда он используется в настоящем изобретении в контексте аспекта или варианта осуществления заявки, может быть заменен термином «состоящий из» или «состоящий по существу из», чтобы изменить объем описания.

Используемый в настоящем описании соединительный термин «и/или» между несколькими указанными элементами понимают как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или», используемого в настоящем описании. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимают как подпадающее под это значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина «и/или».

Если не указано иное, любое численное значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем изобретении, следует понимать как измененное во всех случаях термином «приблизительно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1 мг/мл до 10 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 11 мг/мл. Используемый в настоящем описании термин «числовой диапазон» явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах

и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

Выражения «процент (%) идентичности последовательности» или «% идентичности» или «% идентичный» при использовании в отношении аминокислотной последовательности описывают количество совпадений («соответствий») идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, при использовании выравнивания для двух или более последовательностей процент одинаковых аминокислотных остатков (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по всей длине аминокислотных последовательностей) можно определить, когда последовательности сравнивают и выравнивают для максимального соответствия, измеренного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области, или при ручном выравнивании и визуальной оценке. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут различаться заменой(заменами), вставкой(вставками) или делецией(делециями) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалисту в данной области. Процентную идентичность белковых последовательностей можно, например, определить с помощью таких программ, как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с использованием алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402).

Используемые в настоящем описании термины и выражения «в комбинации», «в комбинации с», «совместная доставка» и «вводится вместе с» в контексте введения двух или более видов терапии или компонентов пациенту относятся к одновременному введению или последовательному введению двух или более видов терапии или компонентов, таких как два вектора, например, ДНК-плазмиды, пептиды или терапевтическая комбинация и адъювант. «Одновременное введение» может представлять собой введение двух или более видов терапии или компонентов по меньшей мере в течение одного и того же дня. Когда два компонента «вводят вместе с» или «вводят в комбинации с», их можно вводить в виде отдельных композиций последовательно в течение короткого периода времени, такого как 24, 20, 16, 12, 8 или 4 часа, или в течение 1 часа, или их можно вводить в виде одной композиции одновременно. «Последовательное введение» может представлять собой введение двух или более видов терапии или компонентов в один и тот же день или в разные дни. Использование термина «в комбинации с» не ограничивает порядок, в котором пациенту вводят терапевтические средства или компоненты. Например, первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) можно вводить до (например, с интервалом от 5 минут до одного часа), вместе или одновременно или после (например, с интервалом от 5 минут до часа) введения второй терапии или компонента (например, второй плазмиды ДНК, кодирующей антиген HBV) и/или третьей терапии или компонента (например, антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента). В некоторых

вариантах осуществления первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV), вторую терапию или компонент (например, вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) и третью терапию или компонент (например, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент) вводят в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления первую терапию или компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV), вторую терапию или компонент (например, вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) и третью терапию или компонент (например, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент) вводят в виде отдельных композиций, таких как две или три отдельные композиции.

Используемый в настоящем описании термин нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, которые не встречаются в природе. Нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» могут быть синтезированы, обработаны, изготовлены и/или обработаны иным образом в лабораторных и/или производственных условиях. В некоторых случаях нуклеиновая кислота или полипептид неприродного происхождения может включать встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту или полипептид, которые обрабатывают, процессируют или подвергают манипуляциям для проявления свойств, отсутствовавших у природной нуклеиновой кислоты или полипептида до обработки. Используемый в настоящем описании термин нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» может быть нуклеиновой кислотой или полипептидом, выделенным или отделенным из природного источника, в котором он был обнаружен, и в нем отсутствуют ковалентные связи с последовательностями, с которыми он был связан в природном источнике. Нуклеиновая кислота или полипептид «неприродного происхождения» могут быть получены рекомбинантно или с помощью других способов, таких как химический синтез.

Используемый в настоящем описании термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут лечить или лечили способом согласно варианту осуществления заявки. Термин «млекопитающее», используемый в настоящем описании, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов (NHP), не относящихся к человеку, таких как мартышки или человекообразные обезьяны, человека и т. д., более предпочтительно человека.

Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» относится к связи или соединению, в котором описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Например, регуляторная последовательность, функционально связанная с интересующей последовательностью нуклеиновой кислоты, способна направлять транскрипцию интересующей последовательности нуклеиновой кислоты, или сигнальная

последовательность, функционально связанная с интересующей аминокислотной последовательностью, способна секретировать или перемещать интересующую аминокислотную последовательность через мембрану.

В попытке помочь читателю заявки описание было разделено на различные абзацы или разделы, или оно относится к различным вариантам осуществления заявки. Эти разделения не следует рассматривать как отделение существа абзаца или раздела или вариантов осуществления от существа другого абзаца или раздела или вариантов осуществления. Наоборот, специалист в данной области поймет, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, абзацев и предложений, которые можно рассматривать. Обсуждение любого варианта осуществления предназначено только для примера и не предполагает, что объем описания, включая формулу изобретения, ограничен этими примерами. Например, хотя варианты осуществления векторов HBV согласно заявке (например, плазмидная ДНК или вирусные векторы), описанные в настоящем изобретении, могут содержать определенные компоненты, включающие, помимо прочего, определенные промоторные последовательности, энхансерные или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, кодирующую последовательность антигена HBV, сигнальные последовательности полиаденилирования и т. д., расположенные в определенном порядке, специалисты в данной области поймут, что концепции, раскрытые в настоящем описании, могут в равной степени применяться к другим компонентам, расположенным в другом порядке, которые можно использовать в векторах HBV согласно заявке. Заявка предполагает использование любого из применимых компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, которая может быть использована в векторах HBV согласно заявке, независимо от того, описана ли четко конкретная комбинация или нет. Изобретение в основном относится к терапевтической комбинации, содержащей один или более антигенов HBV и по меньшей мере одно антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вирус гепатита В (HBV)

Используемый в настоящем описании термин «вирус гепатита В» или «HBV» относится к вирусу семейства *hepadnaviridae*. HBV представляет собой небольшой (например, 3,2 т.п.н.) гепатотропный ДНК-вирус, который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Семь белков, кодируемых HBV, включают малый (S), средний (M) и большой (L) поверхностный антиген (HBsAg) или белки оболочки (Env), белок рге-Core, коровый белок, вирусную полимеразу (Pol) и HBx белок. HBV экспрессирует три поверхностных антигена, или оболочечных белка, L, M и S, причем S является наименьшим, а L - наибольшим. Дополнительные домены в белках M и L называются Pre-S2 и Pre-S1, соответственно. Коровый белок является субъединицей вирусного нуклеокапсида. Pol необходим для синтеза вирусной ДНК (обратная транскриптаза, РНКазы H и праймер), который происходит в нуклеокапсидах, локализованных в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. PreCore является коровым

белком с N-концевым сигнальным пептидом и протеолитически процессируется на его N- и C-концах перед секрецией из инфицированных клеток в виде так называемого е-антигена гепатита В (HBeAg). Белок HBx необходим для эффективной транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). HBx не является вирусным структурным белком. Все вирусные белки HBV имеют свою собственную мРНК, за исключением коровых и полимеразы, которые имеют общую мРНК. За исключением белка pre-Core, ни один из вирусных белков HBV не подвергается посттрансляционному протеолитическому процессингу.

Вирион HBV содержит вирусную оболочку, нуклеокапсид и единственную копию генома частично двухцепочечной ДНК. Нуклеокапсид состоит из 120 димеров корового белка и покрыт капсидной мембраной, встроенной в S, M и L вирусную оболочку или поверхностные антигенные белки. После проникновения в клетку вирус освобождается от оболочки, и содержащая капсид релаксированная кольцевая ДНК (ркДНК) с ковалентно связанной вирусной полимеразой мигрирует в ядро. Во время этого процесса фосфорилирование корового белка вызывает структурные изменения, экспонируя сигнал ядерной локализации, позволяющий взаимодействовать капсиду с так называемыми импортинами. Эти импортины опосредуют связывание корового белка с комплексами ядерных пор, после чего капсид деструктурируется и комплекс полимеразы/кДНК высвобождается в ядро. Внутри ядра ркДНК депротеинизируется (удаление полимеразы) и преобразуется механизмом репарации ДНК хозяина в геном ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), из которого перекрывающиеся транскрипты кодируют HBeAg, HBsAg, коровый белок, вирусную полимеразу и белок HBx. Коровой белок, вирусная полимеразы и прегеномная РНК (пгРНК) связываются в цитоплазме и самособираются в незрелые пгРНК-содержащие капсидные частицы, которые затем превращаются в зрелые ркДНК-капсиды и функционируют как общий промежуточный продукт, который либо покрывается оболочкой, либо секретируется в виде инфекционных вирусных частиц или транспортируются обратно в ядро для пополнения и поддержания стабильного пула кзкДНК.

На сегодняшний день HBV подразделяется на четыре серотипа (adr, adw, ayg, ayw) на основе антигенных эпитопов, присутствующих на белках оболочки, и на восемь генотипов (A, B, C, D, E, F, G и H) на основе последовательности вирусного генома. Генотипы HBV распределены по разным географическим регионам. Например, наиболее распространенными генотипами в Азии являются генотипы B и C. Генотип D доминирует в Африке, на Ближнем Востоке и в Индии, тогда как генотип A широко распространен в Северной Европе, странах Африки к югу от Сахары и Западной Африке.

Антигены HBV

Используемые в настоящем описании термины «антиген HBV», «антигенный полипептид HBV», «HBV антигенный полипептид», «антигенный белок HBV», «иммуногенный полипептид HBV» и «иммуноген HBV» относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-

опосредованный ответ против HBV у пациента. Антиген HBV может представлять собой полипептид HBV, его фрагмент или эпитоп или комбинацию более полипептидов HBV, их частей или производных. Антиген HBV способен вызывать у хозяина защитный иммунный ответ, например, индуцировать иммунный ответ против вирусного заболевания или инфекции, и/или продуцировать иммунитет (т.е. вакцинировать) у пациента против вирусного заболевания или инфекции, что защищает пациента от вирусного заболевания или инфекции. Например, антиген HBV может содержать полипептид или его иммуногенный(иммуногенные) фрагмент(фрагменты) из любого белка HBV, такого как HBeAg, pre-Core белок, HBsAg (белки S, M или L), коровый белок, вирусная полимераза или белок HBx, полученный из любого генотипа HBV, например, генотипа A, B, C, D, E, F, G и/или H, или их комбинации.

(1) Коровый антиген HBV

Используемый в настоящем описании каждый из терминов «коровый антиген HBV», «HBc» и «коровый антиген» относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против корового белка HBV у пациента. Каждый из терминов «коровый», «коровый полипептид» и «коровый белок» относится к коровому белку вируса HBV. Полноразмерный коровый антиген обычно имеет длину 183 аминокислоты и включает домен сборки (аминокислоты от 1 до 149) и домен связывания нуклеиновой кислоты (аминокислоты от 150 до 183). Домен связывания нуклеиновой кислоты из 34 остатков необходим для инкапсуляции прегеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта. Он состоит из 17 остатков аргинина и является сильно основным, что соответствует его функции. Коровый белок HBV является димерным в растворе, при этом димеры самособираются в икосаэдрические капсиды. Каждый димер корового белка имеет четыре пучка α -спиралей, окруженных доменом α -спирали с каждой стороны. Укороченные коровые белки HBV, лишённые домена связывания нуклеиновой кислоты, также способны образовывать капсиды.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV представляет собой укороченный коровый антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин «укороченный коровый антиген HBV» относится к антигену HBV, который не содержит всей длины корового белка HBV, но способен индуцировать иммунный ответ против корового белка HBV у пациента. Например, коровый антиген HBV может быть модифицирован для удаления одной или более аминокислот сильно положительно заряженного (богатого аргинином) С-концевого связывающего нуклеиновую кислоту домена корового антигена, который обычно содержит семнадцать остатков аргинина (R). Укороченный коровый антиген HBV согласно заявке предпочтительно представляет собой укороченный с С-конца коровый белок HBV, который не содержит сигнала ядерного импорта корового белка HBV, и/или укороченный коровый белок HBV, из которого удален С-концевой сигнал ядерного импорта. В одном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене связывания

нуклеиновой кислоты, такую как делеция от 1 до 34 аминокислотных остатков в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, например, делеция 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислотных остатков, предпочтительно, делеция всех 34 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления укороченный коровый антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, предпочтительно делецию всех 34 аминокислотных остатков.

Коровый антиген HBV согласно заявке может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из нескольких генотипов HBV (например, генотипов А, В, С, D, E, F, G и H). Используемый в настоящем описании термин «консенсусная последовательность» означает искусственную последовательность аминокислот, полученную на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, как определено путем выравнивания (например, с использованием Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Это может быть рассчитанный порядок наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, обнаруженных в каждом положении при выравнивании последовательностей, полученный на основе последовательностей антигенов HBV (например, core, pol и т. д.) по меньшей мере из 100 природных изолятов HBV. Консенсусная последовательность может быть неприродного происхождения и отличаться от нативных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности могут быть разработаны путем выравнивания нескольких последовательностей антигена HBV из разных источников с использованием инструмента выравнивания множества последовательностей и в различных положениях выравнивания путем выбора наиболее часто встречающейся аминокислоты. Предпочтительно консенсусная последовательность антигена HBV происходит от генотипов HBV В, С и D. Термин «консенсусный антиген» используется для обозначения антигена, имеющего консенсусную последовательность.

Типовой укороченный коровый антиген HBV в соответствии с заявкой не обладает функцией связывания нуклеиновой кислоты и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Предпочтительно, укороченный коровый антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и D HBV. Более предпочтительно, укороченный коровый антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

Предпочтительно коровый антиген HBV согласно заявке представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, более предпочтительно, укороченный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Типовой укороченный коровый консенсусный антиген HBV согласно заявке состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%,

99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 представляют собой коровые консенсусные антигены, полученные из генотипов В, С и D HBV. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 содержит С-концевую делецию 34 аминокислот сильно положительно заряженного (богатого аргинином) домена связывания нуклеиновой кислоты нативного корового антигена.

В одном варианте осуществления заявки коровый антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления коровый антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления коровый антиген HBV дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом зрелой последовательности корового антигена HBV, такую как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

(2) Антиген Полимеразы HBV

Используемый в настоящем описании термин «антиген полимеразы HBV», «pol-антиген HBV» или «pol-антиген HBV» относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против полимеразы HBV у пациента. Каждый из терминов «полимераза», «полимеразный полипептид», «Pol» и «pol» относится к вирусной ДНК-полимеразе HBV. Вирусная ДНК-полимераза HBV имеет четыре домена, в том числе от N-конца до С-конца домен терминального белка (TP), который действует как праймер для синтеза минус-цепи ДНК; спейсер, который не является необходимым для функций полимеразы; домен обратной транскриптазы (RT) для транскрипции; и домен РНКазы Н.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV включает pol-антиген HBV или любой иммуногенный фрагмент или их комбинацию. Pol-антиген HBV может содержать дополнительные модификации для улучшения иммуногенности антигена, такие как введение мутаций в активные участки доменов полимеразы и/или РНКазы для снижения или по существу устранения определенных ферментативных активностей.

Предпочтительно pol-антиген HBV согласно заявке не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Pol-антиген HBV предпочтительно способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и HBVD. Более предпочтительно, pol-антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления pol-антиген HBV представляет собой инактивированный pol-антиген. В одном варианте осуществления

инактивированный pol-антиген HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте полимеразного домена. В другом варианте осуществления инактивированный pol-антиген HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте домена РНКазы Н. В предпочтительном варианте осуществления инактивированный pol-антиген HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном сайте как домена полимеразы, так и домена РНКазы Н. Например, мотив «YXDD» в домене полимеразы антигена pol HBV, который может потребоваться для связывания нуклеотида/иона металла, может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) остатками аспарагина (N), устраняя или уменьшая координационную функцию металлов, тем самым уменьшая или по существу устраняя функцию обратной транскриптазы. В качестве альтернативы или в дополнение к мутации мотива «YXDD» мотив «DEDD» в домене РНКазы Н антигена pol HBV, необходимый для координации Mg^{2+} , может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) на остатки аспарагина (N) и/или путем замены остатка глутамата (E) на глутамин (Q), тем самым снижая или существенно устраняя функцию РНКазы Н. В конкретном варианте осуществления pol-антиген HBV модифицируют путем (1) мутации остатков аспартата (D) на остатки аспарагина (N) в мотиве «YXDD» полимеразного домена; и путем (2) мутации первого остатка аспартата (D) на остаток аспарагина (N) и первого остатка глутамата (E) на остаток глутамина (N) в мотиве «DEDD» домена РНКазы Н, тем самым снижая или существенно устраняя функции обратной транскриптазы и РНКазы Н антигена pol.

В предпочтительном варианте осуществления заявки pol-антиген HBV представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, более предпочтительно инактивированный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Типовой консенсусный антиген HBV pol согласно заявке содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 7 представляет собой консенсусный pol-антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, содержащий четыре мутации, расположенные в активных сайтах доменов полимеразы и РНКазы Н. В частности, четыре мутации включают мутацию остатков аспарагиновой кислоты (D) в остатки аспарагина (N) в мотиве «YXDD» полимеразного домена; и мутацию первого остатка аспартата (D) в остаток аспарагина (N) и мутацию остатка глутамата (E) в остаток глутамина (Q) в мотиве «DEDD» домена РНКазы Н.

В конкретном варианте осуществления заявки pol-антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В других вариантах применения pol-

антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления pol-антиген HBV дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом зрелой последовательности pol-антигена HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

(3)Слияние корового антигена HBV и антигена полимеразы HBV

Используемый в настоящем описании термин «слитый белок» или «слияние» относится к одиночной полипептидной цепи, имеющей по меньшей мере два полипептидных домена, которые в норме не присутствуют в одном природном полипептиде.

В одном варианте осуществления заявки антиген HBV содержит слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, функционально связанный с pol-антигеном HBV, или pol-антиген HBV, функционально связанный с укороченным коровым антигеном HBV, предпочтительно посредством линкера.

Например, в слитом белке, содержащем первый полипептид и второй гетерологичный полипептид, линкер служит главным образом в качестве спейсера между первым и вторым полипептидами. В одном варианте осуществления линкер состоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот. В одном варианте осуществления от 1 до 20 аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Предпочтительно, линкер состоит из большинства стерически не связанных аминокислот, таких как глицин и аланин. Примерами линкеров являются полиглицины, в частности (Gly)₅, (Gly)₈; поли(Gly-Ala) и полиаланины. Одним иллюстративным подходящим линкером, как показано в Примерах ниже, является (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

Предпочтительно, слитый белок согласно заявке способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против корового белка HBV и Pol HBV по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно, слитый белок способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего, по меньшей мере, против генотипов В, С и D HBV. Более предпочтительно, слитый белок способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека, по меньшей мере, против генотипов А, В, С и D HBV.

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

SEQ ID NO: 7.

В предпочтительном варианте осуществления заявки слитый белок содержит укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5, и роI-антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Более предпочтительно, слитый белок согласно варианту осуществления заявки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом слитого белка. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Дополнительные сведения о вакцинах против HBV, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны в Заявке на патент США №: 16/223251, поданной 18 декабря 2018 г., содержание заявки, более предпочтительно, примеры заявки настоящим включены в качестве ссылки в полном объеме.

Полинуклеотиды и векторы

В другом общем аспекте заявка относится к молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, кодирующей антиген HBV, применяемый по изобретению, в соответствии с вариантами осуществления заявки, и к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту неприродного происхождения. Первая или вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения может содержать любую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV, применяемый согласно заявке, которую можно получить с использованием способов, известных в данной области, в свете настоящего изобретения. Предпочтительно, первый или второй полинуклеотид кодирует по меньшей мере один из укороченного корового антигена HBV и антигена полимеразы HBV согласно заявке. Полинуклеотид может быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной рекомбинантными методами (например, клонированием) или полученной синтетическим путем (например, химическим синтезом). ДНК может быть одноцепочечной или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. ДНК может, например, содержать геномную ДНК, кДНК или их комбинации. Полинуклеотид также может быть гибридом ДНК/РНК. Полинуклеотиды и векторы согласно заявке могут быть использованы для получения рекомбинантного белка, экспрессии белка в клетке-хозяине или для производства вирусных частиц. Предпочтительно полинуклеотид представляет собой ДНК.

В одном варианте осуществления заявки первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ

ID NO: 4, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления заявки первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Примеры молекул нуклеиновых кислот неприродного происхождения, кодирующих укороченный коровый антиген HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3.

В другом варианте осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит кодирующую последовательность для сигнальной последовательности, которая функционально связана с N-концом последовательности корового антигена HBV. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления заявки вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих роI-антиген HBV, содержащих аминокислотную последовательность, по меньшей мере на

90% идентичную SEQ ID NO: 7, включают, но не ограничиваются этим, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Примеры молекул нуклеиновых кислот неприродного происхождения, кодирующих pol-антиген HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6.

В другом варианте осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, которая функционально связана с N-концом последовательности антигена pol HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

В другом варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок антигена HBV, содержащий укороченный коровый антиген HBV, функционально связанный с pol-антигеном HBV, или pol-антиген HBV, функционально связанный с укороченным коровым антигеном HBV. В конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения согласно заявке кодирует укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; линкер; и антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, линкер, содержащий $(AlaGly)_n$, где n равно целому числу от 2 до 5; и pol-антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения кодирует слитый белок антигена HBV, содержащий аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 16.

Примеры полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих слитый белок антигена HBV, включают, но не ограничиваются ими, полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с последовательностью, кодирующей линкер, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 11, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 11, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления заявки молекула нуклеиновой кислоты не природного происхождения, кодирующая слитый белок антигена HBV, содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты не природного происхождения, кодирующая слитый HBV, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, которая функционально связана с N-концом слитой последовательности HBV, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 16. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15. Более предпочтительно кодирующая последовательность для сигнальной последовательности содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14. В одном варианте осуществления кодируемый слитый белок с сигнальной последовательностью содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Заявка также относится к вектору, содержащему первую и/или вторую молекулы нуклеиновой кислоты не природного происхождения. Используемый в настоящем описании термин «вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую для переноса генетического материала в другую клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы (бактериофаги,

вирусы животных и вирусы растений), космиды и искусственные хромосомы (например, YAC). Предпочтительно вектор представляет собой ДНК-плазмиду. Вектор может быть ДНК-вектором или РНК-вектором. Специалист в данной области может сконструировать вектор согласно заявке с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК с учетом настоящего описания.

Вектор согласно заявке может быть экспрессирующим вектором. Используемый в настоящем описании термин «экспрессирующий вектор» относится к любому типу генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную к транскрипции. Экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, векторы для экспрессии рекомбинантного белка, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор, и векторы для доставки нуклеиновой кислоты пациенту для экспрессии в ткани пациента, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор. Специалисту в данной области следует понимать, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т. п.

Векторы согласно заявке могут содержать различные регуляторные последовательности. Используемый в настоящем описании термин «регуляторная последовательность» относится к любой последовательности, которая обеспечивает, способствует или модулирует функциональную регуляцию молекулы нуклеиновой кислоты, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одного из ее производных (т. е. мРНК) в клетку-хозяин или организм. В контексте настоящего описания этот термин охватывает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования и элементы, влияющие на стабильность мРНК).

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, ДНК-плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т. д. Примеры невирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, РНК-репликон, мРНК-репликон, модифицированный мРНК-репликон или самоамплифицирующуюся мРНК, замкнутую линейную дезоксирибонуклеиновую кислоту, например линейную ковалентно замкнутую ДНК, такую как линейная ковалентно замкнутая двухцепочечная молекула ДНК. Предпочтительно невирусный вектор представляет собой ДНК-плазмиду. «ДНК-плазида», которая взаимозаменяемо используется с «ДНК-плазмидным вектором», «плазмидной ДНК» или «плазмидным ДНК-вектором», относится к двухцепочечной и обычно кольцевой последовательности ДНК, которая способна к автономной репликации в подходящей клетке-хозяине. ДНК-плазмиды, используемые для экспрессии кодируемого полинуклеотида, обычно содержат последовательность точки начала репликации, сайт множественного клонирования и маркер селекции, который, например, может представлять собой ген устойчивости к антибиотикам. Примеры подходящих ДНК-

плазмид, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, имеющиеся в продаже экспрессирующие векторы для использования в хорошо известных системах экспрессии (включая как прокариотические, так и эукариотические системы), такие как pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), который можно использовать для продукции и/или экспрессии белка в *Escherichia coli*; pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), который можно использовать для продукции и/или экспрессии в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; Полная бакуловирусная экспрессирующая система MAXBAC® (Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для продукции и/или экспрессии в клетках насекомых; pcDNATM или pcDNA3TM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для конститутивной экспрессии белка на высоком уровне в клетках млекопитающих; и pVAX или pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для кратковременной экспрессии интересующего белка на высоком уровне в большинстве клеток млекопитающих. Остов любой имеющейся в продаже ДНК-плазмиды можно модифицировать для оптимизации экспрессии белка в клетке-хозяине, например, для изменения ориентации определенных элементов (например, точки начала репликации и/или кассеты устойчивости к антибиотикам), замены промотора, эндогенного для плазмиды (например, промотор в кассете устойчивости к антибиотикам) и/или замены полинуклеотидной последовательности, кодирующей транскрибируемые белки (например, кодирующей последовательности гена устойчивости к антибиотикам), с использованием обычных методов и легкодоступных исходных материалов. (См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)).

Предпочтительно ДНК-плазида представляет собой экспрессирующий вектор, подходящий для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Экспрессирующие векторы, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, но не ограничиваются ими, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 и т. д. Предпочтительно экспрессирующий вектор основан на pVAX-1, который может быть дополнительно модифицирован для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. pVAX-1 является широко используемой плазмидой в ДНК-вакцинах и содержит сильный немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV-IE), за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), полученная из бычьего гормона роста (bGH). pVAX-1 дополнительно содержит последовательность начала репликации pUC и ген устойчивости к канамицину, управляемый небольшим прокариотическим промотором, который обеспечивает размножение бактериальной плазмиды.

Вектор согласно заявке также может быть вирусным вектором. Как правило, вирусные векторы представляют собой генетически сконструированные вирусы, несущие модифицированную вирусную ДНК или РНК, которые были обезврежены, но все еще содержат вирусные промоторы и трансгены, что позволяет осуществлять трансляцию трансгена через вирусный промотор. Поскольку в вирусных векторах часто отсутствуют

инфекционные последовательности, им требуются вспомогательные вирусы или упаковочные линии для крупномасштабной трансфекции. Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, векторы на основе вируса оспы, векторы на основе кишечного вируса, векторы на основе вируса венесуэльского лошадиного энцефалита, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. д. Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, аренавирусные вирусные векторы, репликационно-дефицитные аренавирусные вирусные векторы или репликационно-компетентные вирусные векторы аренавируса, двухсегментные или трехсегментные аренавирусные векторы, инфекционные аренавирусные вирусные векторы, нуклеиновые кислоты которые содержат геномный сегмент аренавируса, в котором одна открытая рамка считывания геномного сегмента делетирована или функционально инактивирована (и заменена нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген HBV, как описано в настоящем изобретении), аренавирус, такой как вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), например, клон 13 штамм или штамм MP, и аренавирус, такой как вирус Junin, например, штамм Candid #1. Вектор также может быть невирусным вектором.

Предпочтительно вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, например, рекомбинантный аденовирусный вектор. Рекомбинантный аденовирусный вектор может быть получен, например, из аденовируса человека (HAdV или AdHu) или аденовируса обезьян, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV), или аденовируса макака-резуса (rhAd). Предпочтительно аденовирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека, например, рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26 или любой из рекомбинантных аденовирусов человека серотипа 5, 4, 35, 7, 48 и т. д. В других вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор rhAd, например, rhAd51, rhAd52 или rhAd53.

Вектор также может быть вектором линейной ковалентно замкнутой двухцепочечной ДНК. Используемый в настоящем описании термин «линейный ковалентно замкнутый двухцепочечный ДНК-вектор» относится к замкнутой линейной дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), которая структурно отличается от плазмидной ДНК. Он обладает многими преимуществами плазмидной ДНК, а также минимальным размером кассеты, аналогичным стратегиям РНК. Например, это может быть векторная кассета, обычно содержащая кодируемую антигенную последовательность, промотор, последовательность полиаденилирования и теломерные концы. Бесплазмидная конструкция может быть синтезирована с помощью ферментативного процесса без необходимости использования бактериальных последовательностей. Примеры подходящих линейных ковалентно замкнутых ДНК-векторов включают, но не ограничиваются ими, имеющиеся в продаже экспрессирующие векторы, такие как

«замкнутая линейная ДНК Doggybone™» (dbDNA™) (Touchlight Genetics Ltd.; Лондон, Англия). См., например, Scott et al., Hum Vaccin Immunother. 2015 aug; 11(8): 1972-1982, полное содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. Некоторые примеры линейных ковалентно замкнутых двухцепочечных ДНК-векторов, композиций и способов создания и применения таких векторов для доставки молекул ДНК, таких как активные молекулы по настоящему изобретению, описаны в US 2012/0282283, US 2013/0216562 и US 2018/0037943, соответствующее содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Рекомбинантный вектор, пригодный для использования согласно заявке, может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, ввиду вырожденности генетического кода можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один и тот же полипептид. Полинуклеотид, кодирующий антиген HBV согласно заявке, может быть необязательно оптимизирован по кодонам для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине (например, в бактериальных клетках или клетках млекопитающих). Кодон-оптимизация представляет собой технологию, широко применяемую в данной области, и способы получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов будут хорошо известны специалистам в данной области с учетом настоящего описания.

Вектор согласно заявке, например ДНК-плазида, вирусный вектор (в частности, аденовирусный вектор), РНК-вектор (такой как самореплицирующийся РНК-репликон) или вектор линейной ковалентно замкнутой двухцепочечной ДНК, может содержать любые регуляторные элементы для установления обычной(ых) функции(й) вектора, включая, но не ограничиваясь этим, репликацию и экспрессию антигена(ов) HBV, кодируемого полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваются ими, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, элемент связывания рибосомы, терминатор транскрипции, маркеры селекции, начало репликации и т. д. Вектор может содержать одну или более экспрессирующих кассет. «Экспрессирующая кассета» является частью вектора, который управляет клеточным механизмом для производства РНК и белка. Экспрессирующая кассета обычно содержит три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (UTR), необязательно содержащую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ORF) представляет собой рамку считывания, которая содержит кодирующую последовательность интересующего белка (например, антигена HBV) от старт-кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы экспрессирующей кассеты могут быть функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» следует понимать в его самом широком оправданном контексте, и он относится к связи полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Полинуклеотид является «функционально связанным», когда он находится в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом.

Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Любые компоненты, подходящие для использования в описанной в настоящем изобретении экспрессирующей кассете, можно использовать в любой комбинации и в любом порядке для получения векторов согласно заявке.

Вектор может содержать промоторную последовательность, предпочтительно в экспрессирующей кассете, для контроля экспрессии интересующего антигена HBV. Термин «промотор» используется в его обычном смысле и относится к нуклеотидной последовательности, которая инициирует транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор расположен на той же цепи рядом с нуклеотидной последовательностью, которую он транскрибирует. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми или репрессируемыми. Промоторы могут быть природными или синтетическими. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может быть гомологичным промотором (т. е. полученным из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (т. е. полученным из другого вектора или генетического источника). Например, если используемый вектор представляет собой ДНК-плазмиду, промотор может быть эндогенным по отношению к плазмиде (гомологичным) или полученным из других источников (гетерологичным). Предпочтительно промотор расположен в 5'-области полинуклеотида, кодирующего антиген HBV, внутри экспрессирующей кассеты.

Примеры промоторов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как промотор длинного терминального повтора (LTR) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как немедленно-ранний промотор CMV (CMV-IE), промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может представлять собой промотор из гена человека, такого как актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, креатин мышц человека или металлотионеин человека. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как специфический для мышц или кожи промотор, природный или синтетический.

Предпочтительно промотор представляет собой сильный эукариотический промотор, предпочтительно немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV-IE). Нуклеотидная последовательность иллюстративного промотора CMV-IE представлена в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

Вектор может содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые стабилизируют экспрессируемый транскрипт, усиливают ядерный экспорт РНК-транскрипта и/или улучшают транскрипционно-трансляционное сцепление. Примеры

таких последовательностей включают сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования обычно расположен в 3'-области относительно кодирующей последовательности интересующего белка (например, антигена HBV) в экспрессирующей кассете вектора. Энхансерные последовательности представляют собой регуляторные последовательности ДНК, которые при связывании с факторами транскрипции усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Последовательность энхансера предпочтительно расположена в 5'-области относительно последовательности полинуклеотидов, кодирующей антиген HBV, но в 3'-области относительно последовательности промотора внутри экспрессирующей кассеты вектора.

Можно использовать любой сигнал полиаденилирования, известный специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Например, сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобина человека. Предпочтительно сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH) или сигнал полиаденилирования SV40. Нуклеотидная последовательность иллюстративного сигнала полиаденилирования bGH представлена в SEQ ID NO: 20. Нуклеотидная последовательность иллюстративного сигнала полиаденилирования SV40 представлена в SEQ ID NO: 13.

Можно использовать любую энхансерную последовательность, известную специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением. Например, энхансерная последовательность может представлять собой человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или вирусный энхансер, такой как один из CMV, HA, RSV или EBV. Примеры конкретных энхансеров включают, помимо прочего, посттранскрипционный регуляторный элемент HBV сурка (WPRE), последовательность интрона/экзона, полученную из предшественника аполипопротеина A1 человека (ApoA1), нетранслируемый домен R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (HTLV-1), энхансер сплайсинга, синтетический интрон β -глобина кролика или любую их комбинацию. Предпочтительно энхансерная последовательность представляет собой составную последовательность из трех последовательных элементов нетранслируемого домена R-U5 LTR HTLV-1, интрона β -глобина кролика и энхансера сплайсинга, который упоминается в настоящем изобретении как «тройная энхансерная последовательность». Нуклеотидная последовательность иллюстративной тройной энхансерной последовательности представлена в SEQ ID NO: 10. Другой иллюстративной энхансерной последовательностью является фрагмент гена ApoA1, представленный в SEQ ID NO: 12.

Вектор может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида. Предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность сигнального пептида, расположена

в 5'-области относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV. Сигнальные пептиды обычно направляют локализацию белка, облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце антигена HBV при экспрессии из вектора, но отщепляется сигнальной пептидазой, например, при секреции из клетки. Экспрессированный белок, в котором отщепляется сигнальный пептид, часто называют «зрелым белком». Можно использовать любой сигнальный пептид, известный в данной области техники в связи с настоящим изобретением. Например, сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид цистатина S; сигнал секреции иммуноглобулина (Ig), такой как сигнальный пептид SPIgG тяжелой цепи гамма Ig или сигнальный пептид SPIgE тяжелой цепи эписилон Ig.

Предпочтительно последовательность сигнального пептида представляет собой сигнальный пептид цистатина S. Иллюстративные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности сигнального пептида цистатина S представлены в SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно. Иллюстративные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности сигнала секреции иммуноглобулина представлены в SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно.

Вектор, такой как ДНК-плазида, может также включать бактериальную последовательность начала репликации и экспрессирующую кассету устойчивости к антибиотикам для селекции и поддержания плазмиды в бактериальных клетках, например, *E.coli*. Бактериальные последовательности начала репликации и кассеты устойчивости к антибиотикам могут быть расположены в векторе в той же ориентации, что и экспрессирующая кассета, кодирующая антиген HBV, или в противоположной (обратной) ориентации. Последовательность начала репликации (ORI) представляет собой последовательность, с которой инициируется репликация, что позволяет плазмиде воспроизводиться и выживать в клетках. Примеры ORI, пригодных для использования в заявке, включают, но не ограничиваются ими, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K и 15A, предпочтительно pUC. Иллюстративная нуклеотидная последовательность pUC ORI представлена в SEQ ID NO: 21.

Экспрессирующие кассеты для селекции и поддержания в бактериальных клетках обычно включают промоторную последовательность, функционально связанную с геном устойчивости к антибиотикам. Предпочтительно промоторная последовательность, функционально связанная с геном устойчивости к антибиотикам, отличается от промоторной последовательности, функционально связанной с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий белок, например, антиген HBV. Ген устойчивости к антибиотикам может быть оптимизирован по кодонам, а состав последовательности гена устойчивости к антибиотикам обычно адаптирован к использованию кодонов бактериями, например *E. coli*. Можно использовать любой ген устойчивости к антибиотикам, известный специалистам в данной области в связи с

настоящим изобретением, включая, помимо прочего, ген устойчивости к канамицину (Kanr), ген устойчивости к ампициллину (Ampr) и ген устойчивости к тетрациклину (Tetr), а также гены, придающие устойчивость к хлорамфениколу, блеомицину, спектиномицину, карбенициллину и т. д.

Предпочтительно ген устойчивости к антибиотикам в экспрессирующей кассете вектора с антибиотиками представляет собой ген устойчивости к канамицину (Kanr). Последовательность гена Kanr представлена в SEQ ID NO: 22. Предпочтительно ген Kanr оптимизирован по кодонам. Типичная последовательность нуклеиновой кислоты гена Kanr с оптимизированными кодонами представлена в SEQ ID NO: 23. Kanr может быть функционально связан со своим нативным промотором, или ген Kanr может быть связан с гетерологичным промотором. В конкретном варианте осуществления ген Kanr функционально связан с промотором гена устойчивости к ампициллину (Ampr), известным как промотор bla. Иллюстративная нуклеотидная последовательность промотора bla представлена в SEQ ID NO: 24.

В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой ДНК-плазмиду, содержащую экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один из антигенов HBV, выбранных из группы, состоящей из роI-антигенов HBV, содержащих аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичную SEQ ID NO: 7, и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95%, как например на 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; расположенную в 5'-области относительно последовательности, функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 18, энхансерную последовательность, предпочтительно тройную энхансерную последовательность SEQ ID NO: 10, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнальный пептид цистатина S, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 20. Такой вектор дополнительно содержит экспрессирующую кассету устойчивости к антибиотикам, включающую полинуклеотид, кодирующий ген устойчивости к антибиотикам, предпочтительно ген Kanr, более предпочтительно кодон-оптимизированный ген Kanr, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 23, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%,

99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичный SEQ ID NO: 23, предпочтительно на 100% идентичный SEQ ID NO: 23, функционально связанный с промотором Amp^r(bla) SEQ ID NO: 24, 5'-область и функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим ген устойчивости к антибиотикам; и последовательность начала репликации, предпочтительно pUC ori SEQ ID NO: 21. Предпочтительно кассета устойчивости к антибиотикам и последовательность начала репликации присутствуют в плазмиде в обратной ориентации по отношению к экспрессирующей кассете антигена HBV.

В другом конкретном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из антигена pol HBV, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, как например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентичную SEQ ID NO: 7, и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95%, например, на 95%, 96, 97%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI из SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует pol-антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность антигена Pol HBV, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 или 6, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, на 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 5 или 6, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 5 или 6.

В одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, которая по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Еще в одном варианте осуществления заявки вектор, такой как вектор плазмидной ДНК или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует слитый белок, содержащий pol-антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Предпочтительно вектор содержит кодирующую последовательность для слияния, которая содержит кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, более предпочтительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с последовательностью, кодирующей pol-антиген HBV, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, более предпочтительно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Предпочтительно кодирующая последовательность укороченного корового антигена HBV функционально связана с кодирующей последовательностью антигена Pol HBV посредством кодирующей последовательности линкера, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO:11, например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 11, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит кодирующую последовательность слияния, имеющую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, функционально связанную с SEQ ID NO: 11, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Полинуклеотиды и экспрессирующие векторы, кодирующие антигены HBV согласно заявке, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген HBV, может быть введен или «клонирован» в экспрессирующий вектор с использованием стандартных методов молекулярной биологии, например полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т. д., которые хорошо известны специалистам в данной области.

Клетки, полипептиды и антитела

Заявка также относится к клеткам, предпочтительно выделенным клеткам, содержащим любой из полинуклеотидов и векторов, описанных в настоящем изобретении. Клетки можно, например, использовать для продукции рекомбинантного белка или для продукции вирусных частиц.

Таким образом, варианты осуществления заявки также относятся к способу получения антигена HBV согласно заявке. Способ включает трансфекцию клетки-хозяина экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий антиген HBV данного применения, функционально связанный с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV, и, необязательно, очистку или выделение антигена HBV, экспрессируемого в клетке. Антиген HBV можно выделить или собрать из клетки любым способом, известным в данной области, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т. д. Методы, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, хорошо известны специалистам в данной области с учетом настоящего описания. Экспрессированные антигены HBV также можно исследовать без очистки или выделения экспрессированного белка, например, путем анализа супернатанта клеток, трансфицированных экспрессирующим вектором, кодирующим антиген HBV, и выращенных в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV.

Таким образом, изобретение также относится к полипептидам не природного происхождения или рекомбинантным полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 7. Как описано выше и ниже, в заявке также рассматриваются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти последовательности, векторы, содержащие эти последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, содержащие полипептид, полинуклеотид или вектор.

В одном варианте осуществления заявки рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно полипептид не природного происхождения или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Предпочтительно полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит SEQ ID NO: 4.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, как например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Предпочтительно полипептид неприродного происхождения или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 7.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с полипептидом неприродного происхождения согласно заявке. В одном варианте осуществления заявки антитело, специфическое к антигену HBV неприродного происхождения согласно заявке, не связывается специфически с другим антигеном HBV. Например, антитело согласно заявке, которое специфически связывается с pol-антигеном HBV, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, не будет специфически связываться с pol-антигеном HBV, не имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Используемый в настоящем изобретении термин «антитело» имеет широкое значение и включает молекулы иммуноглобулина, включающие поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или полиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, F_v, Fab и F(ab')₂, бифункциональные гибриды (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), одноцепочечные (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); антитела с измененными константными областями (например, Пат. США № 5624821), доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности.

Используемый в настоящем описании термин «антитело, которое «специфически связывается» с антигеном» относится к антителу, которое связывается с антигеном с KD 1×10^{-7} М или меньше. Предпочтительно антитело, которое «специфически связывается» с антигеном, связывается с антигеном с KD 1×10^{-8} М или меньше, более предпочтительно 5×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 5×10^{-10} М или меньше или 1×10^{-10} М или

меньше. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения KD для антител могут быть определены с использованием способов, известных в данной области, с учетом настоящего изобретения. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, например, системы *Biacore®*, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система *Octet RED96*. Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

Антитела к PD-1

Заявка также относится к терапевтическому применению антител к PD-1. Как описано выше, термин «антитела» понимается в широком смысле и он включает молекулы иммуноглобулина, включающие поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или полиспецифические антитела, димерные антитела, тетрамерные антитела, мультимерные антитела, Fv, Fab, F(ab')₂, бифункциональные гибридные антитела, одноцепочечные антитела, антитела с измененными константными областями, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности.

«Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, а также их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоит из доменов CH1, шарнирной области CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

«Области, определяющие комплементарность, (CDR)» представляют собой «антигенсвязывающие сайты» в антителе. CDR могут быть определены с использованием различных терминов: (i) области, определяющие комплементарность (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) основаны на изменчивости последовательности (Wu и Kabat), (1970) *J Exp Med* 132:211-50, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. (ii) «Гипервариабельные области», «HVR» или «HV», три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3) относятся к областям переменных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре, как это определено Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, (1987) *Mol Biol* 196:901-17). База данных International ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www_imgt_org](http://www.imgt.org)) обеспечивает

стандартизированную нумерацию и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между границами CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., (2003) *Dev Comparat Immunol* 27:55-77. Используемый в настоящем описании термин «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включает CDR, определенные любым из методов, описанных выше, Kabat, Chothia или IMGT, если только в описании явно не указано иное.

Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Используемый в настоящем описании термин «фрагменты антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов представляют собой определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL), фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), состоящие либо из одного домена VH, либо из VL. Домены VH и VL могут быть связаны друг с другом с помощью синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одноцепочечных антител, где домены VH/VL могут соединяться внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными конструкциями одноцепочечных антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диантитело; описаны, например, в Международной Международной Патентной Публикации США No. WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047.

Используемый в настоящем описании термин «моноклональное антитело» относится к популяции антител с одним аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела обычно связываются с одним антигенным эпитопом, за исключением того, что полиспецифические моноклональные антитела связываются с двумя или более различными антигенами или эпитопами. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя различными антигенными эпитопами. Моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование в популяции антител. Моноклональные антитела могут быть моноспецифическими или полиспецифическими, или одновалентными, двухвалентными или поливалентными. Полиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело или триспецифическое антитело, включено в термин

моноклональное антитело.

Используемый в настоящем описании термин «гуманизированные антитела» относится к антителам, в которых по меньшей мере одна CDR получена из видов, отличных от человека, а каркасы переменных областей получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Гуманизированные антитела могут включать преднамеренно введенные мутации в каркасные области, так что каркас может не быть точной копией последовательностей экспрессированного человеческого иммуноглобулина или гена зародышевой линии.

Используемый в настоящем описании термин «человеческое антитело» относится к антителу, имеющему переменные области тяжелой и легкой цепи, в котором как каркас, так и все 6 CDR относятся к последовательностям человеческого происхождения. Если человеческое антитело содержит константную область или часть константной области, константная область также происходит из последовательностей человеческого происхождения. Человеческое антитело включает переменные области тяжелой или легкой цепей, которые «происходят из» последовательностей человеческого происхождения, если переменные области антитела получены из системы, которая использует иммуноглобулин зародышевой линии человека или реаранжированные гены иммуноглобулина. Примерами таких систем являются библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, не относящиеся к человеку, такие как мыши или крысы, несущие локусы иммуноглобулина человека. «Человеческое антитело» может содержать различия в аминокислотах по сравнению с генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или реаранжированными генами иммуноглобулина вследствие, например, встречающихся в природе соматических мутаций или преднамеренного введения замен в каркас или антигенсвязывающий сайт, или и то, и другое. Обычно «человеческое антитело» по меньшей мере приблизительно на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулином зародышевой линии человека или реаранжированными генами иммуноглобулинов. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать согласованные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов человеческого иммуноглобулина, представленных на фаге, например, как описано в Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96, и в Международной Патентной Публикации США No. WO2009/085462.

Человеческие антитела, полученные из последовательностей иммуноглобулина человека, могут быть получены с использованием таких систем, как фаговый дисплей, включающий синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к

получению антител, которые не экспрессируются репертуаром антител зародышевой линией человека *in vivo*.

Используемый в настоящем описании термин «эпитоп» относится к части антигена, с которой специфически связывается антитело. Эпитопы обычно состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных групп фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может состоять из непрерывно расположенных и/или из несмежных аминокислот, которые образуют конформационную пространственную единицу. Для несмежного эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена оказываются в непосредственной близости в трехмерном пространстве за счет укладки молекулы белка. «Эпитоп» антитела зависит от методологии, используемой для идентификации эпитопа.

Используемый в настоящем описании термин «полиспецифический» относится к антителу, которое специфически связывается по меньшей мере с двумя различными антигенами или двумя различными эпитопами внутри антигенов, например, с тремя, четырьмя или пятью различными антигенами или эпитопами.

Используемый в настоящем описании термин «биспецифический» относится к антителу, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в одном и том же антигене.

Используемый в настоящем описании термин «PD-1» относится к белку запрограммированной смерти-1, коингибитору Т-клеток, также известному как CD279 или PDCD1. Репрезентативная аминокислотная последовательность полноразмерного PD-1 представлена в GenBank под номером доступа NP 005009.2. Термин «PD-1» включает варианты белка и рекомбинантный PD-1 или его фрагмент. «PD-1» в заявке относится к зрелому PD-1 человека, если прямо не указано иное.

PD-1 представляет собой белковый рецептор из 288 аминокислот, экспрессируемый на активированных Т- и В-клетках, клетках-натуральных киллерах и моноцитах. PD-1 является членом семейства CD28/CTLA-4 (антиген цитотоксических Т-лимфоцитов)/ICOS (индуцируемый костимулятор) Т-клеточных коингибирующих рецепторов (Chen et al. 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242). Белок имеет внеклеточный N-концевой домен, который является IgV-подобным, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) и иммунорецепторный мотив переключения на основе тирозина (ITSM) (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev. Основная функция PD-1 заключается в ослаблении иммунного ответа (Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125). PD-1 имеет два лиганда, PD-лиганд I (PD-L1) и PD-L2. PD-L1 (CD274, B7H 1) широко экспрессируется как в лимфоидных, так и в нелимфоидных тканях, таких как CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, клетки линии макрофагов, периферических тканей, а также опухолевые клетки, инфицированные вирусом клетки и клетки аутоиммунных тканей. PD-L2 (CD273, B7-DC)

имеет более ограниченную экспрессию, чем PD-L1, экспрессируясь на активированных дендритных клетках и макрофагах (Dong et al. 1999, *Nature Med.*). Связывание PD-1 со своими лигандами приводит к снижению пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов, что ставит под угрозу гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Ко-стимулирующие и ко-ингибирующие молекулы Т-клеток (вместе именуемые ко-сигнальными молекулами) играют решающую роль в регуляции активации Т-клеток, их дифференцировки, эффекторной функции и выживания (Chen et al., 2013, *Nature Rev. Immunol.* 13: 227-242). После распознавания родственных комплексов пептид-МНС на антигенпрезентирующих клетках рецептором Т-клеток ко-сигнальные рецепторы колокализуются с рецепторами Т-клеток в иммунных синапсах, где они действуют синергически вместе с передачей сигналов TCR, стимулируя или ингибируя активацию и функцию Т-клеток (Flies et al. 2011, *Yale J. Biol. Med.* 84: 409-421). Окончательный иммунный ответ регулируется балансом костимулирующих и коингибирующих сигналов («иммунные контрольные точки») (Pardoll 2012, *Nature* 12: 252-264). Не желая быть связанными теорией, в настоящее время считается, что PD-1 функционирует как одна из таких «иммунных контрольных точек», опосредуя толерантность к периферическим Т-клеткам и избегая аутоиммунитет. PD-1 связывается с PD-L1 или PD-L2 и ингибирует активацию Т-клеток. Способность PD-1 ингибировать активацию Т-клеток используется хроническими вирусными инфекциями и опухолями для уклонения от иммунного ответа. При хронических вирусных инфекциях PD-1 сильно экспрессируется на вирус-специфических Т-клетках, и эти Т-клетки становятся «истощенными» с потерей эффекторных функций и пролиферативной способности (Freeman 2008, *PNAS* 105: 10275-10276). Система PD-1:PD-L1 также играет важную роль в индуцированном развитии Т-регуляторных (Treg) клеток и в поддержании функции Treg (Francisco et al., 2010, *Immunol. Rev.* 236:219-242).

Используемый в настоящем описании термин «антагонист» относится к молекуле, которая при связывании с клеточным белком подавляет по меньшей мере одну реакцию или активность, индуцируемую природным лигандом белка. Молекула является антагонистом, когда по меньшей мере одна реакция или активность подавлена по меньшей мере приблизительно на 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% больше, чем по меньшей мере одна реакция или активность, подавленная в отсутствие антагониста (например, отрицательный контроль), или когда подавление является статистически значимым по сравнению с подавлением в отсутствие антагониста. Антагонистом может быть антитело, растворимый лиганд, низкомолекулярное соединение, ДНК или РНК, такая как кРНК. Примеры антагонистов представляют собой антагонистические антитела, специфически связывающиеся с PD-1. Типичная реакция или активность, вызванная связыванием PD-1 с его рецептором PD-L1 или PD-L2, может заключаться в снижении пролиферации антиген-специфических клеток CD4⁺ или CD8⁺ или снижении продукции интерферона- γ (IFN- γ) Т-клетками, что приводит к подавлению иммунных ответов. Следовательно, антагонистическое антитело к

PD-1, специфически связывающееся с PD-1, вызывает иммунный ответ путем ингибирования ингибирующего пути.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент обладает одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью из следующих свойств:

а) усиливает активацию антигенспецифических CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток дозозависимым образом, при этом активацию измеряют с помощью анализа на реакцию на антиген цитомегаловируса (анализ CMV), как описано в Примере 1 документа US 20170121409, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме;

б) связывается с PD-1 человека с константой равновесной диссоциации (KD) меньше приблизительно 100 нМ, где KD измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C; в) связывается с PD-1 человека с KD, составляющей меньше приблизительно 1 нМ, где KD измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

д) связывается с PD-1 яванского макака с KD, составляющей меньше приблизительно 100 нМ, где KD измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C, или

е) связывается с PD-1 яванского макака с KD, составляющей меньше приблизительно 1 нМ, где KD измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C.

Аффинность антитела к PD-1 человека или яванского макака можно определить экспериментально с использованием любого подходящего метода. В таких способах можно использовать приборы ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, анализы ИФА или конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело/PD-1 может варьировать при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, KD, Kon, Koff) обычно проводят в стандартных условиях и стандартизированном буфере. Специалистам в данной области техники понятно, что внутренняя ошибка измерения аффинности, например, с использованием Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, SD), как правило, может находиться в диапазоне 5-33% для измерений в типичных пределах детектирования. Поэтому термин «приблизительно» в контексте KD отражает типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное стандартное отклонение для KD 1×10^{-9} М составляет до $+0,33 \times 10^{-9}$ М.

Активацию антигенспецифических CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток можно оценить путем измерения повышенной пролиферации Т-клеток в анализе смешанной лимфоцитарной реакции (MLR), повышенной секреции интерферона- γ (IFN- γ) в анализе MLR, повышенной секреции TNF- α в анализе MLR, повышенной секреции IFN- γ в анализе антигена цитомегаловируса (анализ CMV) или повышенной секреции TNF- α в анализе CMV с использованием известных протоколов и протоколов, описанных в Примере 1 US

20170121409. Антитела согласно заявке усиливают активацию антигенспецифических CD4+ или CD8+ Т-клеток, когда измеренная функциональность Т-клеток увеличивается под действием антител согласно заявке дозозависимым образом.

Антитела к PD-1 и их фрагменты известны в данной области. Например, антитела к PD-1 включают, но не ограничиваются ими, антитела, описанные в US 20170121409, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Примеры антител к PD-1 включают, например, выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 82, 83 и 84 из US 20170121409, соответственно (которые соответствуют SEQ ID NO: 25, 26 и 27 в настоящей заявке), или SEQ ID NO: 82, 83 и 85 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 25, 26 и 28 в настоящей заявке), соответственно.

Примеры антител к PD-1 включают, например, выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 86, 87 и 88 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 29, 30 и 31 в настоящей заявке), соответственно.

SEQ ID NO: 82-88 из US20170121409 представляют семейства последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариантов антагонистических антител с созревшей аффинностью, специфически связывающихся с PD-1, имеющих сходные HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и две аналогичные группы последовательностей HCDR3. Антитела в пределах рода связываются с PD-1 с K_D , составляющей меньше приблизительно 1×10^{-7} М, например меньше приблизительно 1×10^{-8} М, например меньше приблизительно 1×10^{-9} М или, например, меньше чем приблизительно 1×10^{-10} М. Примерами таких антител к PD-1 являются антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител PD1B114, PD1B149, PD1B160, PD1B162, PD1B164, PD1B11, PD1B183, PD1B184, PD1B185, PD1B187, PD1B71, PD1B177, PD1B70, PD1B175, PD1B194, PD1B195, PD1B196, PD1B197, PD1B198, PD1B199, PD1B200, PD1B201 и PD1B244, как описано в US20170121409.

Примеры антител к PD-1 включают, например, антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 41-48 или 63-64 US20170121409, где HCDR1, HCDR2 и HCDR3 определены Chothia, Kabat или IMGT.

Примеры антител к PD-1 включают, например, антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 49-62 или 65 из US 20170121409, где LCDR1, LCDR2 и LCDR

определены Chothia, Kabat или IMGT.

Примеры антител к PD-1 включают, например, антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 SEQ ID NO: 10-12 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 32-34 в настоящей заявке);

HCDR2 SEQ ID NO: 13-15 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 35-37 в настоящей заявке);

HCDR3 SEQ ID NO: 16-19 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 38-41 в настоящей заявке);

LCDR1 SEQ ID NO: 20-25 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 42-47 в настоящей заявке);

LCDR2 SEQ ID NO: 26-30 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 48-52 в настоящей заявке); и

LCDR3 SEQ ID NO: 31-40 из US 20170121409 (которые соответствуют SEQ ID NO: 53-62 в настоящей заявке);

Примеры антител к PD-1 включают, например, антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, HC из SEQ ID NO: 224, HC из SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 228 из US 20170121409.

Примеры антител к PD-1 включают, например, антагонистическое антитело, специфически связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее LC SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 227 или SEQ ID NO: 229 из US 20170121409.

Последовательности VH, VL, HCDR и LCDR иллюстративных антагонистических антител, специфически связывающихся с PD-1, согласно заявке, представлены в Таблице 2 из US 20170121409.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG2.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG2, содержащий замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой изотип IgG4, содержащий замену S228P по сравнению с IgG4 дикого типа.

Варианты антагонистических антител, специфически связывающихся с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты согласно заявке, содержащие аминокислотные последовательности VH, VL или VH и VL, представленные в Таблице 2, Таблице 21 и Таблице 22 документа US 20170121409, находятся в пределах объема заявки. Например, варианты могут содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен в VH и/или VL при условии, что гомологичные антитела сохраняют или имеют улучшенные функциональные свойства по сравнению с родительскими антителами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности может составлять приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VH или VL согласно заявке. Необязательно, любая вариация варианта по сравнению с родительским антителом не находится в пределах CDR варианта.

Также предложены антагонистические антитела, специфически связывающиеся с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие VH, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где одна или более CDR последовательности содержат определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем изобретении (например, антитела, представленные в Таблице 2, Таблице 21 и Таблице 22 в US 20170121409), или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства родительских антагонистических антител специфического связывания с PD-1 согласно заявке.

«Консервативная модификация» относится к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают аминокислотные замены, вставки и делеции. Консервативные замены представляют собой замены, при которых аминокислота заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, хорошо изучены и включают аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидными (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин).

Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде также может быть заменен аланином, как это было описано ранее для аланинсканирующего мутагенеза (MacLennan et al., *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv. Biophys.* 35:1-24, 1998). Аминокислотные замены в антителах согласно заявке могут быть выполнены хорошо известными способами, например, путем ПЦР-мутагенеза (Пат. США № 4683195). Альтернативно, библиотеки вариантов могут быть созданы с использованием известных способов, например, с использованием случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, которые кодируют 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Полученные варианты антител можно тестировать на их характеристики с использованием анализов, описанных в настоящем изобретении.

Способы получения и применения антител и их фрагментов известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящей заявки для получения и применения антител и их фрагментов, которые специфически связываются с PD-1. Методы создания и использования антитела к PD-1, и его фрагменты, известны в искусстве и описаны, например, в US20020110836, US20030044768, US20050180969, US20060110383, US20060210567, US2007/0065427, US200825979, US20080044837, US20090028857, US20090055944, US20090217401, US20100040614, US20100055102, US20100151492, US20100266617, US20110008369, US20110085970, US20110117085, US20110171215, US20110171220, US20110177088, US20110195068, US20110229461, US20110271358, US2012/0237522, US20120039906, US20130017199, US20130022595, US20130095098, US20140234296, US20140044738, US20150079109, US20150203579, US20160075783, US20170210806, US20170247454, US20170121409, WO2017025051 и WO2018039131, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Композиции, терапевтические комбинации и вакцины

Заявка также относится к композициям, терапевтическим комбинациям, более конкретно, наборам и вакцинам, содержащим один или более антигенов HBV, полинуклеотидов и/или векторов, кодирующих один или более антигенов HBV в соответствии с заявкой, и/или одно или более антител к PD1 или их антигенсвязывающих фрагментов. Любой из антигенов HBV, полинуклеотидов (включая РНК и ДНК) и/или векторов согласно заявке, описанных в настоящем изобретении, и любое из антител к PD-1 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, можно использовать в композициях, терапевтических комбинациях или наборах и вакцинах согласно заявке.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) неприродного происхождения, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, или антиген полимеразы HBV, содержащий аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, и/или выделенный полипептид или полипептид неприродного происхождения, кодируемый выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или молекулой нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую pol-антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую pol-антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Кодирующие последовательности для укороченного корового антигена HBV и антигена Pol HBV могут присутствовать в одной и той же выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК) или в двух разных выделенных молекулах нуклеиновой кислоты или молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения (ДНК или РНК).

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор,

предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий pol-антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичная SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий pol-антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7. Вектор, содержащий кодирующую последовательность укороченного корового антигена HBV, и вектор, содержащий кодирующую последовательность антигена Pol HBV, могут быть одним и тем же вектором или двумя разными векторами.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмиду или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, функционально связанный с pol-антигеном HBV, содержащим аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7 или наоборот. Предпочтительно слитый белок дополнительно содержит линкер, который функционально связывает укороченный коровый антиген HBV с pol-антигеном HBV или наоборот. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly) n , где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный укороченный коровый антиген HBV или укороченный коровый антиген HBV неприродного происхождения, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный pol-антиген HBV или pol-антиген HBV неприродного происхождения, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный укороченный коровый антиген HBV или укороченный коровый антиген HBV неприродного происхождения, состоящий из аминокислотной последовательности, по

меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и выделенный pol-антиген HBV или pol-антиген HBV неприродного происхождения, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит выделенный слитый белок или слитый белок неприродного происхождения, содержащий укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14., предпочтительно на 100% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, функционально связанный с pol-антигеном HBV, содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 7 или наоборот. Предпочтительно слитый белок дополнительно содержит линкер, который функционально связывает укороченный коровый антиген HBV с pol-антигеном HBV или наоборот. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly) n , где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном варианте осуществления заявки композиция содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в US 20170121409.

Заявка также относится к терапевтической комбинации или набору, содержащему полинуклеотиды, экспрессирующие укороченный коровый антиген HBV и pol-антиген HBV согласно вариантам осуществления заявки, и/или антитела к PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно вариантам осуществления заявки. Любые полинуклеотиды и/или векторы, кодирующие core- и pol-антигены HBV согласно заявке, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы в терапевтических комбинациях или наборах согласно заявке, и любые антитела к PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно заявке, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы в терапевтических комбинациях или наборах согласно заявке.

В соответствии с вариантами осуществления заявки терапевтическая комбинация или набор для применения в лечении инфекции HBV у пациента, содержит:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 2, и

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген

полимеразы HBV; и

ii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретном варианте осуществления терапевтическая комбинация или набор содержит: i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровий антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 2; ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не имеет активности обратной транскриптазы и активности РНКазы H; и iii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26 и 27 или 28, соответственно, и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно, предпочтительно, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: i) 32, 35, 38, 42, 48 и 53, соответственно; ii) 32, 35, 38, 43, 48 и 54, соответственно; iii) 32, 36, 38, 44, 49 и 55, соответственно; iv) 32, 36, 38, 44, 48 и 56, соответственно; v) 32, 36, 38, 45, 50 и 57, соответственно; vi) 32, 35, 39, 42, 48 и 53, соответственно; vii) 32, 35, 39, 42, 48 и 58, соответственно; viii) 32, 35, 39, 43, 48 и 54, соответственно; ix) 32, 35, 39, 43, 49 и 59, соответственно; x) 32, 35, 39, 45, 48 и 54, соответственно; xi) 32, 36, 39, 45, 50 и 57, соответственно; xii) 32, 36, 39, 44, 48 и 56, соответственно; или xiii) 32, 36, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

Согласно вариантам осуществления заявки полинуклеотиды в вакцинной комбинации или наборе могут быть связаны или разделены, так что антигены HBV, экспрессируемые такими полинуклеотидами, слиты вместе или продуцируются в виде отдельных белков, независимо от того, экспрессируются ли они одним и тем же или разными полинуклеотидами. В одном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в отдельных векторах, например, ДНК-плазидах или вирусных векторах, используемых в комбинации либо в одной и той же, либо в отдельных композициях, так что экспрессируемые белки также являются отдельными белками, но используются в комбинации. В другом варианте осуществления антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться из одного и того же вектора, так что получается слитый антиген соге-pol HBV. Необязательно антигены соге и pol могут быть соединены или слиты друг с другом с помощью короткого линкера. Альтернативно, антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться независимо из одного вектора с использованием сайта проскальзывания рибосомы (также известного как сайт цис-гидролазы) между последовательностями, кодирующими коровий антиген и pol-антиген. Эта стратегия приводит к бидирекционному экспрессирующему вектору, в котором

отдельные коровый и pol-антигены продуцируются из одного транскрипта мРНК. Коровый и pol-антигены, полученные из такого бицистронного экспрессирующего вектора, могут иметь дополнительные N- или C-концевые остатки в зависимости от порядка расположения кодирующих последовательностей в транскрипте мРНК. Примеры сайтов проскальзывания рибосом, которые можно использовать для этой цели, включают, но не ограничиваются ими, сайт проскальзывания FA2 из вируса ящура (FMDV). Другая возможность состоит в том, что антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут экспрессироваться независимо из двух отдельных векторов, один из которых кодирует коровый антиген HBV, а другой кодирует pol-антиген HBV.

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

Согласно предпочтительным вариантам осуществления заявка терапевтическая комбинация или набор содержит первый полинуклеотид, присутствующий в первом векторе, второй полинуклеотид, присутствующий во втором векторе. Первый и второй векторы могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно векторы представляют собой ДНК-плазмиды.

В конкретном варианте осуществления заявки первый вектор представляет собой первую ДНК-плазмиду, второй вектор представляет собой вторую ДНК-плазмиду. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит последовательность начала репликации, предпочтительно pUC ORI с SEQ ID NO: 21, и кассету устойчивости к антибиотикам, предпочтительно содержащую кодон-оптимизированный ген Kanr, имеющий полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 23, предпочтительно под контролем промотора bla, например промотора bla последовательности SEQ ID NO: 24. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид независимо дополнительно содержит по меньшей мере одну из промоторной последовательности, энхансерной последовательности и полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность сигнального пептида, функционально связанную с первой полинуклеотидной последовательностью или второй полинуклеотидной последовательностью. Предпочтительно каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит 5'-последовательность, функционально связанную с первым полинуклеотидом или вторым полинуклеотидом, где 5'-последовательность содержит от 5'-конца к 3'-конца промоторную последовательность SEQ ID NO: 18 или 19, энхансерную последовательность и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 15. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид может также содержать сигнал полиаденилирования, расположенный в 3'-области от кодирующей последовательности антигена HBV, такой как сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 20.

В одном конкретном варианте осуществления заявки первый вектор представляет

собой вирусный вектор, и второй вектор представляет собой вирусный вектор. Предпочтительно каждый из вирусных векторов представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий pol-антиген HBV или укороченный коровый антиген HBV согласно заявке; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI из SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

В другом предпочтительном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в одном векторе, например, ДНК-плазмиде или вирусном векторе. Предпочтительно один вектор представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26, содержащий экспрессирующую кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий pol-антиген HBV, и укороченный коровый антиген HBV согласно заявке, предпочтительно кодирующий pol-антиген HBV и укороченный коровый антиген HBV согласно заявке в качестве слитого белка; 5'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим pol-антиген HBV и укороченный коровый антиген, содержащим от 5'-конца до 3'-конца промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV SEQ ID NO: 19, энхансерную последовательность, предпочтительно AroAI последовательность фрагмента гена SEQ ID NO: 12 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и 3'-последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 13.

Когда терапевтическая комбинация согласно заявке содержит первый вектор, такой как ДНК-плазида или вирусный вектор, и второй вектор, такой как ДНК-плазида или вирусный вектор, количество каждого из первого и второго векторов особо не ограничено. Например, первая ДНК-плазида и вторая ДНК-плазида могут присутствовать в массовом соотношении от 10:1 до 1:10, как например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первая и вторая ДНК-плазмиды присутствуют в массовом соотношении 1:1. Терапевтическая комбинация согласно заявке может дополнительно содержать третий вектор, кодирующий третий активный агент, применимый для лечения инфекции HBV.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке могут содержать дополнительные полинуклеотиды или векторы, кодирующие дополнительные антигены HBV и/или дополнительные антигены HBV или их иммуногенные фрагменты, такие как HBsAg, белок L HBV или оболочечный белок HBV, или кодирующую их полинуклеотидную последовательность или антитела к PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно вариантам осуществления заявки. Однако в конкретных вариантах осуществления композиции и терапевтические комбинации согласно заявке не содержат определенных антигенов.

В конкретном варианте осуществления композиция, терапевтическая комбинация или набор согласно заявке не содержат HBsAg или полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBsAg.

В другом конкретном варианте осуществления композиция, терапевтическая комбинация или набор согласно заявке не содержат белок L HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок L HBV.

Еще в одном конкретном варианте осуществления заявки композиция или терапевтическая комбинация согласно заявке не содержит белок оболочки HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок оболочки HBV.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке также могут включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен и не должен влиять на эффективность активного ингредиента. Фармацевтически приемлемые носители могут включать одно или более вспомогательных веществ, таких как связующие, разрыхлители, агенты, вызывающие набухание, суспендирующие агенты, эмульгаторы, смачивающие агенты, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Фармацевтически приемлемые носители могут включать носители, такие как липидные наночастицы (LNP). Точная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутрислизистого (например, кишечника), интраназального или внутрибрюшинного путей. Для жидких препаратов для инъекций, например суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т. п. Для твердых пероральных препаратов, например, порошков, капсул, каплет, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, смазывающие вещества, связующие, разрыхляющие агенты и т. п. Для назальных спреев/смесей для ингаляций водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие средства, стабилизаторы, смачивающие вещества, консерванты, ароматические вещества, ароматизаторы и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

Композиции и терапевтические комбинации для применения могут быть приготовлены из любого вещества, пригодного для введения пациенту для облегчения введения и повышения эффективности, включая, но не ограничиваясь этим, пероральное

(энтеральное) введение и парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутривожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции для применения также могут быть приготовлены для других путей введения, включая чресслизистый, глазной, ректальный, имплантацию длительного действия, подъязычное введение, под язык, через слизистую ротовой полости в обход порталного кровообращения, ингаляционное или интраназальное.

В предпочтительном варианте осуществления заявки композиции и терапевтические комбинации заявки приготовлены для парентеральной инъекции, предпочтительно подкожной, внутривожной инъекции или внутримышечной инъекции, более предпочтительно внутримышечной инъекции.

Согласно вариантам осуществления заявки композиции и терапевтические комбинации для введения обычно содержат буферный раствор в фармацевтически приемлемом носителе, например, водном носителе, таком как буферный солевой раствор и т. п., например, фосфатно-солевой буфер (PBS). Композиции и терапевтические комбинации могут также содержать фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты. Например, композиция или терапевтическая комбинация для применения, включающая плазмидную ДНК, может содержать фосфатно-солевой буфер (PBS) в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Плазмидная ДНК может присутствовать в концентрации, например, от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, такой как 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, или 5 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке могут быть приготовлены в виде вакцины (также называемой «иммуногенной композицией») в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунных ответов. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе могут быть определены способами, хорошо известными специалистам в данной области, в связи с настоящим изобретением.

В конкретном варианте осуществления заявки композиция или терапевтическая комбинация представляет собой ДНК-вакцину. ДНК-вакцины обычно содержат бактериальные плазмиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий интересующий антиген, под контролем сильного эукариотического промотора. Как только плазмиды доставляются в цитоплазму клетки-хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно. Полученный антиген обычно индуцирует как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ. ДНК-вакцины выгодны, по меньшей мере, потому, что они обеспечивают повышенную безопасность, температурно стабильны, могут быть легко адаптированы для экспрессии антигенных вариантов и просты в производстве. Для приготовления такой ДНК-вакцины можно использовать любую из ДНК-плазмид согласно заявке.

В других конкретных вариантах осуществления заявки композиция или

терапевтическая комбинация представляет собой РНК-вакцину. РНК-вакцины обычно содержат по меньшей мере одну молекулу одноцепочечной РНК, кодирующую интересующий антиген, например, слитый белок или антиген HBV в соответствии с заявкой. Как только РНК доставляется в цитоплазму клетки-хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно, вызывая как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ, подобно ДНК-вакцине. Последовательность РНК может быть оптимизирована по кодонам для повышения эффективности трансляции. Молекула РНК может быть модифицирована любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего изобретения для повышения стабильности и/или трансляции, например, путем добавления полиА-хвоста, например, по меньшей мере из 30 остатков аденозина; и/или путем экспирования 5'-конца модифицированным рибонуклеотидом, например, 7-метилгуанозиновым кэпом, который может быть включен во время синтеза РНК или сконструирован ферментативно после транскрипции РНК. РНК-вакцина также может представлять собой самореплицирующуюся РНК-вакцину, полученную из экспрессирующего вектора альфавируса. Самореплицирующиеся РНК-вакцины содержат молекулу репликазы РНК, полученную из вируса, принадлежащего к семейству альфавирусов, с субгеномным промотором, который контролирует репликацию слитого белка или РНК антигена HBV, за которым следует искусственный поли-А-хвост, расположенный в 3'-области репликазы.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный адъювант может быть включен в композицию или терапевтическую комбинацию согласно заявке или может вводиться совместно с композицией или терапевтической комбинацией согласно заявке. Использование другого адъюванта является необязательным и может дополнительно усилить иммунный ответ, когда композицию используют для целей вакцинации. Другие адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композиции в соответствии с заявкой, предпочтительно должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для человека. Адъювант может представлять собой низкомолекулярное соединение или антитело, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, антитело к PD1, антитело к TIM-3 и т. д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L и IL-7-huFc. Например, адъюванты могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторы ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторы; модуляторы toll-подобного рецептора 7; модуляторы toll-подобного рецептора 8; модуляторы toll-подобного рецептора 3; лиганды рецептора интерферона альфа; ингибиторы гиалуронидазы; Модуляторы IL-10; ингибиторы HBsAg; Модуляторы toll-подобного рецептора 9; ингибиторы циклофилина; Вакцины для профилактики гепатита В; HBV терапевтические вакцины; ингибиторы проникновения вируса HBV; Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловые

олигонуклеотиды против HBV; короткие интерферирующие РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторы эндонуклеазы; Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторы антигена Е вируса гепатита В; антитела HBV, нацеленные на поверхностные антигены вируса гепатита В; антитела к HBV; антагонисты хемокинов CCR2; агонисты тимозина; цитокины, такие как IL12; Модуляторы сборки капсида, ингибиторы нуклеопротеинов (ингибиторы корового или капсидного белка HBV); полимеры нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторы индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторы NOD2; Рекомбинантный тимозин альфа-1; Ингибиторы репликации вируса гепатита В; ингибиторы PI3K; ингибиторы кзкДНК; ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3, ингибиторы CTLA-4; Агонисты костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27 и CD28; ингибиторы ВТК; Другие лекарственные средства для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5.

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо приготовлена с липидной наночастицей (LNP).

Заявка также относится к способам получения композиций и терапевтических комбинаций согласно заявке. Способ получения композиции или терапевтической комбинации включает смешивание выделенного полинуклеотида, кодирующего антиген, вектора и/или полипептида HBV заявки, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Специалист в данной области должен быть знаком с обычными методами, используемыми для получения таких композиций.

Способы индукции иммунного ответа или лечения инфекции HBV

Заявка также относится к способам индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV) у пациента, включающим введение пациенту иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной композиции согласно заявке. Любая из композиций и терапевтических комбинаций согласно заявке, описанных в настоящем изобретении, может быть использована в способах согласно заявке.

Используемый в настоящем описании термин «инфекция» относится к инвазии хозяина агентом, вызывающим заболевание. Агент, вызывающий заболевание, считается «инфекционным», если он способен внедряться в хозяина и реплицироваться или размножаться внутри хозяина. Примеры инфекционных агентов включают вирусы, например, HBV и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибки, простейшие и т. п. «HBV-инфекция» конкретно относится к инвазии HBV в организм-хозяин, такой как клетки и ткани организма-хозяина.

Фраза «индукция иммунного ответа» при использовании в отношении способов, описанных в настоящем изобретении, охватывает вызов желаемого иммунного ответа или эффекта у пациента, против инфекции, например, инфекции HBV. «Индукция иммунного ответа» также охватывает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения против

патогенного агента, например, HBV. Используемый в настоящем описании термин «терапевтический иммунитет» или «терапевтический иммунный ответ» означает, что вакцинированный пациент способен бороться с инфекцией патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация, например, путем иммунитета против инфекции HBV, полученного путем вакцинации вакциной против HBV. В одном варианте осуществления «индукция иммунного ответа» означает выработку иммунитета у пациента, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как инфекция HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению клеточного иммунитета, например, Т-клеточного ответа, против инфекции HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению гуморального иммунного ответа против инфекции HBV. В некоторых вариантах осуществления термин «индукция иммунного ответа» относится к вызову или усилению клеточного и гуморального иммунного ответа против инфекции HBV.

Используемый в настоящем описании термин «защитный иммунитет» или «защитный иммунный ответ» означает, что вакцинированный пациент способен бороться с инфекцией патогенного агента, против которого была сделана вакцинация. Обычно у пациента с развившимся «защитным иммунным ответом» развиваются только клинические симптомы от легкой до умеренной степени тяжести или вообще отсутствуют симптомы. Обычно пациент, имеющий «защитный иммунный ответ» или «защитный иммунитет» против определенного агента, не умирает в результате инфекции указанным агентом.

Как правило, введение композиций и терапевтических комбинаций заявки будет иметь терапевтическую цель для создания иммунного ответа против HBV после инфекции HBV или развития симптомов, характерных для инфекции HBV, например, для терапевтической вакцинации.

Используемый в настоящем описании термин «иммуногенно эффективное количество» или «иммунологически эффективное количество» означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для индукции желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа у пациента. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для индукции иммунного ответа у пациента. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для выработки иммунитета у пациента, например, для обеспечения терапевтического эффекта против такого заболевания, как инфекция HBV. Иммуногенно эффективное количество может варьировать в зависимости от множества факторов, таких как физическое состояние пациента, возраст, вес, состояние здоровья и т. д.; конкретного применения, например, обеспечения защитного иммунитета или терапевтического иммунитета; и конкретного заболевания, например вирусной инфекции, против которой желателен иммунитет. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области с учетом настоящего изобретения.

В конкретных вариантах осуществления заявки иммуногенно эффективное

количество относится к количеству композиции или терапевтической комбинации, достаточному для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести инфекция HBV или связанных с ней симптомов; (ii) уменьшение продолжительности инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iii) предотвращение прогрессирования инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iv) вызов регрессии инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (v) предотвращение развития или начала инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vi) предотвращение рецидива инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vii) уменьшение частоты госпитализаций пациента с инфекцией HBV; (viii) уменьшение продолжительности госпитализации пациента с инфекцией HBV; (ix) увеличение выживаемости пациента с инфекцией HBV; (x) устранение инфекции HBV у пациента; (xi) ингибирование или снижение репликации HBV у пациента; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Иммуногенно эффективное количество также может быть количеством, достаточным для снижения уровней HBsAg, согласующихся с эволюцией до клинической сероконверсии; для достижения устойчивого клиренса HBsAg, связанного с уменьшением инфицированных гепатоцитов иммунной системой пациента; индукции HBV-антиген-специфических активированных Т-клеточных популяций; и/или достижения стойкого отсутствия HBsAg в течение 12 месяцев. Примеры целевого показателя включают более низкий уровень HBsAg ниже порога в 500 копий международных единиц (МЕ) HBsAg и/или более высокое количество CD8.

В качестве общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании по отношению к плазмидной ДНК может варьировать от приблизительно 0,1 мг/мл до 10 мг/мл всей плазмидной ДНК, например, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл или 10 мг/мл. Предпочтительно иммуногенно эффективное количество плазмидной ДНК составляет меньше 8 мг/мл, более предпочтительно меньше 6 мг/мл, еще более предпочтительно 3-4 мг/мл. Иммуногенно эффективное количество может быть получено из одного вектора или плазмиды или из нескольких векторов или плазмид. В качестве дополнительного общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании в отношении пептида может варьировать от приблизительно 10 мкг до 1 мг на введение, например 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 9000 или 1000 мкг на одно введение. Иммуногенно эффективное количество можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, как например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композициях (например, таблетках, капсулах или инъекциях, или любой композиции, адаптированной для внутрикожной доставки, например, для внутрикожной доставки с использованием пластыря для внутрикожной доставки), где введение нескольких капсул или инъекций в совокупности обеспечивает пациенту иммуногенно эффективное количество. Например, при использовании двух ДНК-плазмид иммуногенно эффективное количество может составлять 3-4 мг/мл, по 1,5-2 мг/мл каждой плазмиды. Также возможно

вводить иммуногенно эффективное количество пациенту, а затем вводить другую дозу иммуногенно эффективного количества тому же пациенту по так называемой схеме первичной бустерной терапии. Эта общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалистам в области вакцин. При необходимости к схеме могут быть добавлены дополнительные бустерные введения.

Терапевтическая комбинация, содержащая две ДНК-плазмиды, например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую коровый антиген HBV, и вторую ДНК-плазмиду, кодирующую рол-антиген HBV, можно вводить пациенту путем смешивания обеих плазмид и доставки смеси в один анатомический участок. В качестве альтернативы можно провести две отдельные иммунизации, каждая из которых доставляет одну экспрессирующую плазмиду. В таких вариантах осуществления, независимо от того, вводят ли обе плазмиды при одной иммунизации в виде смеси при двух отдельных иммунизациях, первую ДНК-плазмиду и вторую ДНК-плазмиду можно вводить в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, например как 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первую и вторую плазмиды ДНК вводят в соотношении 1:1 по массе.

В качестве общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании в отношении антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента может варьировать от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 100 мг/кг, например от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг/кг, или приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг или приблизительно 24 мг/кг, или, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть и выше, например приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Также может быть назначена фиксированная разовая доза, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например, 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Обычно для лечения пациента можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно заявке можно повторять через один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев и более. Возможны повторные курсы лечения, а также постоянное введение. Повторное введение может осуществляться в той же дозе или в другой дозе. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно заявке можно вводить в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно заявке могут быть предоставлены в виде суточной дозы в количестве приблизительно 0,1-100

мг/кг, например 0,5, 0,9, 1, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере, в один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, или альтернативно, по меньшей мере, в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения, или с использованием любой их комбинации, с использованием разовой или разделенной дозы каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или любой их комбинации.

Предпочтительно пациент, подлежащий лечению в соответствии со способами заявки, представляет собой пациента, инфицированного HBV, в частности, пациента, имеющего хроническую инфекцию HBV. Острая HBV-инфекция характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, дополненной последующим широким адаптивным ответом (например, HBV-специфические Т-клетки, нейтрализующие антитела), что обычно приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. Напротив, такие ответы ухудшаются или уменьшаются из-за высокой вирусной и антигенной нагрузки, например, белки оболочки HBV продуцируются в избытке и могут высвобождаться в виде субвирусных частиц в 1000-кратном избытке по сравнению с инфекционным вирусом.

Хроническая HBV-инфекция описывается фазами, характеризующимися вирусной нагрузкой, уровнем ферментов печени (некрвоспалительная активность), HBeAg или HBsAg-нагрузкой или наличием антител к этим антигенам. Уровни кзкДНК остаются относительно постоянными и составляют приблизительно от 10 до 50 копий на клетку, хотя виремия может значительно варьировать. Сохранение видов кзкДНК приводит к хроническому состоянию. Более конкретно, фазы хронической инфекции HBV включают: (i) фазу иммунотолерантности, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальным или минимально повышенным уровнем ферментов печени; (ii) HBeAg-положительную фазу иммунной активации, в которой наблюдаются более низкие или снижающиеся уровни репликации вируса со значительно повышенными ферментами печени; (iii) фазу неактивного носительства HBsAg, которая представляет собой низкорепликативное состояние с низкой вирусной нагрузкой и нормальным уровнем ферментов печени в сыворотке, которое может следовать за сероконверсией HBeAg; и (iv) HBeAg-отрицательную фазу, в которой вирусная репликация происходит периодически (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровней печеночных ферментов, мутации в пре-коровом и/или базальном коровом промоторе являются обычными, так что HBeAg не продуцируется инфицированной клеткой.

Используемый в настоящем описании термин «хроническая инфекция HBV» относится к пациенту, у которого детектируемое присутствие HBV длится более 6 месяцев. Пациент с хронической инфекцией HBV может находиться в любой фазе хронической инфекции HBV. Хроническая инфекция HBV понимается в соответствии с ее обычным значением в данной области. Хроническая инфекция HBV может, например,

характеризоваться персистенцией HBsAg в течение 6 месяцев или более после острой инфекции HBV. Например, хроническая инфекция HBV, упомянутая в настоящем изобретении, соответствует определению, опубликованному Центрами по борьбе и профилактике заболеваний (CDC), согласно которому хроническая инфекция HBV может быть охарактеризована с помощью таких лабораторных критериев, как: (i) отрицательный результат на антитела IgM к коровому антигену гепатита В (IgM анти-HBc) и положительный на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), е-антиген гепатита В (HBeAg) или тест на нуклеиновую кислоту на ДНК вируса гепатита В, или (ii) положительный на HBsAg или тест на нуклеиновую кислоту на ДНК HBV или положительный результат на HBeAg два раза с интервалом не меньше 6 месяцев.

Предпочтительно иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или терапевтической комбинации заявки, достаточному для лечения хронической инфекции HBV.

В некоторых вариантах осуществления пациент с хронической инфекцией HBV проходит курс лечения аналогами нуклеозидов (NUC) и у него подавлены NUC. Используемый в настоящем описании термин «NUC-подавленный» относится к пациенту, имеющему неопределяемый уровень вируса гепатита В и стабильные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примеры лечения аналогами нуклеозидов/нуклеотидов включают ингибиторы полимеразы HBV, такие как энтакавир и тенофовир. Предпочтительно, чтобы у пациента с хронической инфекцией HBV не было прогрессирующего фиброза или цирроза печени. Такой пациент обычно имеет показатель METAVIR меньше 3 для фиброза и результат фибросканирования меньше 9 кПа. Шкала METAVIR представляет собой балльную систему, которая обычно используется для оценки степени воспаления и фиброза путем гистопатологической оценки в биоптатах печени пациентов с гепатитом В. В балльной системе присваиваются два стандартизированных числа: одно отражает степень воспаления, а другое - степень фиброза.

Считается, что элиминация или уменьшение хронического HBV может способствовать раннему выявлению тяжелых заболеваний печени, включая вирус-индуцированный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, способы применения также могут быть использованы в качестве терапии для лечения HBV-индуцированных заболеваний. Примеры заболеваний, вызванных HBV, включают, но не ограничиваются ими, цирроз печени, рак (например, гепатоцеллюлярную карциному) и фиброз, особенно выраженный фиброз, характеризующийся оценкой METAVIR 3 или выше для фиброза. В таких вариантах осуществления иммуногенно эффективное количество представляет собой количество, достаточное для достижения стойкого отсутствия HBsAg в течение 12 месяцев и значительного ослабления клинического заболевания (например, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и т. д.).

Способы в соответствии с вариантами осуществления заявки дополнительно включают введение пациенту другого иммуногенного агента (такого как другой антиген

HBV или другой антиген) или другого анти-HBV агента (такого как нуклеозидный аналог или другой анти-HBV агент) в комбинации с композицией заявки. Например, другой агент против HBV или иммуногенный агент может представлять собой низкомолекулярное соединение или антитело, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, антитело к PD1, антитело к TIM-3 и т. д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL12, IL-7 -hyFc; CAR-T, которые связывают env HBV (клетки S-CAR); модуляторы сборки капсида; ингибиторы кзкДНК, ингибиторы полимеразы HBV (например, энтекавир и тенофовир). Один или другой активный анти-HBV агент может представлять собой, например, низкомолекулярное соединение, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, белок или нуклеиновую кислоту. Тот или иной анти-HBV-агент может быть, например, выбран из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторов; модуляторов Toll-подобного рецептора 7; модуляторов Toll-подобного рецептора 8; модуляторов Toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора интерферона альфа; ингибиторов гиалуронидазы; Модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; Модуляторов Toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; Вакцин для профилактики гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса HBV; Антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловых олигонуклеотидов против HBV; коротких интерферирующих РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV миРНК; Модуляторов эндонуклеазы; Ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторов антигена Е вируса гепатита В; антител HBV, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; антител к HBV; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; Модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов корового или капсидного белка HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторов NOD2; Рекомбинантного тимозина альфа-1; Ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов Р13К; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; Агонистов костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27, CD28; ингибиторы ВТК; Других лекарственных средств для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5.

Способы доставки

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке можно вводить пациенту любым способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего описания, включая, но не ограничиваясь этим, парентеральное введение (например, внутримышечную, подкожную, внутривенную или внутрикожную инъекцию), пероральное

введение, трансдермальное введение и назальное введение. Предпочтительно композиции и терапевтические комбинации вводят парентерально (например, путем внутримышечной инъекции или внутрикожной инъекции) или чрескожно.

В некоторых вариантах осуществления заявки, в которых композиция или терапевтическая комбинация содержит одну или более ДНК-плазмид, введение может осуществляться путем инъекции через кожу, например, внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции. Внутримышечную инъекцию можно сочетать с электропорацией, т. е. применением электрического поля для облегчения доставки ДНК-плазмид в клетки. Используемый в настоящем описании термин «электропорация» относится к использованию импульса трансмембранного электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране. Во время электропорации *in vivo* к клеткам прикладывают электрические поля соответствующей величины и продолжительности, вызывая временное состояние повышенной проницаемости клеточной мембраны, что позволяет клеткам поглощать молекулы, неспособные самостоятельно пересекать клеточные мембраны. Создание таких пор с помощью электропорации облегчает прохождение биомолекул, таких как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства и т. д., с одной стороны клеточной мембраны на другую. Было показано, что электропорация *in vivo* для доставки ДНК-вакцин значительно увеличивает поглощение плазмиды клетками-хозяевами, а также приводит к легкому или умеренному воспалению в участке инъекции. В результате эффективность трансфекции и иммунный ответ значительно улучшаются (например, до 1000 раз и 100 раз, соответственно) при внутрикожной или внутримышечной электропорации по сравнению с обычной инъекцией.

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

Введение композиции, терапевтической комбинации или вакцины для применения посредством электропорации может быть осуществлено с использованием устройств для электропорации, которые могут быть сконфигурированы для доставки в желаемую ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для того, чтобы вызвать образование обратимых пор в клеточных мембранах. Устройство для электропорации может включать в себя компонент для электропорации и узел электрода или узел рукоятки. Компонент электропорации может включать в себя один или более из следующих компонентов устройств электропорации: контроллер, генератор сигналов тока, тестер импеданса, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент отчета о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорация может быть осуществлена с использованием устройства для электропорации *in vivo*. Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиций и терапевтических комбинаций заявки, особенно тех, которые

содержат ДНК-плазмиды, включают CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA), электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.), Систему доставки Tri-Grid™ (Ichor Medical Systems, Inc., Сан-Диего, Калифорния 92121) и системы, описанные в Патенте США № 7664545, Патенте США № 8209006, Патенте США № 9452285, Патенте США № 5273525, Патенте США № 6110161, Патенте США № 6261281, Патенте США № 6958060 и Патенте США № 6939862, Патенте США № 7328064, Патенте США № 6041252, Патенте США № 5873849, Патенте США № 6278895, Патенте США № 6319901, Патенте США № 6912417, Патенте № 8187249, Патенте США № 9364664, Патенте США № 9802035, Патенте США № 6117660 и публикации международной патентной заявки WO 2017172838, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Другие примеры устройств для электропорации *in vivo* описаны в международной патентной заявке, озаглавленной «Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В (HBV)», поданной в тот же день, что и настоящая заявка, с регистрационным номером поверенного № 688097-405WO, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Также для доставки композиций и терапевтических комбинаций в заявке предусмотрено использование импульсного электрического поля, например, как описано, в Патенте США № 6697669, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В других вариантах осуществления заявки, в которых композиция или терапевтическая комбинация содержит одну или более ДНК-плазмид, способ введения является чрескожным. Чрескожное введение можно сочетать с эпидермальной кожной абразией для облегчения доставки ДНК-плазмид в клетки. Например, дерматологический пластырь можно использовать для эпидермальной кожной абразии. После удаления дерматологического пластыря композиция или терапевтическая комбинация могут быть нанесены на поврежденную кожу.

Способы доставки не ограничиваются вышеописанными вариантами осуществления, и можно использовать любые средства для внутриклеточной доставки. Другие способы внутриклеточной доставки, предусмотренные способами заявки, включают, но не ограничиваются ими, инкапсуляцию в липосомы, липидные наночастицы (LNP) и т. д.

В некоторых вариантах применения способ введения представляет собой липидную композицию, такую как липидная наночастица (LNP). Липидные композиции, предпочтительно липидные наночастицы, которые можно использовать для доставки терапевтического продукта (такого как одна или более молекул нуклеиновой кислоты по изобретению), включают, но не ограничиваются ими, липосомы или липидные везикулы, где водный объем инкапсулирован амфипатическими липидными бислоями, или где липиды покрывают внутреннюю часть, которая содержит терапевтический продукт; или липидные агрегаты или мицеллы, где инкапсулированный в липид терапевтический продукт содержится в относительно неупорядоченной липидной смеси.

В конкретных вариантах осуществления LNP содержат катионный липид для

инкапсуляции и/или усиления доставки молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК или РНК по изобретению, в клетку-мишень. Катионным липидом может быть любой вид липида, который несет суммарный положительный заряд при выбранном значении рН, таком как физиологическое рН. Липидные наночастицы могут быть получены включением многокомпонентных смесей липидов в различных соотношениях с использованием одного или более катионных липидов, некатионных липидов и липидов, модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ). В литературе описано несколько катионных липидов, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие катионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP).

Композиции LNP могут включать анионные липиды. Анионные липиды могут представлять собой любые виды липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд при выбранном рН, таком как физиологическое рН. Анионные липиды в сочетании с катионными липидами используются для уменьшения общего поверхностного заряда LNP и для введения рН-зависимого разрушения бислоистой структуры LNP, облегчая высвобождение нуклеотидов. В литературе описано несколько анионных липидов, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие анионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

LNP могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, принимая во внимание настоящее изобретение. Например, LNP можно приготовить с помощью введения или разбавления этанола, гидратации тонкой пленки, замораживания-оттаивания, френч-пресса или мембранной экструзии, диафильтрации, обработки ультразвуком, диализа с детергентом, эфирной инфузии и выпаривания с обращенной фазой.

Некоторые примеры липидов, липидных композиций и способов создания липидных носителей для доставки активных молекул нуклеиновых кислот, таких как соответствующие настоящему изобретению, описаны в: US 2017/0190661, US 2006/0008910, US 2015/0064242, US 2005/0064595, WO/ 2019/036030, US2019/0022247, WO/2019/036028, WO/2019/036008, WO/2019/036000, US2016/0376224, US2017/0119904, WO/2018/200943, WO/2018/1918 и US 2013/0195968, соответствующее содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела к PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно заявке можно вводить пациенту любым подходящим путем, например, парентерально путем внутривенной (i.v.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно. Внутривенную инфузию можно проводить, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов.

Адьюванты

В некоторых вариантах осуществления способ индукции иммунного ответа против HBV дополнительно включает введение адьюванта. Термины «адьювант» и

«иммуностимулятор» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и определяются как одно или более веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант используется для усиления иммунного ответа на антигены HBV и антигенные полипептиды HBV согласно заявке.

В соответствии с вариантами осуществления заявки адъювант может присутствовать в терапевтической комбинации или композиции заявки или вводится в виде отдельной композиции. Адъювантом может быть, например, низкомолекулярное соединение или антитело. Примеры адъювантов, подходящих для использования в заявке, включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы иммунных контрольных точек (например, антитело к PD1, антитело к TIM-3 и т. д.), агонисты Toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или TLR8) агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL12 и IL-7-hyFc. Примеры адъювантов могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторы ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторы; модуляторы toll-подобного рецептора 7; модуляторы toll-подобного рецептора 8; модуляторы toll-подобного рецептора 3; лиганды рецептора интерферона альфа; ингибиторы гиалуронидазы; Модуляторы IL-10; ингибиторы HBsAg; Модуляторы toll-подобного рецептора 9; ингибиторы циклофилина; профилактические вакцины гепатита В; терапевтические вакцины против HBV; ингибиторы проникновения вируса HBV; Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловые олигонуклеотиды против HBV; короткие интерферирующие РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторы эндонуклеазы; Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторы антигена Е вируса гепатита В; антитела HBV, нацеленные на поверхностные антигены вируса гепатита В; антитела к HBV; антагонисты хемокинов CCR2; агонисты тимозина; цитокины, такие как IL12; Модуляторы сборки капсида, ингибиторы нуклеопротеинов (ингибиторы корового или капсидного белка HBV); полимеры нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторы индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторы NOD2; Рекомбинантный тимозин альфа-1; Ингибиторы репликации вируса гепатита В; ингибиторы Р13К; ингибиторы кзкДНК; ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3, ингибиторы CTLA-4; Агонисты костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27 и CD28; ингибиторы ВТК; Другие лекарственные средства для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5.

Композиции и терапевтические комбинации согласно заявке также можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним другим анти-HBV-агентом. Примеры анти-HBV-агентов, подходящих для использования в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, низкомолекулярные соединения, антитела и/или CAR-Т-терапию, которые связывают env HBV (клетки S-CAR), модуляторы сборки капсида, агонисты TLR

(например, агонисты TLR7 и/или TLR8), ингибиторы кзкДНК, ингибиторы полимеразы HBV (например, энтекавир и тенофовир) и/или ингибиторы иммунных контрольных точек и т. д.

По меньшей мере один анти-HBV-агент может быть, например, выбран из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; Иммуномодуляторов; модуляторов Toll-подобного рецептора 7; модуляторов Toll-подобного рецептора 8; модуляторов Toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора интерферона альфа; ингибиторов гиалуронидазы; Модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; Модуляторов Toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; Вакцин для профилактики гепатита В; терапевтических вакцин против HBV; ингибиторов проникновения вируса HBV; Антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно антисмысловых олигонуклеотидов против HBV; коротких интерферирующих РНК (киРНК), более конкретно анти-HBV киРНК; Модуляторов эндонуклеазы; Ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; Ингибиторов антигена Е вируса гепатита В; антител HBV, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; антител к HBV; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; Модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов корового или капсидного белка HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); Стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; Стимуляторов NOD2; Рекомбинантного тимозина альфа-1; Ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов РЗК; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; Агонистов костимулирующих рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (в частности, Т-клетках), таких как CD27, CD28; ингибиторы ВТК; Других лекарственных средств для лечения HBV; ингибиторы IDO; ингибиторы аргиназы; и ингибиторы KDM5. Такие анти-HBV-агенты можно вводить с композициями и терапевтическими комбинациями одновременно или последовательно.

Методы Прайм/Буст иммунизации

Варианты осуществления заявки также предусматривают введение иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации пациенту и последующее введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации тому же пациенту в так называемой схеме прайм-буст. Таким образом, в одном варианте осуществления композиция или терапевтическая комбинация для применения представляет собой первичную вакцину, используемую для примирования иммунного ответа. В другом варианте осуществления композиция или терапевтическая комбинация согласно заявке представляет собой бустерную вакцину, используемую для стимулирования иммунного ответа. Примирующие и бустерные вакцины согласно заявке можно использовать в способах согласно заявке, описанных в настоящем изобретении. Эта общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалистам в области вакцин. Любая из композиций и терапевтических комбинаций

согласно заявке, описанная в настоящем изобретении, может быть использована в качестве примирующих и/или бустерных вакцин для примирования и/или стимулирования иммунного ответа против HBV.

В некоторых вариантах осуществления заявки композицию или терапевтическую комбинацию согласно заявке можно вводить для первичной иммунизации. Композицию или терапевтическую комбинацию можно вводить повторно для бустерной иммунизации. Дополнительные бустерные введения композиции или комбинации вакцин могут быть необязательно добавлены к схеме по мере необходимости. Адьювант может присутствовать в композиции согласно заявке, используемой для бустерной иммунизации, присутствовать в отдельной композиции для введения вместе с композицией или терапевтической комбинацией согласно заявке для бустерной иммунизации, или может вводиться сам по себе в качестве бустерной иммунизации. В тех вариантах осуществления, в которых в схему включен адьювант, его предпочтительно используют для бустерной иммунизации.

Иллюстративный и не ограничивающий пример схемы первичной иммунизации включает введение разовой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации согласно заявке пациенту для примирования иммунного ответа; и последующее введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или терапевтической комбинации для стимулирования иммунного ответа, при этом бустерная иммунизация сначала проводится приблизительно через две-шесть недель, предпочтительно через четыре недели после первоначального введения первичной иммунизации. Необязательно, приблизительно через 10-14 недель, предпочтительно через 12 недель, после первоначального проведения первичной иммунизации проводят дополнительную бустерную иммунизацию композицией или терапевтической комбинацией, или другим адьювантом.

Наборы

Также изобретение относится к набору, содержащему терапевтическую комбинацию согласно заявке. Набор может содержать первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент в одной или более отдельных композициях, или набор может содержать первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент в одной композиции. Набор может дополнительно содержать один или более адьювантов или иммуностимуляторов и/или анти-HBV-агентов.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против HBV при введении в организм животного или человека можно оценить либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием различных анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание методов, доступных для оценки начала и активации иммунного ответа, см., например, в Coligan et al. (1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть выполнено путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными

эффекторными клетками, в том числе происходящими из CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, количественное определение клеток, продуцирующих IL-10 или IFN гамма, с помощью ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, анализ пролиферации Т-клеток с помощью классического анализа поглощения [3H] тимидина или анализ на основе проточной цитометрии), анализ антиген-специфических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного пациента (например, пептид-специфический лизис в анализе цитотоксичности и т. д.)

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определить по связыванию антител и/или конкуренции при связывании (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbour Press). Например, титры антител, вырабатываемых в ответ на введение композиции, содержащей иммуноген, можно измерить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Иммунный ответ также можно измерить с помощью анализа нейтрализующих антител, где нейтрализация вируса определяется как потеря инфекционности в результате реакции/ингибирования/нейтрализации вируса при использовании специфических антител. Иммунный ответ можно дополнительно измерить с помощью анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изобретение также относится к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой терапевтическую комбинацию для лечения инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащую:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 2,

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV

c) антиген полимеразы HBV, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, как например, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты не природного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 2 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 1, содержащую по меньшей мере один из антигена полимеразы

HBV и укороченного корового антигена HBV.

Вариант осуществления 3 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 2, содержащую антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

Вариант осуществления 4 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 1, содержащую по меньшей мере одну из первой молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV.

Вариант осуществления 5 представляет собой терапевтическую комбинацию для применения в лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента, содержащую

i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2; и

ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н; и

iii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, или SEQ ID NO: 25, 26 и 28, соответственно, и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно.

Вариант осуществления 6 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 4 или 5, где первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV.

Вариант осуществления 6a представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-6, где вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV.

Вариант осуществления 6b представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 6 или 6a, где сигнальная последовательность независимо

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 6с представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 6 или 6а, где сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 7 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-6с, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98%, как например, по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 7а представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 7, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 7b представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7а, где укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100%, идентична SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 7с представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 7b, где укороченный антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 8 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7с, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК.

Вариант осуществления 8а представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8, где молекула ДНК присутствует в ДНК-векторе.

Вариант осуществления 8b представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8а, где ДНК-вектор выбран из группы, состоящей из ДНК-плазмид, бактериальных искусственных хромосом, искусственных хромосом дрожжей и замкнутой линейной дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 8с представляет собой терапевтическую комбинацию варианта 8, где молекула ДНК присутствует в вирусном векторе.

Вариант 8d представляет собой терапевтическую комбинацию варианта 8с, где вирусный вектор выбран из группы, состоящей из бактериофагов, вирусов животных и вирусов растений.

Вариант осуществления 8е представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-7с, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу РНК.

Вариант осуществления 8f представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 8е, где молекула РНК представляет собой репликон РНК, предпочтительно репликон самореплицирующейся РНК, репликон мРНК,

модифицированный репликон мРНК или самоамплифицирующаяся мРНК.

Вариант осуществления 8g представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-8f, где каждая из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения независимо приготовлена с липидной композицией, предпочтительно с липидной наночастицей (LNP).

Вариант осуществления 9 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-8g, содержащую первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 10 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-8g, содержащую первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 11 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-10, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 11a представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 11, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 98%, как например, по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 12 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 11a, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 13 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 4-12, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 13a представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 13, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 98%, как например, по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%,

99,8%, 99,9% или 100%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 14 представляет собой терапевтическую комбинацию варианта осуществления 13а, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 15 представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 38, 42, 48 и 53, соответственно.

Вариант осуществления 15а представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 38, 42, 48 и 54, соответственно.

Вариант осуществления 15b представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 38, 44, 49 и 55, соответственно.

Вариант осуществления 15с представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 38, 44, 48 и 56, соответственно.

Вариант осуществления 15d представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 38, 45, 50 и 57, соответственно.

Вариант осуществления 15е представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 39, 42, 48 и 53, соответственно.

Вариант осуществления 15f представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 39, 42, 48 и 58, соответственно.

Вариант осуществления 15g представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 39, 43, 48 и 54, соответственно.

Вариант осуществления 15h представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 39, 43, 49 и 59, соответственно.

Вариант осуществления 15i представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 35, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

Вариант осуществления 15j представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 39, 45, 50 и 57, соответственно.

Вариант осуществления 15k представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 39, 44, 48 и 56, соответственно.

Вариант осуществления 15l представляет собой терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 32, 36, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

Вариант осуществления 16 представляет собой набор, содержащий терапевтическую комбинацию любого из вариантов осуществления 1-15l и инструкции по применению терапевтической комбинации для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), у пациента, включающий введение пациенту терапевтической комбинации любого из вариантов осуществления 1-15l.

Вариант осуществления 17a представляет собой способ варианта осуществления 17, где лечение индуцирует иммунный ответ против вируса гепатита В у пациента, предпочтительно у пациента с хронической инфекцией HBV.

Вариант осуществления 17b представляет собой способ варианта осуществления 17 или 17a, где пациент имеет хроническую инфекцию HBV.

Вариант осуществления 17c представляет собой способ любого из вариантов осуществления 17-17b, где пациент нуждается в лечении заболевания, вызванного HBV, выбранного из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Вариант осуществления 18 представляет собой способ любого из вариантов осуществления 17-17c, где терапевтическую комбинацию вводят путем инъекции через кожу, например, внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ варианта осуществления 18, где терапевтическая комбинация содержит по меньшей мере одну из первой и второй молекул нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 19а представляет собой способ варианта осуществления 19, где терапевтическая комбинация содержит первую и вторую молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ варианта осуществления 19 или 19а, где молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения вводят пациенту посредством внутримышечной инъекции в комбинации с электропорацией.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ варианта осуществления 19 или 19а, где молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения вводят пациенту с помощью липидной композиции, предпочтительно с помощью липидной наночастицы.

ПРИМЕРЫ

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

Пример 1. Плаزمида, содержащая HBV core, и плазмида, содержащая HBV pol

Схематическое изображение векторов pDK-pol и pDK-core показано на ФИГ.1А и 1В, соответственно. Оптимизированную для антигенов HBV core или pol экспрессирующую кассету, содержащую промотор CMV (SEQ ID NO: 18), энхансер сплайсинга (тройная составная последовательность) (SEQ ID NO: 10), сигнальный пептид-предшественник цистатина S SPCS (NP_0018901.1) (SEQ ID NO: 9) и ген pol (SEQ ID NO: 5) или core (SEQ ID NO: 2) вводили в остов плазмиды pDK с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Плазмиды тестировали *in vitro* на экспрессию core- и pol-антигенов с помощью вестерн-блоттинга с использованием core- и pol-специфических антител, и было показано, что они обеспечивают согласованный профиль экспрессии для клеточных и секретлируемых core- и pol-антигенов (данные не показаны).

Пример 2. Генерация аденовирусных векторов, экспрессирующих слияние укороченного core-антигена HBV с Pol-антигеном HBV

Создание аденовирусного вектора было разработано как слитый белок, экспрессируемый из одной открытой рамки считывания. Дополнительные конфигурации для экспрессии двух белков, например также можно предусмотреть использование двух отдельных экспрессирующих кассет или использование 2А-подобной последовательности для разделения двух последовательностей.

Дизайн экспрессионных кассет для аденовирусных векторов

Экспрессирующие кассеты (схемы на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В) состоят из промотора CMV (SEQ ID NO: 19), интрона (SEQ ID NO: 12) (фрагмент, полученный из гена ApoA1 человека - номер доступа в GenBank X01038), пары оснований 295-523, содержащие

второй интрон AroAI), за которыми следует оптимизированная кодирующая последовательность - либо только core, либо слитый белок core и полимеразы, которому предшествует последовательность, кодирующая сигнал секреции иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 14), а затем следует сигнал полиаденилирования SV40 (SEQ ID NO: 13).

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

Последние два остатка белка Core (VV) и первые два остатка белка Полимеразы (MP) при слиянии приводят к соединительной последовательности (VVMP), которая присутствует на белке дофаминового рецептора человека (изоформа D3), наряду с фланкирующими гомологиями.

Вставка линкера AGAG между последовательностями core и полимеразы устраняет эту гомологию и не дает дальнейших совпадений в Blast человеческого протеома.

Пример 3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцины *in vivo* на мышах

Иммунотерапевтическую ДНК-вакцину, содержащую плазмиды ДНК, кодирующие core-антиген HBV или антиген полимеразы HBV, испытывали на мышах. Цель исследования заключалась в выявлении T-клеточных ответов, индуцированных вакциной, после внутримышечного введения путем электропорации мышам линии BALB/c. Первоначальные исследования иммуногенности были сосредоточены на определении клеточных иммунных ответов, которые могут быть вызваны введенными антигенами HBV.

В частности, протестированные плазмиды включали плазмиду pDK-Pol и плазмиду pDK-Core, как показано на ФИГ. 1A и 1B, соответственно, и как описано выше в Примере 1. Плазмида pDK-Pol кодировала полимеразный антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а плазмида pDK-Core кодировала ядерный антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Сначала тестировали ответы T-клеток, индуцированные каждой плазмидой в отдельности. Вакцину ДНК-плазмиды (пДНК) вводили внутримышечно посредством электропорации мышам Balb/c с использованием коммерчески доступной системы доставки TriGrid™ для внутримышечного введения (TDS-IM), адаптированной для применения в мышинной модели в *cranialis tibialis*. См. публикацию международной патентной заявки WO2017172838 и U.S. Заявку на патент США № 62/607430, озаглавленную «Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines», поданную 19 декабря 2017 г. для дополнительного описания методов и устройств для внутримышечной доставки ДНК мышам путем электропорации, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В частности, чип TDS-IM устройства TDS-IM v1.0, имеющего электродный чип с расстоянием между электродами 2,5 мм и диаметром электрода 0,030 дюйма, вводили чрескожно в выбранную мышцу с проводящей длиной 3,2 мм и эффективной глубиной проникновения 3,2 мм, и большую ось алмазной

конфигурации электродов ориентировали параллельно мышечным волокнам. После введения электрода начинали инъекцию для распределения ДНК (например, 0,020 мл) в мышце. После завершения внутримышечной инъекции локально прикладывали электрическое поле 250 В/см (приложенное напряжение 59,4-65,6 В, ограничения по приложенному току меньше 4 А, 0,16 А/с) на общую продолжительность приблизительно 400 мс с рабочим циклом 10% (т. е. напряжение активно подается в течение приблизительно 40 мс из приблизительно 400 мс продолжительности) с 6 импульсами. После завершения процедуры электропорации матрицу TriGrid™ удаляли, и животных извлекали. Введение высоких доз (20 мкг) мышам BALB/c проводили, как показано в Таблице 1. Шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую core-антиген HBV (pDK-core; группа 1), шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую pol-антиген HBV (pDK-pol; группа 2), а двум мышам вводили пустой вектор в качестве отрицательного контроля. Животных дважды иммунизировали ДНК с интервалом в две недели, а спленциты собирали через неделю после последней иммунизации.

Таблица 1: Экспериментальный план пилотного исследования по иммунизации мышей.

Группа	N	пДНК	Сайт одностороннего введения (альтернативные стороны)	Доза	Объем	Дни введения	Конечная точка (сбор селезенки) День
1	6	Core	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
2	6	Pol	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
3	2	Пустой вектор (отр. контроль)	СТ+ЕР	20 мкг	20 мкл	0, 14	21

СТ, *cranialis tibialis* мышца; ЕР, электропорация.

Антиген-специфические ответы анализировали и количественно определяли с помощью метода иммуноферментного пятна IFN- γ (ELISPOT). В этом анализе выделенные спленциты иммунизированных животных инкубировали в течение ночи с пулами пептидов, покрывающими белок Core, белок Pol или малый пептидный лидер и соединительную последовательность (2 мкг/мл каждого пептида). Эти пулы состояли из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, соответствующими консенсусной последовательности Genotypes BCD вакцинных векторов Core и Pol. Большой белок Pol HBV 94 кДа разделяли посередине на два пула пептидов. Антиген-специфические Т-клетки стимулировали пулами гомологичных пептидов, а IFN- γ -положительные Т-клетки оценивали с использованием анализа ELISPOT. Высвобождение IFN- γ одной антиген-специфической Т-клеткой визуализировали с помощью соответствующих антител и последующего хромогенного детектирования в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC).

Существенный Т-клеточный ответ против HBV Core был достигнут у мышей, иммунизированных плазмидой рDK-Core ДНК-вакцины (Группа 1), достигая 1000 SFC на 10^6 клеток (ФИГ. 3). Ответы Pol Т-клеток на пул пептидов Pol 1 были сильными (~ 1000 SFC на 10^6 клеток). Слабые Pol2-направленные клеточные ответы против Pol2, вероятно, были связаны с ограниченным разнообразием МНС у мышей, феноменом, называемым Т-клеточным иммунодоминированием, определяемым как неодинаковое распознавание различных эпитопов одного антигена. Было проведено подтверждающее исследование, подтверждающее результаты, полученные в этом исследовании (данные не показаны).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что вакцинация ДНК-плазмидной вакциной, кодирующей антигена HBV, вызывает клеточные иммунные ответы против введенных антигенов HBV у мышей. Аналогичные результаты были также получены с приматами, отличными от человека (данные не показаны).

Пример 4. Влияние антитела к PD-1 на иммунный ответ, вызванный вакциной против HBV

Чтобы оценить, влияет ли блокирование PD-1 на индуцированный вакциной против HBV клеточно-опосредованный иммунитет (СМІ) у здоровых мышей, взрослых мышей C57BL/6 вакцинировали с помощью электропорации ДНК в день 0 и день 21, а их селезенку собирали в день 28. Вакцина представляла собой смесь рDF-Core и рDF-Pol vac (те же последовательности, что и у рDK-Core и рDK-Pol, но с другим остовом, кодирующим различную устойчивость к антибиотикам), которые вводили в обе ноги по 10 мкг/каждый/участок. mAb против PD-1 (CD279; InVivomab) или изотипическое mAb (InVivomab) вводили внутрибрюшинной инъекцией (10 мг/кг) во время первой вакцинации, а затем один раз в неделю до 21-го дня (т. е. в дни 0, 7, 14 и 21). Вторую группу мышей обрабатывали mAb против PD-1 или изотипическими mAb в дни 7, 14 и 21. Контрольным мышам вводили изотипическое антитело.

На 28-й день, т. е. через неделю после последней вакцинации, мышей умерщвляли и выделяли их спленциты для измерения иммунных ответов с помощью ELISPOT и внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Вкратце, каждую селезенку удаляли у умерщвленной иммунизированной мыши стерильным образом и помещали в полипропиленовую пробирку с защелкивающейся крышкой на 5 мл, содержащую 2 мл среды R10. Затем селезенку разрушали в чашке Петри диаметром 6 см, процарапывая ее через металлическую сетку. Сетку промывали дополнительными 2 мл среды R10 и собирали образец в пробирку. Дебрис декантировали в течение нескольких минут, а верхнюю фазу быстро переносили в новую пробирку и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре. Осмотический лизис эритроцитов (RBC) выполняли, добавляя 4,5 мл лизирующего буфера (ACK Lysing Buffer) к осадку суспендированных клеток, осторожно перемешивая и оставляя на 10 минут. Добавляли 0,5 мл 10X PBS для нейтрализации лизирующего буфера. После центрифугирования при 1200 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре клетки промывали R10, повторно центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл среды R10. Для оценки жизнеспособности

клеток спленоциты разводили 1:10 в реагенте Guava ViaCount Reagent и подсчитывали, используя сортер Accuri C6 FACS. Жизнеспособность клеток обычно составляла 96-99%. Предоставленные пептидные пулы ресуспендировали в DMSO в концентрации 0,33 мг/мл каждый и состояли из следующего: Core: 35 пептидов, Pol1: 103 пептида и Pol2: 105 пептидов.

Анализ ELISPOT выполняли в соответствии со стандартной практикой с использованием четырех планшетов, в которых для каждого образца 400000 или 200000 спленоцитов помещали в дубликаты и стимулировали DMSO, core или ConA.

Пулы пептидов использовали в конечной концентрации 1 мкг/мл. Анализ выявил низкий фон (стимуляция DMSO) и активацию конканавалином А (ConA). Пятнообразующие клетки (SFC) рассчитывали по следующей формуле: $[(2,5 * \text{среднее}400K) + (5 * \text{среднее}200K)]/2$. Проверка качества и обработка данных показали отсутствие иммунного ответа у всех животных, в том числе вакцинированных pCore в день 0.

Результаты показаны на ФИГ. 4 и указывают на сильный иммунный ответ против антигенов Core и Pol, что согласуется с данными, полученными в предыдущих исследованиях вакцинации. Не измеряли значимого фона (DMSO), тогда как измеряли сильный ответ в отношении пула пептидов Pol2. Более низкий ответ был измерен в отношении пула пептидов Pol1. Интересно, что группа, получившая три инъекции антитела к PD-1, показала значительно более высокий ответ против антигенов Pol ($p=0,04$ и $p=0,015$ для Pol1 и Pol2, соответственно) по сравнению с изотипическим антителом. Кроме того, ответ против Pol в группах, получавших три инъекции антитела к PD-1, также был выше по сравнению с мышами, получавшими четыре инъекции антитела ($p=0,02$ и $p=0,004$ для Pol1 и Pol2, соответственно). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что 3-кратное введение антитела к PD-1 может усилить HBV-специфический иммунный ответ у вакцинированных здоровых мышей.

Чтобы дополнительно охарактеризовать иммунный ответ, спленоциты анализировали с помощью многоцветного ICS на секрецию $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и IL2. Анализ проводили в соответствии со стандартной практикой ICS.

Результаты показаны на ФИГ. 5.

Анализ ICS соответствовал выводам ELISPOT: Core-специфический ответ был в основном $CD4+/IFN\gamma+/TNF\alpha+/IL2+$, тогда как Pol1-специфический был как $CD4+$, так и $CD8+/IFN\gamma+/TNF\alpha+/IL2+$. Напротив, Pol2-специфический СМІ представлял собой $CD8+/IFN\gamma+/TNF\alpha+$. Pol-специфический СМІ, обнаруженный с помощью ICS, был выше у мышей, получавших 3 раза антитело к PD-1, по сравнению с другими группами.

В совокупности эти данные показывают, что вакцина HBV Core/Pol является иммуногенной и что 3 введения антитела к PD-1 могут привести к оптимальным иммунным эффектам.

Пример 5. Влияние антитела к PD-1 на иммунный ответ, вызванный вакциной HBV, у мышей, инфицированных AAV/HBV.

Для дальнейшей оценки того, влияет ли блокирование PD-1 на индуцированный вакциной против HBV клеточный иммунитет (СИ) у мышей, инфицированных AAV/HBV, взрослых мышей C57BL/6 инфицировали AAV/HBV в течение 28 дней. Затем одну группу из 14 животных вакцинировали с использованием электропорации ДНК (2,5 мкг каждой плазмиды) на 28-й и 49-й день, одну группу вакцинировали с использованием электропорации ДНК на 28-й и 49-й день и обрабатывали антителом против PD-1 (10 мг/кг) на 56-й день. Третью группу животных обрабатывали изотипическим антителом после вакцинации. На 63-й день мышей умерщвляли. Выделяли спленоциты, а также внутрипеченочные лимфоциты (IHL) и измеряли пролиферативную способность CD8+ Т-клеток. Как показано на ФИГ. 6, IHL от мышей, обработанных антителом против PD-1, содержали значительно большее количество пролиферативных CD8+ Т-клеток по сравнению с мышами, не получавшими антитело к PD-1, и теми, которых обрабатывали изотипическим антителом. Напротив, спленоциты не проявляли более высокой пролиферативной способности (ФИГ. 7), что отражает тот факт, что пролиферативные CD8+ Т-клетки мигрируют в участки инфекции, в данном случае в печень.

Животные: мышей C57BL/6 инфицировали rAAV8-1.3HBV (Медицинский институт Fiveplus, Китай) через хвостовую вену при MOI 1011. Вакцинацию проводили, когда хронический характер HBV достигал 28 дней после инфекции.

Плазмидная ДНК: ДНК-вакцина представляла собой комбинацию двух отдельных ДНК-плазмид, кодирующих белки Core (pDF-Core) и полимеразы (Pol) (pDF-Pol) HBV, как показано на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В, соответственно. 2,5 мкг каждой плазмиды подвергали электропорации с помощью системы Trigrid i.m.

Антитела: антитело к PD-1 (RMP1-14, Bioxcell), антитело контроля изотипа (Bioxcell). В исследовании использовали 10 мкг/мл антитела, вводимого i.p. (внутрибрюшинно).

План исследования: взрослых мышей C57BL/6 инфицировали AAV/HBV в течение 28 дней. После этого одну группу из 14 животных вакцинировали с использованием электропорации ДНК (2,5 мкг каждой плазмиды) в дни 28 и 49, одну группу вакцинировали электропорацией ДНК в дни 28 и 49 и обрабатывали антителом против PD-1 (10 мг/кг) на 56 день. Третью группу животных обрабатывали изотипическим антителом после вакцинации.

Выделение спленоцитов и IHL: Селезенки выделяли у мышей; разрушение ткани проводили с использованием диссоциатора Gentle MACS Dissociater (Miltenyi Biotec), а клетки подсчитывали и использовали в назначенных анализах. Внутрипеченочные лимфоциты получали путем перфузии печени с помощью PBS, разрушение тканей выполняли с использованием диссоциатора GentleMACS с последующим градиентом Percoll® 33,75% (об./об.)/PBS2% FCS. Центрифугированием при 700xg (12 минут, комнатная температура, максимальное ускорение и торможение при 1) отделяли гепатоциты от лимфоцитов. Три образца тщательно аспирировали и использовали в назначенном анализе.

Имунофенотипирование: Спленоциты и ИЛL высевали по 100000 клеток на лунку. Затем их окрашивали красителем на предмет жизнеспособности. После этого клетки фиксировали и пермеабилizировали для проведения внутриклеточного окрашивания. Клетки окрашивали следующими маркерами: анти-CD3, анти-CD8, анти-CD4 и ki67, который является маркером пролиферативных T-клеток. Через 1 час клетки дважды промывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания и считывали на Facs fortessa.

Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, предназначены только для иллюстративных целей, и что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая комбинация для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащая:

i) по меньшей мере одно из следующего:

a) укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, и

b) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV.

c) антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, и

d) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV; и

ii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

2. Терапевтическая комбинация по п.1, содержащая по меньшей мере один компонент из числа антигена полимеразы HBV и укороченного корового антигена HBV.

3. Терапевтическая комбинация по п.2, содержащая антиген полимеразы HBV и укороченный коровый антиген HBV.

4. Терапевтическая комбинация по п.1, содержащая по меньшей мере одну молекулу из числа первой молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащей вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV.

5. Терапевтическая комбинация для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента, содержащая:

i) первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2; и

ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения, содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, где антиген полимеразы HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H; и

iii) антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, или SEQ ID NO: 25, 26 и 28, соответственно, и

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно.

6. Терапевтическая комбинация по п.4 или 5, где первая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом укороченного корового антигена HBV, и вторая молекула нуклеиновой кислоты неприродного происхождения дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с N-концом антигена полимеразы HBV, предпочтительно сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

7. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-6, где

а) укороченный коровый антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4; и

б) антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

8. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-7, где каждая из первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты неприродного происхождения представляет собой молекулу ДНК, предпочтительно молекула ДНК присутствует в плазмидном или вирусном векторе.

9. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-8, содержащая первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

10. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-8, содержащая первую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения и вторую молекулу нуклеиновой кислоты неприродного происхождения в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты неприродного происхождения.

11. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-10, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

12. Терапевтическая комбинация по п.11, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

13. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 4-12, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или

SEQ ID NO: 6.

14. Терапевтическая комбинация по п.13, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

15. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-14, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO:

- i) 32, 35, 38, 42, 48 и 53, соответственно;
- ii) 32, 35, 38, 43, 48 и 54, соответственно;
- iii) 32, 36, 38, 44, 49 и 55, соответственно;
- iv) 32, 36, 38, 44, 48 и 56, соответственно;
- v) 32, 36, 38, 45, 50 и 57, соответственно;
- vi) 32, 35, 39, 42, 48 и 53, соответственно;
- vii) 32, 35, 39, 42, 48 и 58, соответственно;
- viii) 32, 35, 39, 43, 48 и 54, соответственно;
- ix) 32, 35, 39, 43, 49 и 59, соответственно;
- x) 32, 35, 39, 45, 48 и 54, соответственно;
- xi) 32, 36, 39, 45, 50 и 57, соответственно;
- xii) 32, 36, 39, 44, 48 и 56, соответственно; или
- xiii) 32, 36, 39, 45, 48 и 54, соответственно.

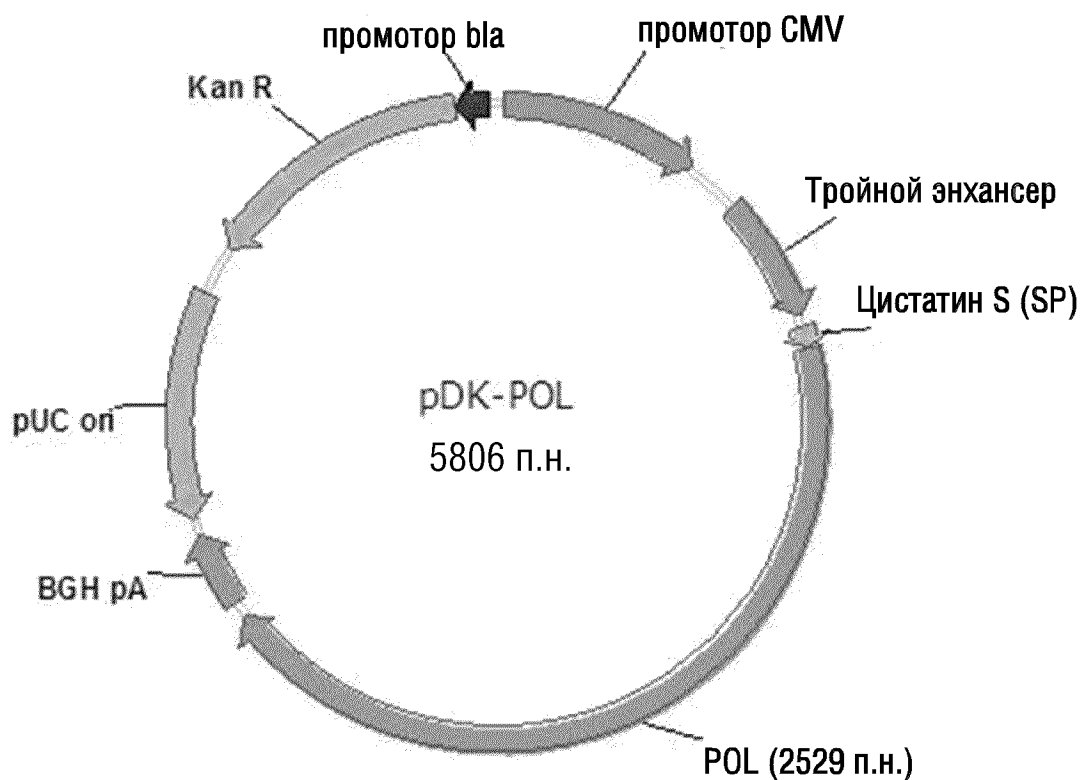
16. Набор, содержащий терапевтическую комбинацию по любому из пп. 1-15 и инструкции по применению терапевтической комбинации в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента.

17. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-15 для применения в лечении инфекции вируса гепатита В (HBV) у пациента.

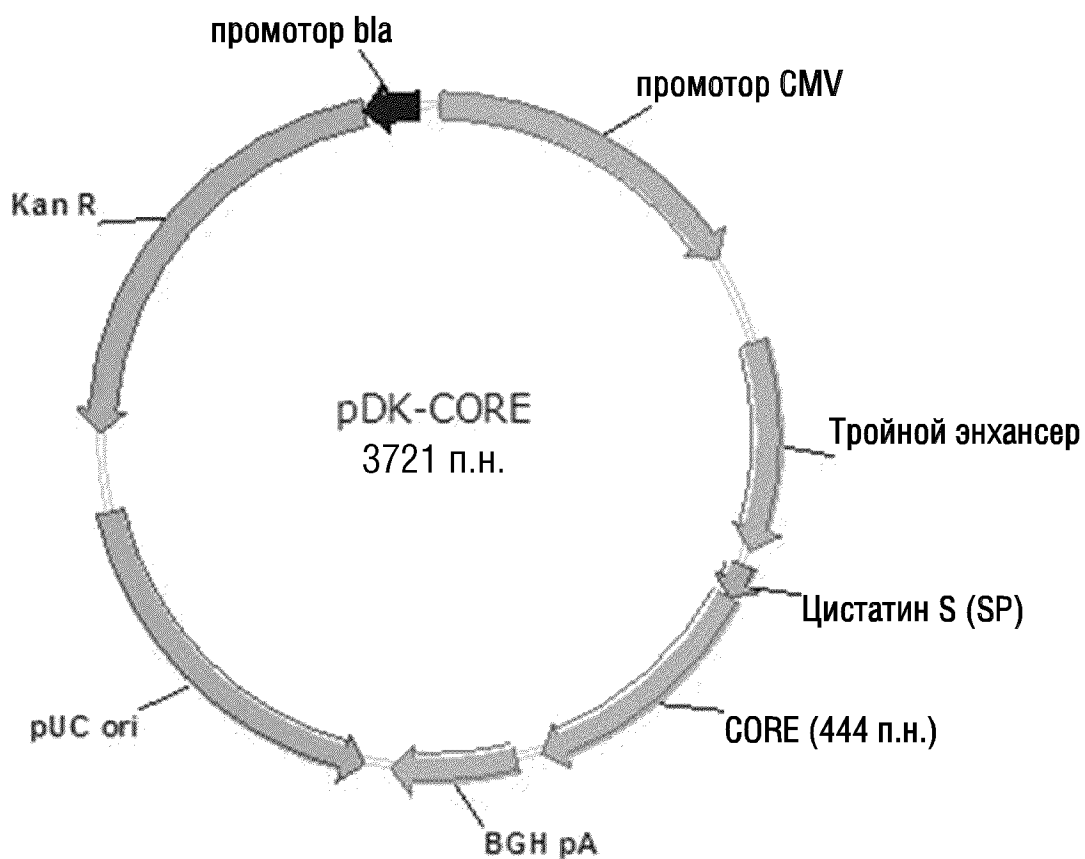
По доверенности

1/7

ФИГ.1А



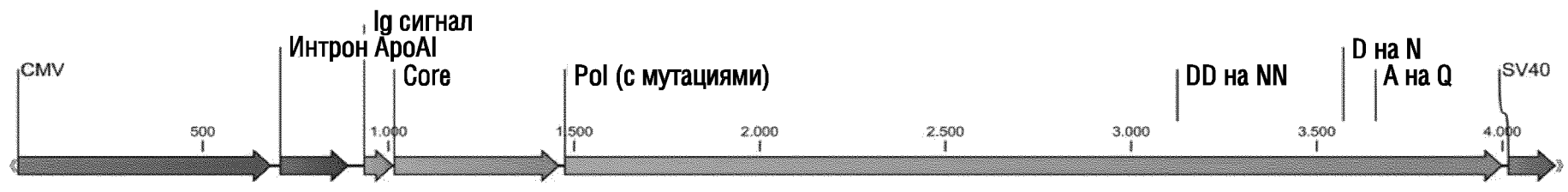
ФИГ.1В



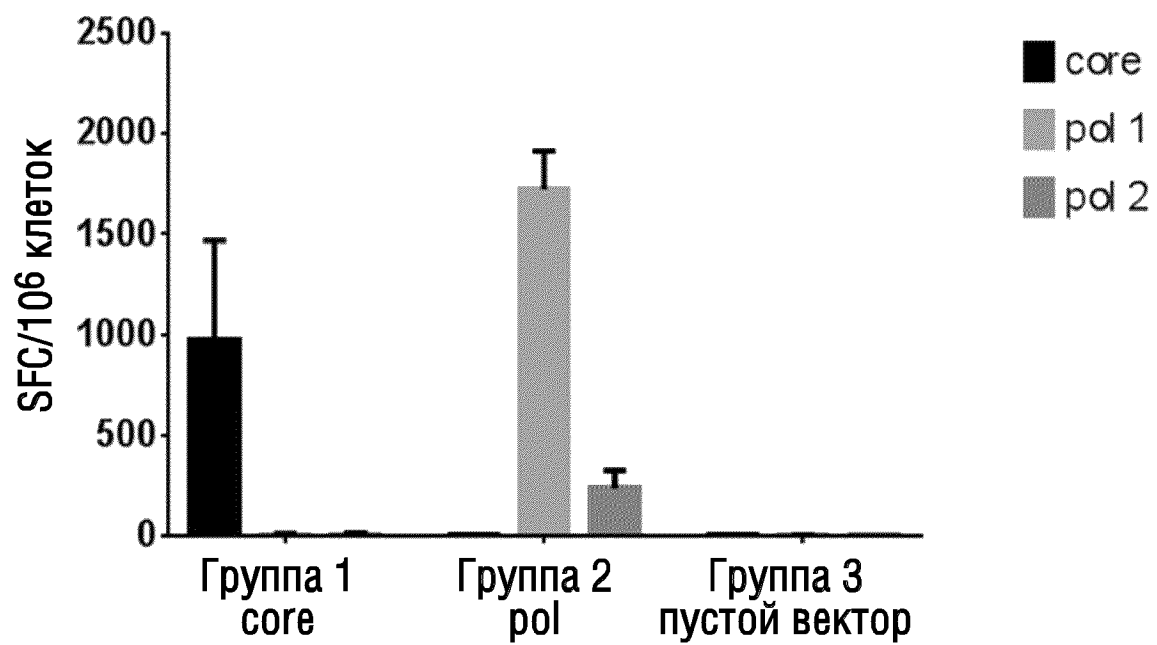
ФИГ.2А



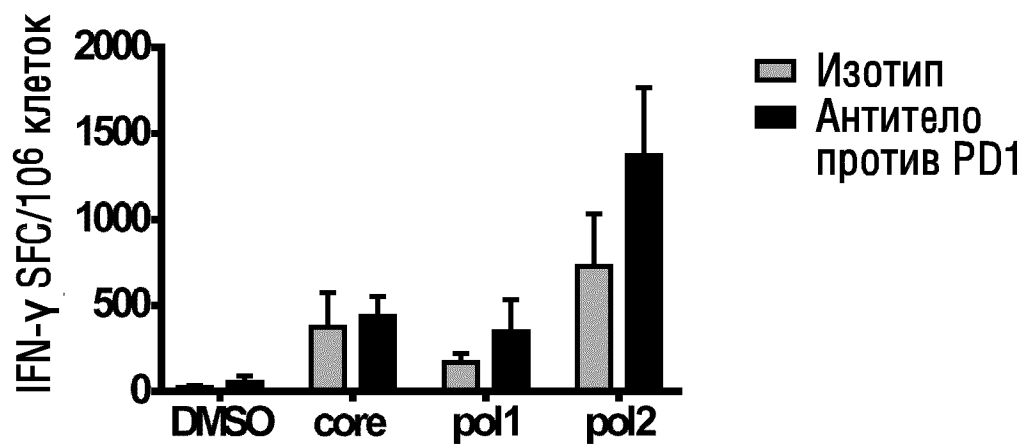
ФИГ.2В



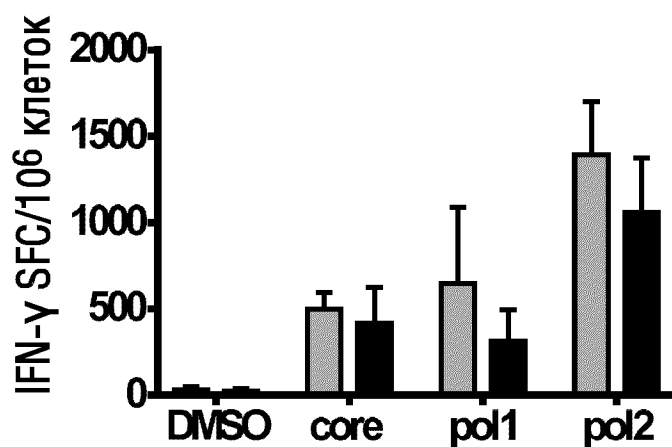
ФИГ.3



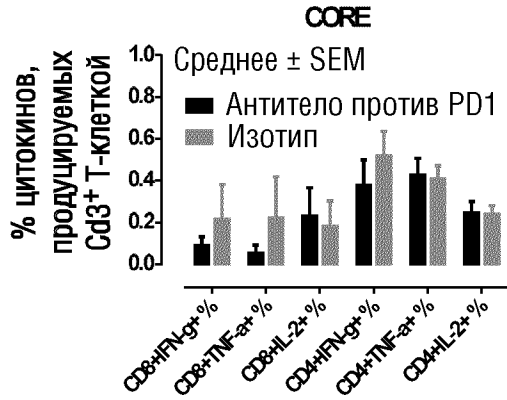
ФИГ.4А



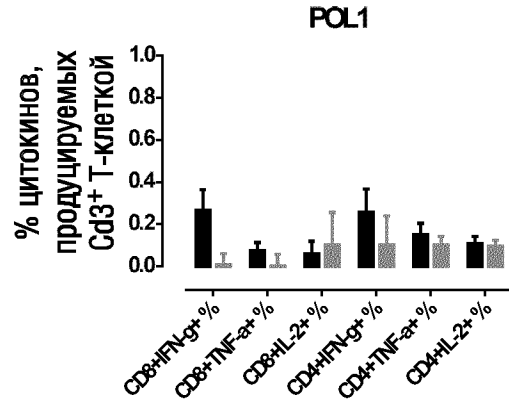
ФИГ.4В



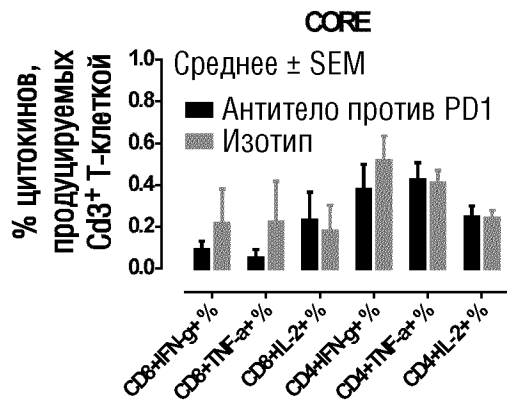
ФИГ.5А



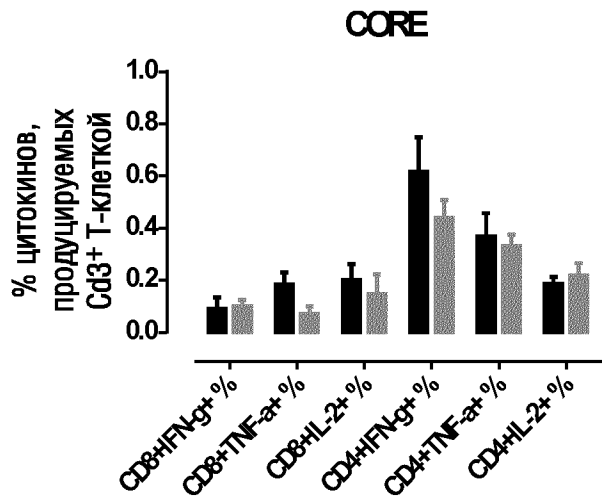
ФИГ.5В



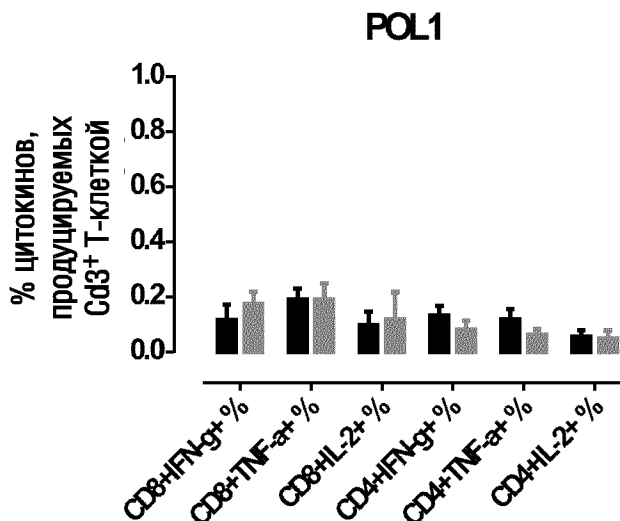
ФИГ.5С



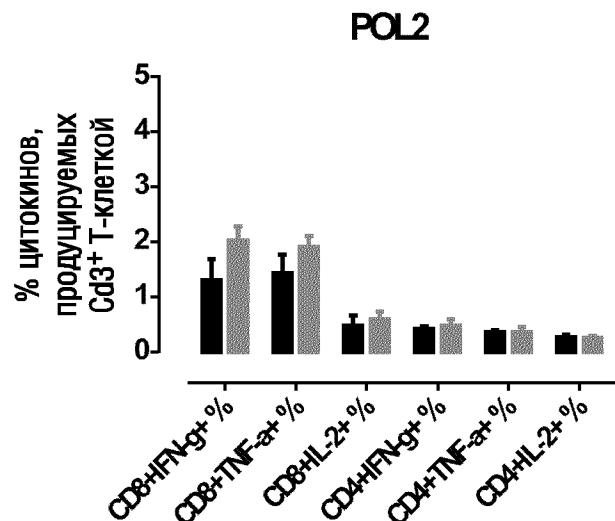
ФИГ.5D



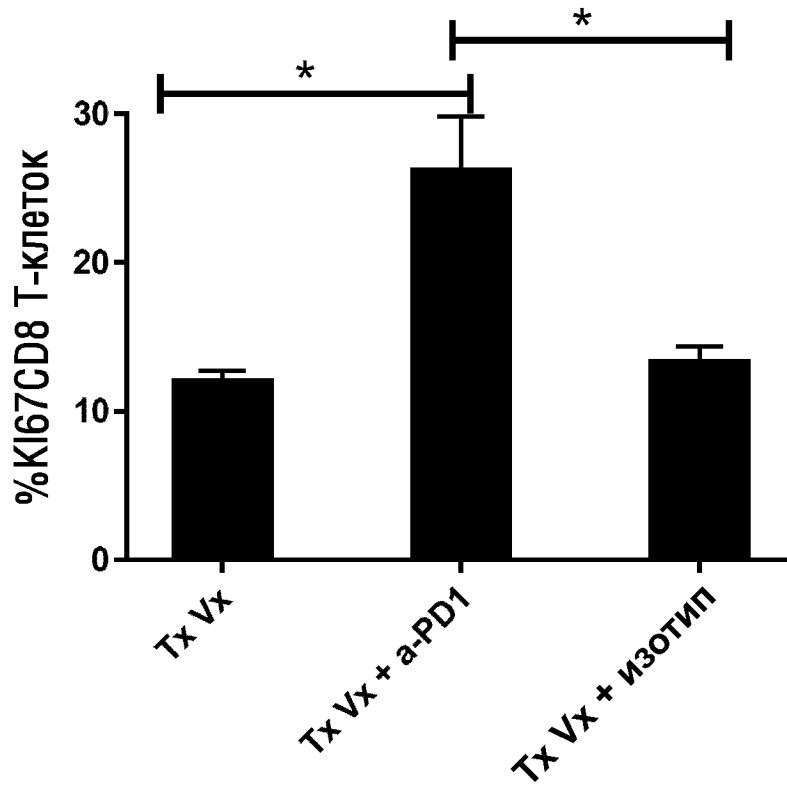
ФИГ.5Е



ФИГ.5F



ФИГ.6



ФИГ.7

