

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290613** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.29

(51) Int. Cl. **C07K 14/02** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

(31) 62/893,546; 62/941,125

(32) 2019.08.29; 2019.11.27

(33) US

(86) PCT/US2020/048411

(87) WO 2021/045969 2021.03.11

(71) Заявитель:
ВИР БИОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.;
ТРИАД НЭШНЛ СЕКЬЮРИТИ, ЛЛС
(US)

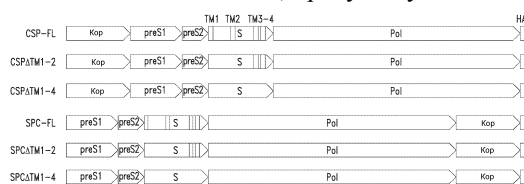
(72) Изобретатель:

Брюнинг Эрик, Дуглас Джанет,
Маршалл Эмили, Юсим Карина,
Корбер Бетт, Тейлер Джеймс (US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенным полинуклеотидам и полипептидам и родственным вакцинам против вируса гепатита В (HBV). Изобретение также относится к вирусным векторам для экспрессии таких полипептидов, которые могут быть использованы в вакцинах против HBV, а также к способам защиты субъекта от инфекции HBV и способам лечения HBV у субъекта, включающим введение полипептидов, векторов или вакцин, описанных в настоящем документе. В настоящем документе также предложены способы разработки и получения вакцины против HBV, включающие разработку антигенов для вакцины для охвата разнообразия в пределах географической области с применением аминокислотной последовательности антигена, которая эффективно охватывает эпитопы в генотипах HBV, присутствующих в географической области.



A1

202290613

202290613

A1

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

ЗАЯВЛЕНИЕ О ЗАИНТЕРЕСОВАННОСТИ ГОСУДАРСТВА

[0001] Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства США в соответствии с Контрактом № 89233218СТА00001, заключенным Министерством
5 энергетики США и компанией TRIAD National Security LLC в отношении работы Лос-Аламосская национальной лаборатории.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Перечень последовательностей, связанных с настоящей заявкой,
представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен в
10 описание посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей: 930185_414WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл 186 KB, создан 21 августа 2020 года и передается в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

15 [0003] Объект настоящего изобретения относится в целом к вирусу гепатита В (HBV) и в частности к вакцинам против HBV.

Описание уровня техники

[0004] Инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV), представляет собой
серьезное бремя для здоровья людей во всем мире. Инфекция HBV приводит к
20 хроническому заболеванию печени у 5-10% инфицированных взрослых людей, и этот показатель меняется на обратный для перинатальной передачи, при которой >90% случаев прогрессируют до хронической формы. Хроническая инфекция гепатита В (CHB) без лечения часто прогрессирует до некротического воспаления и продолжающегося поражения печени, приводящего к циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). По
25 оценкам, CHB повышает риск развития ГЦК в 20 раз и составляет примерно 54% случаев ГЦК. ГЦК является третьей по летальности формой рака, ежегодно диагностируется примерно 800 000 новых случаев. Высокоэффективные (>95%) профилактические вакцины были внедрены в начале 1980-х годов; однако эти вакцины против HBV

неэффективны после развития инфекции. Несмотря на широкое применение профилактических вакцин, во всем мире насчитывается 240-340 миллионов носителей хронического HBV и более 780 000 смертей, связанных с этим заболеванием.

Подавляющее большинство новых случаев инфицирования HBV происходит в регионах с высокой эндемичностью, таких как Китай, Юго-Восточная Азия и страны Африки к югу от Сахары. Инфекция HBV возникает в результате передачи инфекции половым, внутрибольничным или гемоконтактным путем.

[0005] Геном HBV представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК размером 3,2 т.н.(килобаз), которая организована в четыре перекрывающиеся открытые рамки считывания: полимеразу (Р, или Pol), кор (С), поверхностный антиген (HBsAg) (S) и ген, называемый «Х», функция которого не полностью изучена, но который считают участвующим в развитии рака печени. Locarnini *et al. Antivir Ther.* 2010;15 Suppl 3:3-14. И, в отличие от других небольших вирусов хронических заболеваний, таких как ВИЧ или HCV, которые демонстрируют высокую частоту мутаций, дающих начало квазивидам, малый (3,2 т.н.) ДНК- геном HBV более ограничен в своей способности мутировать из-за перекрывающихся открытых рамок считывания (ORF). Несмотря на ограниченное количество мутаций в организме хозяина, в мире существуют различные генотипы HBV, что необходимо учитывать при разработке средств лечения, таких как вакцина.

[0006] Текущим стандартом лечения хронической инфекции HBV является лечение противовирусными препаратами и интерфероном-α.

[0007] На сегодняшний день терапевтические прививки от HBV являются неэффективными. Существует ряд потенциальных причин. Идентификация последовательности HBV, который инфицирует индивидуум, полезна для определения того, какие конкретные вакцины обеспечат эффективное лечение. В базе данных HBV под названием «HBVdb», разработанной как совместный консорциум, который секвенирует и изучает геномы HBV, идентифицированы примерно 5000 полных геномов HBV. См. Hayer *et al. Nucleic Acids Res.*, 41:D566-D570 2013, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Однако из-за общего перекрытия последовательностей и из-за того, что несколько последовательностей были выделены от одного и того же пациента или из очень плотных кластеров, количество действительно уникальных полных геномов HBV, которые идентифицированы в HBVdb, составляет приблизительно 3000. Геномы HBV, идентифицированные в HBVdb, можно разделить на различные генотипы (A, B, C, CB, D, DC, DE, E и F). Распределение

генотипов варьирует среди населения всего мира. Например, примерно 75% последовательностей набора данных, доступных в HBVdb в образцах от индивидуумов из Азии и, в частности, Китая, содержат генотипы В и С. С другой стороны, более половины инфекций HBV в Европе представляют собой инфекции, вызванные генотипами А и D.

5 **[0008]** Хотя лечение противовирусными препаратами и интерфероном-α ингибирует репликацию вируса и стимулирует врожденный иммунитет, они редко полностью устраняют вирус (1-4% в год), и пациентам часто требуется пожизненное лечение. Более того, индивидуальные ответы на эти средства лечения варьируют по мере прогрессирования заболевания, и длительное лечение может привести как к мутациям
10 резистентности, так и к широкому спектру побочных эффектов. Наиболее эффективные средства прямой противовирусной терапии, тенофовир и энтекавир, являются дорогостоящими и применяются только в подгруппе пациентов с использованием экспертных рекомендаций и алгоритмов. Если терапия не работает или не используется, воспаление печени становится хроническим, и цикл повреждения и регенерации может
15 привести к фиброзу, аномальной структуре печени и, возможно, ГЦК. Таким образом, существует острая потребность в эффективной иммунотерапии, которая обеспечивает эффективный иммунный ответ, приводящий к элиминации HBV и окончательному излечению.

[0009] Спонтанный клиренс инфекции происходит у меньшего количества
20 пациентов с хроническим HBV, что подтверждается потерей измеренного поверхностного антигена в крови. Этот показатель составляет всего 1% в год и минимально улучшается при использовании противовирусных препаратов прямого действия. Наиболее эффективный клиренс происходит у лиц с низким количественным уровнем циркулирующих поверхностных антигенов, которые проходят лечение интерферонами 1
25 типа, которые имеют тяжелые побочные эффекты и часто плохо переносятся.

[0010] Терапевтическая вакцинация также была частично неэффективной, поскольку происходило истощение Т-клеток, необходимых для клиренса инфекции, или они становились толерантными и не приводили к эффективному клиренсу HBV в печени. Таким образом, необходимо вызывать образование Т-клеток, которые не индуцируются
30 естественной инфекцией, но которые все же распознают пептидные последовательности, экспонируемые на поверхности инфицированных гепатоцитов.

[0011] Вакцины против CMV(цитомегаловируса)/HBV открывают путь к установлению эффективного ответа, приводящего у устранению HBV и окончательному

излечению. Индукция активных эффекторных CD8⁺ Т-клеточных ответов в печени резидента (ТЕМ) имеет решающее значение для клиренса HBV. Таким образом, индукции устойчивых, эффекторных HBV-специфических CD8⁺ Т-клеток, распознающих новые эпитопы в печени пациентов с СНВ, должно быть достаточно для контроля и в конечном итоге устранения HBV.

[0012] Соответственно, в данной области техники сохраняется потребность в идентификации эффективных вакцинаций для людей, инфицированных различными генотипами HBV. И, из-за неэффективности доступных в настоящее время вакцин против хронических инфекций HBV, в данной области техники существует потребность в разработке вакцины, которая может быть использована для лечения таких инфекций. Также сохраняется потребность в разработке, производстве и тестировании терапевтических вакцин против HBV в препарате для клинического испытания. Композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, удовлетворяют эти потребности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0013] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-11 или SEQ ID NO:14-36. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит две или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:16-36. В некоторых вариантах реализации вышеупомянутые полипептиды или полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, могут быть использованы в вакцине против HBV. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-11 или SEQ ID NO:14-36. В дополнительных вариантах реализации в настоящем описании предложено применение вышеупомянутых полипептидов или иммуногенных композиций, содержащих полипептиды, для выработки иммунного ответа на HBV, или лечения или предотвращения инфекции HBV.

[0014] В некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложен вирусный вектор, содержащий вектор цитомегаловируса (CMV), содержащий полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1-36. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует одну или более аминокислотных

последовательностей, которые содержат одну или более из последовательностей SEQ ID NO:1-11, SEQ ID NO:14-15 и SEQ ID NO:24-26. В некоторых вариантах реализации

последовательности, кодируемые полинуклеотидом, упорядочены для улучшения

экспрессии. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена

5 иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе CMV, который кодирует полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1-36. В

дополнительных вариантах реализации в настоящем изобретении предложено применение вышеупомянутых векторов или иммуногенных композиций, содержащих векторы, для

10 выработки иммунного ответа на HBV, или лечения или предотвращения инфекции HBV.

[0015] Также в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция или вакцина, содержащая один или более эписенсусных антигенов HBV. В некоторых вариантах реализации антигены вакцины предложены в виде полипептидов. В некоторых вариантах реализации антигены кодируются полинуклеотидом. В некоторых вариантах

15 реализации вирусный вектор содержит полинуклеотиды. В некоторых вариантах реализации антигены кодируются двумя или более полинуклеотидами, которые могут экспрессироваться одними и теми же или различными промоторами. В некоторых вариантах реализации указанные антигены кодируются различными вирусными векторами. В некоторых вариантах реализации вакцина против HBV содержит два или

20 более эписенсусных антигенов HBV. В некоторых вариантах реализации вакцина против HBV содержит вектор цитомегаловируса (CMV) и полинуклеотид, кодирующий один или более эписенсусных антигенов HBV.

[0016] В некоторых вариантах реализации вакцина представляет собой профилактическую вакцину. В некоторых вариантах реализации вакцина представляет собой терапевтическую вакцину.

[0017] В некоторых вариантах реализации иммуногенная композиция или вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0018] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композиции, *например*, иммуногенной композиции, содержащей два или более из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов или вакцин.

[0019] Также в настоящем документе предложены способы лечения HBV у субъекта, включающие введение эффективного количества вышеупомянутых

полипептидов, векторов, вакцин или композиций нуждающемуся в этом субъекту. Дополнительно в настоящем документе предложены способы защиты субъекта от инфекции HBV, включающие введение эффективного количества вышеупомянутых полипептидов, векторов, вакцин или композиций нуждающемуся в этом субъекту.

- 5 Дополнительно в настоящем документе предложены способы генерирования иммунного ответа на HBV, включающие введение эффективного количества вышеупомянутых полипептидов, векторов, вакцин или композиций нуждающемуся в этом субъекту.

[0020] Также в настоящем документе предложены некоторые варианты реализации, в которых вышеупомянутые полипептиды, векторы, вакцины или композиции
10 предназначены для применения для лечения HBV, защиты субъекта от инфекции HBV или индукции иммунного ответа на HBV.

[0021] Настоящее изобретение также относится к применению вышеупомянутых полипептидов, векторов, вакцин или композиций для изготовления лекарственного средства для применения при лечении инфекции HBV. Настоящее изобретение также
15 относится к применению вышеупомянутых полипептидов, векторов, вакцин или композиций для изготовления лекарственного средства для применения для защиты субъекта от инфекции HBV. Настоящее изобретение также относится к применению вышеупомянутых полипептидов, векторов, вакцин или композиций для изготовления лекарственного средства для применения для выработки или индукции иммунного ответа
20 на HBV.

[0022] В настоящей заявке предложены полипептиды HBV, содержащие один или более эписенсусных антигенов, которые имеют аминокислотные последовательности, полученные из HBV C, S, P, включая полноразмерные последовательности, их области или любые комбинации.

25 **[0023]** Кроме того, в настоящем документе предложены иммуногенные композиции или вакцины, содержащие один или более фармацевтически приемлемых носителей и один или более эписенсусных антигенов. Также в настоящей заявке предложены иммуногенные композиции или вакцины, содержащие вектор, способный экспрессировать один или более эписенсусных антигенов. В некоторых вариантах
30 реализации эписенсусный антиген HBV содержит две или более эписенсусных последовательностей. В некоторых вариантах реализации вакцины против HBV представляют собой профилактические вакцины. В некоторых вариантах реализации вакцины против HBV представляют собой терапевтические вакцины.

[0024] В настоящем изобретении дополнительно предложены способы предотвращения или лечения инфекции HBV у субъекта, включающие введение эффективного количества вышеупомянутых иммуногенных композиций или вакцин нуждающемуся в этом субъекту. Дополнительно предложены способы разработки и получения иммуногенной композиции или вакцины для субъекта, включающие секвенирование вирусов HBV у субъекта, выбор антигенов для вакцины, разработанных таким образом, чтобы они покрывали разнообразие в пределах вирусов, присутствующих у субъекта, и вставку указанных антигенов для вакцины в вектор. Также в настоящей заявке предложены способы лечения инфекции HBV у субъекта, включающие введение эффективного количества описанных иммуногенных композиций или вакцин нуждающемуся в этом субъекту.

[0025] Также в настоящем изобретении предложен способ стимулирования ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающий: (а) разработку одного или более эписенсусных антигенов; (b) получение иммуногенной композиции или вакцины, содержащей каркас CMV и полинуклеотид, кодирующий один или более эписенсусных антигенов; и (с) введение указанной вакцины нуждающемуся в этом субъекту.

[0026] В некоторых вариантах реализации эписенсусные антигены согласно способам, предложенным в настоящем документе, содержат одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-11 и SEQ ID NO:14-36.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0027] **Фиг. 1.** Организация генома HBV. В отличие от других небольших вирусов хронических заболеваний, таких как ВИЧ или HCV, которые демонстрируют высокую частоту мутаций, приводящих к квазивидам, малый (3,2 т.н.) ДНК-геном HBV более ограничен в своей способности мутировать из-за перекрывающихся открытых рамок считывания (ORF).

[0028] **Фиг. 2А-2В.** Распределение 3041 последовательностей HBV в мире, доступное из HBVdb. Генотипы HBV распространены по всему миру. На карте показаны только последовательности, для которых известна страна отбора проб.

[0029] **Фиг. 3А-3В.** Распределение последовательностей HBV в Азии и Китае, доступных из HBVdb. Приблизительно 75% генотипов в Азии и, в частности, в Китае относятся к генотипам В и С.

[0030] Фиг. 4А-4В. Фиг. 4А: Полный протеомный охват HBV с использованием одной, двух и трех эписенсусных последовательностей. На фиг. 4А показано, что одиночные эписенсусные последовательности обеспечивают различный и ограниченный охват генома HBV (верхняя панель). Охват улучшается за счет использования двух эписенсусных последовательностей (средняя панель) или трех эписенсусных последовательностей (нижняя панель). Фиг. 4В: Три эписенсусные последовательности обеспечивают лучший охват, чем одна или две эписенсусные последовательности, как показано по количеству точных 9-мерных совпадений.

[0031] Фиг. 5А-5С. Полный протеомный охват при использовании одной, двух или трех эписенсусных последовательностей, разработанных с использованием глобальной популяции HBV. Использование двух или трех эписенсусных последовательностей, разработанных с использованием глобальной популяции HBV, значительно улучшает охват всех основных генотипов, обеспечивая сравнимый охват В и С, по сравнению с эписенсусными последовательностями, разработанными с использованием популяций В и С HBV.

[0032] Фиг. 6. Полный протеомный охват HBV с использованием двух эписенсусных последовательностей по отношению к четырем консервативным областям генома HBV. Гипервариабельные области, включая 29 N-концевых аминокислот и N-концевой участок белка Р, проиллюстрированы окнами. Гипервариабельные области удаляют из дальнейшего анализа.

[0033] Фиг. 7А-7В. Охват потенциальных Т-клеточных эпитопов (РТЕ), когда одна (Фиг. 7А) или две (Фиг. 7В) эписенсусные последовательности используются в образцах из Китая, образцах не из Китая и когорте «глобальных» образцов. Ось Х указывает процент охвата. Серые гистограммы указывают на охват потенциальных Т-клеточных эпитопов 1000 произвольно выбранных природных штаммов.

[0034] Фиг. 8. Сравнение охвата для различных эписенсусных последовательностей. Последовательности 2_ChinaGlobal_Epi (2_CHGL_epi) обеспечивают точный полный охват глобальной последовательности образцов на 0,809 (80,9%). Последовательность 2_CHGL_epi обеспечивает точный полный охват последовательности в образцах из Китая на 0,879 (87,9%) и точный полный охват последовательности в образцах не из Китая на 0,772 (77,2%).

[0035] Фиг. 9А-9В. Сравнение охвата консервативной области 1_D.vac, 1_C.ref, 1_CH_epi, 1_GL_epi, 2_CH_epi, 2_CHGL_epi и 3_GL_epi в образцах из Китая (фиг. 9А,

слева), образцах не из Китая (фиг. 9А, середина) и глобальной когорте образцов (фиг. 9А, справа). Фиг. 9В иллюстрирует охват консервативной области 1_D.vac, 1_GL_eri и 2_CHGL_eri во всех основных генотипах.

[0036] Фиг. 10А-10В. Охват консервативной области 1089 китайских

последовательностей HBV (фиг. 10А) и всех 3041 глобальных последовательностей HBV (фиг. 10В) с использованием последовательностей 2_CHGL_eri по сравнению с последовательностью генотипа D дикого типа и последовательностью 1_GL_eri.

Последовательность генотипа D используется в вакцинах Transgene и GlobeImmune.

[0037] Фиг. 11А-11D. На фиг. 11А и фиг. 11В показаны эписенсусные антигены

генотипа D HBV, разработанные для эффективного охвата эпитопов в США и Европе; антигенные конструкции начинаются на фиг. 11А и продолжаются на фиг. 11В.

Эписенсусные антигены генотипа D HBV, полученные из кора (С), PreS1 и PreS2, поверхностного антигена (S) и полимеразы (Р), показаны в указанном порядке. Варианты эписенсусных антигенов, полученных из последовательностей с делециями в

трансмембранных (ТМ) доменах или с переупорядоченными антигенами относительно порядка белков в HBV, разработаны для минимизации агрегации и максимизации экспрессии. На фиг. 11С показаны конструкции для тех же антигенов, каждый из которых содержит метку эпитопа гемагглютинина (НА), вставленную на С-конце. На фиг. 11D показана вирусная экспрессия антигенов, измеренная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением ДСН (ДСН-ПААГ) с последующим проявлением иммуноблот антителам, нацеленными на эпитопную метку НА, встроенную в каждую конструкцию.

[0038] Фиг. 12А-12В. На фиг. 12А показаны эписенсусные антигены генотипа D

HBV, полученные из последовательностей PreS1 и PreS2, поверхностного антигена (S),

полимеразы (Р) и/или кора (С). Четыре из антигенов имеют делеции в последовательности, полученной из белка Р, как показано. Метки эпитопа V5 или гемагглютинина (НА), сконструированные в конструкциях; при этом метка V5 была

вставлена на N'-конце, а метка НА была вставлена на C'-конце. На фиг. 12В показана вирусная экспрессия антигенов, измеренная с помощью ДСН-ПААГ с последующим

иммуноблоттингом с антителами, нацеленными на эпитопную метку V5 или НА, встроенную в каждую конструкцию.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

[0039] Различные термины, относящиеся к аспектам настоящего описания, используются повсюду в настоящем описании и формуле изобретения. Такие термины имеют обычные значения, понимаемые в данной области, если не указано иначе. Другие термины с конкретными определениями должны истолковываться образом, согласующимся с определениями, приведенными в настоящей заявке.

[0040] В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включает указание на множественное число, если только в содержании явно не указано иное. Таким образом, например, указание на “клетку” включает комбинацию двух или более клеток, и тому подобное. Использование альтернативы (*например*, «или») следует понимать как означающее либо одну, либо обе, либо любую их комбинацию, и может быть использовано как синоним «и/или». В данном контексте термины “включать” и “иметь” используются как синонимы, причем термины и их варианты следует толковать как неограничивающие.

[0041] Подразумевается, что в настоящей заявке в объем термина “примерно” по отношению к измеримому значению, такому как количество, временная продолжительность и тому подобное, входят вариации до $\pm 20\%$ от указанного значения, так как такие вариации подходят для реализации описанных способов. Если не указано иначе, то все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия реакций и так далее, используемые в настоящем описании и формуле изобретения, во всех случаях следует понимать как дополненные термином “примерно”. Соответственно, если не указано противоположное, численные параметры, изложенные в следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются примерными и могут изменяться в зависимости от желательных свойств, которых стремятся добиться. По меньшей мере и без попытки ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый численный параметр должен по меньшей мере истолковываться с учетом количества указанных значащих разрядов и с применением обычных способов округления.

[0042] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, устанавливающие общий объем настоящего изобретения, являются приблизительными, численные значения, изложенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько это

возможно. Любые численные значения, тем не менее, по своему существу включают некоторые ошибки, которые обязательно возникают в результате стандартного отклонения в измерениях при соответствующем тестировании.

[0043] Термин "содержать" означает присутствие указанных признаков, целых чисел, этапов или компонентов, указанных в формуле изобретения, но не исключает присутствие или добавление одного или более других признаков, целых чисел, этапов, компонентов или их групп. Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем притязаний указанными материалами или этапами и теми, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного объекта.

[0044] Слово "по существу" не исключает "полностью"; *например*, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости слово «по существу» может быть исключено из определений, приведенных в настоящем документе.

[0045] Выше и повсюду в настоящем описании термин “эффективное количество” относится к количеству, которое при необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени приводит к достижению желательного результата в отношении лечения соответствующего нарушения, состояния или побочного эффекта. Должно быть очевидно, что эффективное количество компонентов будет изменяться от пациента к пациенту не только в зависимости от конкретной выбранной вакцины, компонента или композиции, пути введения и способности указанных компонентов приводить к желательному результату у индивида, но также и от таких факторов, как конкретное болезненное состояние или тяжесть состояния, которое необходимо облегчить, уровни гормонов, возраст, пол, масса тела индивида, состояние пациента и тяжесть патологического состояния, от которого лечат, сопутствующая лекарственная терапия или особая диета, которую соблюдает конкретный пациент, и другие факторы, которые очевидны для специалистов в данной области, при этом подходящую дозировку определяет лечащий врач. Режим дозирования можно изменять, чтобы добиться лучшего терапевтического ответа. Эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором какие-либо токсичные или вредные действия указанных компонентов перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

[0046] Термин “введение” означает либо введение непосредственно соединения или композиции, либо введение пролекарства, производного или аналога, из которого

будет образовываться эквивалентное количество активного соединения или вещества внутри организма.

[0047] Термины “субъект”, “индивид” и “пациент” используются взаимозаменяемо в данной заявке и относятся к животному, например, к человеку, которого лечат, включая профилактическое лечение, фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению. Термин “субъект” в настоящей заявке относится к человеку и к не относящимся к человеку животным. Термины “не относящиеся к человеку животные” включают всех позвоночных, например, млекопитающих, таких как не относящиеся к человеку приматы (в частности, высшие приматы), овца, собака, грызун (например, мышь или крыса), морская свинка, коза, свинья, кошка, кролики, коровы, лошади, и не млекопитающих, таких как рептилии, амфибии, куры и индейки.

[0048] Термин “эписенсусный” относится к консенсусной последовательности на основе эпитопов. Это последовательность, эпитопы в которой совпадают, насколько это возможно, с эпитопами в референсном наборе природных последовательностей. Термины “эпитоп” и “потенциальный эпитоп” относятся к последовательности из k символов (обычно k находится в диапазоне от 8 до 12), часто в контексте подпоследовательности из k символов в гораздо более длинной природной последовательности или последовательности антигена для вакцины. Т-клетки могут распознавать такие пептиды при иммунном ответе.

[0049] Термин “EpiGraph” относится к вычислительной стратегии, разработанной для создания последовательностей, в которых предусмотрена оптимальная эписенсусная последовательность или набор последовательностей, которые в комбинации обеспечивают оптимальный охват популяции разнообразных вирусных последовательностей. Способ EpiGraph был ранее описан в заявке РСТ № WO 2016/054654 A1 и в Theiler, *et al.*, *Sci. Rep.* 6:33987 (2016), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Способом EpiGraph получают наборы искусственных, но интактных антигенов с максимальным охватом потенциальных Т-клеточных эпитопов (РТЕ, обычно 9-мерные пептидные последовательности), обнаруженных в разнообразной вирусной популяции. EpiGraph является следующим шагом по сравнению с предыдущими мозаичными способами разработки вакцины. Способ EpiGraph на основе графика является гораздо более мощным с точки зрения вычислений, чем мозаичные, использующие генетический алгоритм, что позволяет улучшить охват РТЕ за счет значительно большего количества рассмотренных комбинаций. Как способы EpiGraph, так и мозаичные способы

продуцируют белковые антигены с большим охватом разнообразия Т-клеточных эпитопов, чем природные штаммы. Мозаики HBV, HIV и HCV вызывали клеточные иммунные ответы большей ширины и глубины, чем комбинации природных штаммов или консенсусных иммуногенов. Мозаика HBV и мозаика HIV находятся в фазе I

5 клинических испытаний. В некоторых вариантах реализации алгоритм EpiGraph применяют для конструирования «эписенсусных» последовательностей, соответствующих консервативным областям HBV.

[0050] Термин «эписенсусная последовательность» относится к последовательности аминокислот искусственного антигена, которая сконструирована с

10 использованием алгоритма EpiGraph, основанного на популяции последовательностей HBV. Эписенсусная последовательность, которая является «основной» для популяции последовательностей HBV, представляет собой рассчитанную с помощью компьютера последовательность, которая обеспечивает максимальный средний охват эпитопов в данной популяции. «Эписенсусный антиген» представляет собой антиген, содержащий

15 эписенсусную аминокислотную последовательность.

[0051] В настоящей заявке термины “лечение” или “терапия” (а также различные формы данных терминов, включая “излечивающий” или “паллиативный”) относятся к лечению инфицированного субъекта. В данной заявке, термин “лечение” включает облегчение или ослабление по меньшей мере одного неблагоприятного или

20 отрицательного эффекта или симптома состояния, заболевания или нарушения. Указанное состояние, заболевание или нарушение может представлять собой инфекцию HBV.

[0052] В данной заявке термины “предотвращение” или “профилактика” относятся к предотвращению инфицирования субъекта, или снижению риска инфицирования

25 субъекта, или остановке передачи или снижению риска передачи, например, HBV или родственного вируса.

[0053] “Фармацевтически приемлемый” относится к таким соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в рамках обоснованного медицинского суждения, подходят для контактирования с тканями людей

30 и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблемных осложнений, в соответствии с приемлемым отношением польза/риск.

[0054] В данном контексте термины “вакцина”, “иммуногенное соединение” и “иммуногенная композиция” используются взаимозаменяемо для обозначения соединения или композиции, которые индуцируют иммунный ответ у субъекта. Профилактическая вакцина обеспечивает некоторую степень защиты от новых инфекций. Терапевтическая вакцина помогает в лечении существующей инфекции.

II. Антигены

[0055] В настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие последовательности, полученные из определенных популяций HBV. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-11 или SEQ ID NO:14-36. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит две или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:16-36. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19 или 29, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, 21, 27, 28 или 34, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, 22, 23, 30, 31, 33, 35 или 36. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах

реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11. В любом из вышеупомянутых вариантов реализации указанный полипептид может дополнительно содержать одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:17 и 18.

[0056] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции или вакцине, содержащей один или более из вышеупомянутых полипептидов. В некоторых вариантах реализации иммуногенные композиции содержат один из вышеупомянутых полипептидов. В других вариантах реализации иммуногенные композиции содержат два или более из вышеупомянутых полипептидов, которые могут быть представлены в виде одного полипептида или в виде двух или более полипептидов.

[0057] В некоторых вариантах реализации полипептиды представляют собой эписенсусные антигены, которые содержат последовательности, полученные из последовательностей HBV дикого типа с применением способа EpiGraph. В алгоритме EpiGraph природные последовательности описаны в виде большого графа узлов, каждый узел соответствует эпитопу, который встречается в природных последовательностях. Ориентированные ребра соединяют два узла, если соответствующие две строки эпитопа

“совместимы”, то есть, последние $k-1$ символов в первой строке соответствуют первым $k-1$ символам во строке цепочке. Если две строки совместимы, то вместе они образуют строку длины $k+1$. В более общем смысле, путь через данный граф из узлов и ребер соответствует одной строке, которая содержит k -мерные подстроки, соответствующие каждому из узлов на графе. Каждый узел взвешен в соответствии с количеством последовательностей в референсном наборе, содержащих подстроку, соответствующую данному узлу. В алгоритме EriGraph используют схему динамического программирования для обнаружения пути через данную полный граф, для которого сумма данных весов максимальна, и следовательно, обеспечивают наилучший охват.

[0058] В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген является производным от белка HBV C. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген является производным от белка HBV Pol (P) или S или другого белка HBV. Эписенсусные антигены могут быть получены из полноразмерных белковых последовательностей, областей полноразмерных белковых последовательностей или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит эпитопы, полученные из двух или более из белков C, P и S HBV. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген дополнительно содержит один или более эпитопов, полученных из домена PreS1 или домена PreS2. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген получен из консервативной области HBV. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген получен из консервативной области одного или более из C, S и P HBV.

[0059] В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит последовательности, полученные из двух или более белков C, P и S HBV, причем указанные последовательности переупорядочены относительно их порядка в геноме HBV. Переупорядочение последовательностей в пределах эписенсусного антигена может обеспечивать более эффективную или иным образом улучшенную *in vitro* экспрессию антигена.

[0060] В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген происходит из белка HBV, который содержит одну или более мутаций, таких как делеции или замены аминокислот. В некоторых вариантах реализации мутация инактивирует по меньшей мере одну функцию, присутствующую в белке дикого типа. Например, PreS1 может быть инактивирован путем удаления последовательности миристоилирования на N-конце

белка, или Pol может быть инактивирован путем удаления или мутации ферментативных активных сайтов. В некоторых вариантах реализации одна или более мутаций присутствуют в активном сайте рибонуклеазы HBV (РНКаза Н) и приводят к потере активности РНКаза Н. Типичные мутации показаны в Таблице 1.

5 **[0061]** В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген разработан с использованием выбранной популяции HBV, в результате чего получают эписенсусный антиген, который является основным для этой популяции. Например, популяция HBV может представлять собой генотипы HBV, присутствующие в выбранном географическом местоположении, таком как Азия, Северная Америка, Южная Америка, Европа, Африка
10 или Австралия. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV В в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV С в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального
15 эпидемического HBV А в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV СВ в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV D в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный
20 антиген является основным для регионального эпидемического HBV DC в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV DE в Азии или, более конкретно, в Китае. В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV Е в Азии или, более конкретно, в Китае. В других
25 вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV F в Азии или, более конкретно, в Китае.

[0062] В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV с множественным генотипом в Северной
 Америке. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным
30 для регионального эпидемического HBV А в Северной Америке. В некоторых вариантах реализации эписенсусного популяционного антигена является основным для регионального эпидемического HBV В в Северной Америке. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического

для регионального эпидемического HBV С в Австралии. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV СВ в Австралии. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV D. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV DC. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV DE. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV E. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для регионального эпидемического HBV F.

[0067] В других вариантах реализации эписенсусный антиген является основным для глобального набора HBV в описанных вакцинах.

[0068] В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген HBV представляет собой 1_CH_eri (SEQ ID NO:1), который был разработан с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая. В некоторых вариантах реализации изобретения эписенсусный антиген HBV представляет собой 1_GL_eri (SEQ ID NO:2), разработанный с использованием глобального набора из 3041 последовательностей HBV. В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген представляет собой комбинацию двух или более индивидуальных эписенсусных антигенов. Например, в некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит 2_CH_eri, который содержит два эписенсусных антигена, разработанных с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая (SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4). В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит 2_CHGL_eri, который содержит первый эписенсусный антиген, Epi1 (SEQ ID NO:5), разработанный с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая, и второй эписенсусный антиген, Epi2 (SEQ ID NO:6), разработанный с использованием глобального набора из 3041 последовательностей HBV, причем Epi1 уже зафиксирован в растворе. Другими словами, Epi2 дополняет Epi1, разработанный с уже присутствующим Epi1. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит модифицированную версию 2_CHGL_eri, которая содержит Epi3 (SEQ ID NO:7) и Epi4 (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген содержит 3_GL_eri, который содержит три эписенсусных антигена (SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; и SEQ ID NO:11), разработанные с использованием глобального набора из 3041 последовательностей HBV.

В некоторых вариантах реализации эписенсусный антиген содержит последовательность естественного подтипа D (SEQ ID NO:12), регистрационный номер GenBank Y07587. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит природную эталонную последовательность подтипа C (SEQ ID NO:13), регистрационный номер

5 GenBank GQ358158. Каждый из эталонных генов с регистрационными номерами Y07587 и GQ358158 полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген представляет собой модифицированную последовательность генотипа D, представленную в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген представляет собой
10 переупорядоченную последовательность генотипа D, представленную в SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген содержит одну или более последовательностей, представленных в SEQ ID NO:16-23 и SEQ ID NO: 27-36. В некоторых вариантах реализации указанный эписенсусный антиген HBV содержит две или более из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:36.

15 **[0069]** Дополнительно в настоящем документе предложены иммуногенные композиции или вакцины, содержащие один или более из вышеупомянутых эписенсусных антигенов. Эписенсусные антигены можно доставлять в виде ДНК, РНК или полипептидов. В некоторых вариантах реализации указанные вакцины содержат один антиген. В других вариантах реализации вакцины содержат два или более антигенов,
20 которые могут быть представлены в виде одного полипептида или в виде двух или более полипептидов. В некоторых вариантах реализации вакцины содержат эписенсусные антигены, которые обеспечивают эффективный охват эпитопов для выбранных генотипов HBV, таких как генотипы, присутствующие в выбранном географическом местоположении. Вакцины, предложенные в настоящем документе, могут представлять
25 собой профилактические вакцины или терапевтические вакцины. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит один или более полипептидов и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0070] В некоторых вариантах реализации вакцина содержит два эписенсусных антигена, разработанных с использованием последовательностей HBV из Китая. В
30 некоторых вариантах реализации вакцина содержит эписенсусные антигены, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4, которые могут быть представлены в виде одного полипептида или двух полипептидов. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит эписенсусный антиген, разработанный с использованием

последовательностей HBV из Китая, и эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из глобального набора. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит эписенсусные антигены, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, которые могут быть представлены в виде одного полипептида или двух полипептидов. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит эписенсусные антигены, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, которые могут быть представлены в виде одного полипептида или двух полипептидов. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит три эписенсусных антигена, разработанных с использованием последовательностей HBV из глобального набора. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит эписенсусные антигены, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, которые могут быть представлены в виде одного полипептида, в виде двух полипептидов или в виде трех полипептидов.

III. Полинуклеотиды и векторы

[0071] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид. Полинуклеотид может представлять собой ДНК или РНК и может кодировать любой из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в одной или более из SEQ ID NO:1-36. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии в конкретном хозяине.

[0072] В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-11 или SEQ ID NO:14-36. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий две или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:16-36. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19 или 29, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, 21, 27, 28 или 34, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, 22, 23, 30, 31, 33, 35 или 36. В

[illegible]

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:9, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11. В любом из вышеупомянутых вариантов реализации полинуклеотид может дополнительно кодировать полипептид, содержащий одну или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:17 и 18.

[0073] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к композиции, *например*, иммуногенной композиции, содержащей два или более из вышеупомянутых полинуклеотидов.

[0074] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей один или более из вышеупомянутых полинуклеотидов. В некоторых вариантах реализации вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0075] Дополнительно в настоящем документе предложены векторы, которые содержат любой из вышеупомянутых полинуклеотидов. Векторы, которые можно применять, включают, но не ограничены перечисленными: плазмиды, бактериальные векторы и вирусные векторы. Вирусные векторы включают цитомегаловирусные векторы. Преимущество векторов на основе CMV для применения для доставки терапевтической вакцины состоит в том, что они могут быть использованы для того, чтобы вызывать конкретные CD8⁺ Т-клеточные ответы и вызывать более эффективные и продолжительные ответы. В моделях на животных было показано, что вакцины на основе данных вирусных векторов могут устранять вирусные инфекции (Hansen *et al.*, *Science* 340:1237874 (2013)), и, следовательно, данные подходы перспективны для создания терапевтической вакцины (также: Hansen *et al.*, *Science* 351:714-720 (2016))

[0076] Другие вирусные векторы могут включать поксвирус, включая вирус осповакцины Анкара и вирус оспы канареек; аденовирусы, включая аденовирус типа 5 (Ad5); вирус краснухи; вирус Сендай; рабдовирус; альфавирусы и аденоассоциированные вирусы. В качестве альтернативы антигены для вакцины можно доставлять в виде ДНК, РНК или белковых компонентов вакцины. Эписенсусные антигены будут совместимы по существу с любым способом доставки антигенов для вакцины.

[0077] В некоторых аспектах в настоящем описании предложены иммуногенные композиции или вакцины на основе вектора, в которых вектор экспрессии используется для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более антигенов, описанных в настоящем документе. Например, вектор экспрессии может представлять собой каркас поксвируса, аденовируса, краснухи, вируса Сендай, рабдовируса, альфавируса или аденоассоциированного вируса.

[0078] В некоторых вариантах реализации в композициях и способах, описанных в настоящем документе, используют вектор на основе CMV. Благодаря нескольким аспектам хроническая инфекция HBV является особенно подходящей для иммунотерапевтического вмешательства посредством векторов на основе CMV.

[0079] Во-первых, подавляющее большинство людей со зрелой иммунной системой легко формируют эффективный иммунный ответ и явную острую инфекцию. Поскольку этот иммунный клиренс в основном опосредован цитокин-продуцирующими CD8⁺ Т-клетками, оказалось, что индукция активных эффекторных CD8⁺ Т-клеточных (TEM) ответов печени резидента имеет решающее значение для клиренса HBV. Таким образом, индукции устойчивых эффекторных HBV-специфических CD8⁺ Т-клеток в печени пациентов с СНВ должно быть достаточно для контроля и в конечном итоге устранения HBV. TEM-частоты, индуцированные векторами на основе CMV, особенно высоки в печени инокулированных макак-резус (RM) CD8⁺ Т-клеток (TEM), на приложенной Фигуре 1).

[0080] Во вторых, в отличие от других небольших вирусов хронических заболеваний, таких как ВИЧ или HCV, которые демонстрируют высокую частоту мутаций, приводящих к квазивидам, малый (3,2 т.н.) геном ДНК HBV более ограничен в своей способности мутировать из-за перекрывающихся открытых рамок считывания (ORF) (Фигура 1).

[0081] К сожалению, Т-клетки, индуцируемые традиционными подходами к вакцинации (*например*, на основе пептида, на основе белка, ДНК и даже гетерологичных

«прайм-буст» схем индукции Т-клеток, включающих как ДНК, так и поксвирусные векторы), больше не обнаруживаются на периферии через несколько месяцев, что может быть слишком быстро, чтобы полностью предотвратить выживание остаточных геномов HBV, которые потенциально могут обеспечить источник вирусной отдачи. Напротив, только CMV-вектор, индуцированный ТЕМ, постоянно поддерживается в кровотоке и в печени с высокой частотой в течение многих лет (Hansen *et al.*, *Nature* 2011).

[0082] В некоторых вариантах реализации указанный вектор содержит вектор на основе CMV человека (HCMV) или вектор на основе CMV макаки-резус (RhCMV), содержащий каркас HCMV или RhCMV и один или более полинуклеотидов, кодирующих антиген. Один или более полинуклеотидов могут кодировать любой из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует два или более из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации вектор содержит два или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует один или более из вышеупомянутых антигенов.

[0083] Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим два или более векторов, каждый из которых содержит один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более из вышеупомянутых антигенов.

[0084] В некоторых вариантах реализации в векторе на основе CMV отсутствует ген UL82, который кодирует белок оболочки pp71. В некоторых вариантах реализации ген UL82 заменен одним или более полинуклеотидами, кодирующими один или более из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации в векторе на основе CMV отсутствует область гена UL128-UL130. В некоторых вариантах реализации в векторе на основе CMV отсутствует область гена UL146-UL147. В некоторых вариантах реализации в векторе на основе CMV отсутствует область гена UL128-UL130 и отсутствует область гена UL146-147. В некоторых вариантах реализации вектор на основе CMV имеет интактную область гена UL128-UL130 и интактную область гена UL146-UL147. Область гена UL128-UL130 включает ген UL128, ген UL130 и любую область между геном UL128 и геном UL130. Область гена UL146-UL147 включает ген UL146, ген UL147 и любую область между геном UL146 и геном UL147.

[0085] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены иммуногенные композиции или вакцины, содержащие вышеупомянутые векторы. На иммунные ответы, индуцированные векторами CMV, не влияет уже существующий антивекторный иммунитет, что позволяет последовательно использовать один и тот же вектор для разных

антигенов (Hansen *et al.*, *Nature Medicine* 15:293-299 (2009)). Частично способность к суперинфекции обусловлена вирусными ингибиторами презентации МНС-I-опосредованного антигена к CD8⁺ Т-клеткам (Hansen *et al.*, *Science* 328:102-106 (2010)). Поскольку почти вся человеческая популяция, включая большинство пациентов с СНВ, хронически инфицирована HCMV, суперинфекция является важной особенностью, позволяющей использовать векторы CMV независимо от статуса CMV-реципиента. Векторы CMV обладают уникальной иммунологией. Удивительной и неожиданной особенностью некоторых модифицированных векторов RhCMV/SIV было обнаружение того, что эти векторы вызывали образование CD8⁺ Т-клеток, которые не распознавали ни один из эпитопов, распознаваемых обычными CD8⁺ Т-клетками с рестрикцией МНСIа, в ответ на саму инфекцию SIV или в ответ на любую другую векторную платформу, экспрессирующую антигены SIV. Тем не менее, CD8⁺ Т-клетки, вызванные CMV-вектором, распознают в 3 раза больше пептидов в пределах данного антигена, как показано в PCT/US2016/017373, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки (см. также Hansen *et al.*, *Science* 2013, 2016).

[0086] Основополагающую причину этой примечательной широты определили путем анализа элементов рестрикции для отдельных пептидов заданных антигенов (CMV, SIV, TB) у более чем 100 животных, и демонстрировали поразительную особенность векторов на основе CMV: каждый из пептидов, индуцированных вектором Rh 68-1, был презентирован либо МНС-II, который обычно распознается CD4⁺ Т-клетками, либо МНС-E, непалиморфной молекулой МНС-I, которая обычно связывает пептид VMAPRTLIL (VL9), происходящий из МНС-I, и действует как лиганд для ингибирующих рецепторов NKG2A НК-клеток. (Следует отметить, что все CD4⁺ Т-клетки являются обычными, *то есть*, рестриктированными МНС-II.) Примечательно, что CD8⁺ Т-клеточные ответы, индуцированные RhCMV штамма 68-1, на перекрывающиеся пептидные пулы, покрывающие целые антигены, могут быть полностью заблокированы путем добавления VL9 (ингибирующий МНС-E) или полученного из инвариантной цепи CLIP (ингибирующий МНС-II), таким образом демонстрируя, что все CD8⁺ Т-клеточные эпитопы являются «нетрадиционными» (Hansen *et al.*, *Science* 2016). Хотя CD8⁺ Т-клетки как с рестрикцией МНС-II, так и МНС-E, иногда наблюдались при других инфекционных заболеваниях и раке, обильное присутствие таких Т-клеток у иммунизированных RhCMV животных является беспрецедентным и поистине разрушающим парадигму. Важно отметить, что CD8⁺ Т-клетки, индуцированные RhCMV-вектором, с неканонической

рестрикцией МНС-II и МНС-E и МНС-Ia (обсуждаемые ниже), распознают SIV-инфицированные CD4+ Т-клетки, что позволяет предположить, что нетрадиционная презентация антигена может происходить в SIV-инфицированных клетках, даже если SIV не способен праймировать такой ответ. Поскольку многие хронические вирусы, включая HCV, активируют HLA-E, предположительно в качестве защиты против NK-клеток, эта высококонсервативная молекула МНС представляет собой новую мишень для иммунотерапии. (Экспрессия HLA-E в гепатоцитах, инфицированных HBV, менее известна по сравнению с HCV, но высокие уровни циркулирующего HLA-E обнаруживаются у носителей хронического HBV). Таким образом, способность вызывать CD8+ Т-клетки с рестрикцией МНС-E открывает возможность нацеливания на HBV через этот высококонсервативный элемент рестрикции.

[0087] Конкретные паттерны модификаций генов в векторах CMV связаны с различными ответами Т-клеток. Нетрадиционные CD8+ Т-клетки индуцируются векторами, в которых отсутствует область гена UL128-UL130 и область гена UL146-UL147 (Hansen *et al.*, *Science* 2013, 2016, OHSU2346). Напротив, CD8+ Т-клеточные ответы, индуцированные естественной инфекцией RhCMV или восстановленной по UL128-UL130 версией RhCMV (Rh68-1), являются обычными, *то есть*, рестриктированными по МНС-I (Hansen *et al.*, *Science* 2013). Тем не менее, даже обычные CD8+ Т-клеточные ответы, вызванные интактными векторами UL128-UL130, все еще значительно шире, чем те, которые индуцированы не-CMV-векторами (Hansen *et al.*, *Science* 2013). Кроме того, этот широкий традиционный CD8+ Т-клеточный ответ полностью направлен на субдоминантные («неканонические») эпитопы, поскольку ген уклонения от иммунитета US11 предотвращает индукцию Т-клеток, распознающих «канонические» (*т.е.* иммунодоминантные) эпитопы МНС-I (Hansen *et al.*, *Science* 2013). Таким образом, генетически модифицированные векторы CMV способны вызывать четыре различные популяции CD8+ Т-клеток, каждая из которых распознает набор неперекрывающихся эпитопов и классифицируется следующим образом: 1. Нетрадиционные, с рестрикцией МНС-II; 2. Нетрадиционные, с рестрикцией МНС-E; 3. Традиционные, с рестрикцией МНС-I, неканонические (=субдоминантные); 4. Традиционные, с рестрикцией МНС-I, канонические (=иммунодоминантные). Наличие или отсутствие областей генов UL128-UL130 и UL146-UL147 определяет переход от обычных к нетрадиционным CD8+ Т-клеткам, тогда как канонические CD8+ Т-клетки

индуцируются в отсутствие US11 в обоих векторах, в которых присутствуют UL128-UL130 и UL146-UL147, и векторах, в которых отсутствуют UL128-130 и UL146-UL147.

[0088] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции или вакцине, содержащей любой из вышеупомянутых векторов и один или более полинуклеотидов, кодирующих антиген. Один или более полинуклеотидов могут кодировать любой из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует два или более из вышеупомянутых антигенов. Два или более полипептидов могут экспрессироваться одними и теми же или разными промоторами. В некоторых вариантах реализации вектор содержит два или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует один или более из вышеупомянутых антигенов. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит один или более из вышеупомянутых векторов и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

III. Способы лечения

[0089] В некоторых вариантах реализации предложены способы лечения HBV у субъекта, включающие введение эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, содержащей один или более из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов или композиций, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит один или более антигенов или полинуклеотидов, кодирующих антигены, которые выбраны для эффективного охвата разнообразия генотипов HBV в пределах географической области. В некоторых вариантах реализации вакцина представлена в форме одного или более полипептидов. В других вариантах реализации вакцина представлена в форме одного или более полинуклеотидов, которые могут быть представлены в рекомбинантном вирусном векторе. В любом из вышеупомянутых вариантов реализации вакцина может дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

[0090] В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции или генерирования иммунного ответа у субъекта. Такие способы включают введение эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, содержащей один или более из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов или композиций, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит

один или более антигенов или полинуклеотидов, кодирующих антигены, которые
выбраны для эффективного охвата разнообразия генотипов HBV в пределах
географической области. В некоторых вариантах реализации вакцина представлена в
форме одного или более полипептидов. В других вариантах реализации вакцина
5 представлена в форме одного или более полинуклеотидов, которые могут быть
представлены в рекомбинантном вирусном векторе. В любом из вышеупомянутых
вариантов реализации вакцина может дополнительно содержать один или более
фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

[0091] Некоторые варианты реализации включают способы лечения инфекции

10 HBV у субъекта, включающие введение эффективного количества иммуногенной
композиции или вакцины, содержащей один или более из вышеупомянутых
полипептидов, полинуклеотидов, векторов или композиций, нуждающемуся в этом
субъекту. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит один или более
антигенов или полинуклеотидов, кодирующих антигены, которые выбраны для
15 эффективного охвата разнообразия генотипов HBV в пределах географической области. В
некоторых вариантах реализации вакцина представлена в форме одного или более
полипептидов. В других вариантах реализации вакцина представлена в форме одного или
более полинуклеотидов, которые могут быть представлены в рекомбинантном вирусном
векторе. В любом из вышеупомянутых вариантов реализации вакцина может
20 дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей или
вспомогательных веществ.

[0092] В настоящем изобретении дополнительно предложены способы защиты

субъекта от инфекции HBV, включающие введение эффективного количества
иммуногенной композиции или вакцины, содержащей один или более из
25 вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов или композиций,
нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации вакцина содержит
один или более антигенов или полинуклеотидов, кодирующих антигены, которые
выбраны для эффективного охвата разнообразия генотипов HBV в пределах
географической области. В некоторых вариантах реализации вакцина представлена в
30 форме одного или более полипептидов. В других вариантах реализации вакцина
представлена в форме одного или более полинуклеотидов, которые могут быть
представлены в рекомбинантном вирусном векторе. В любом из вышеупомянутых

вариантов реализации вакцина может дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

[0093] Некоторые варианты реализации включают способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающие определение одной или более эписенсусных последовательностей, получение вакцины, содержащей вектор, содержащий один или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более эписенсусных последовательностей, и введение указанной вакцины нуждающемуся в этом субъекту. Некоторые варианты реализации включают способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающие определение одной или более эписенсусных последовательностей, получение вакцины, содержащей один или более антигенов, имеющих аминокислотную последовательность согласно одной или более эписенсусных последовательностей, и введение указанной вакцины нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей включают 1_CH_eri (SEQ ID NO:1), 1_GL_eri (SEQ ID NO:2), 2_CH_eri, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4, 2_CHGL_eri, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в (SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, 2_CHGL_eri, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, 3_GL_eri, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO:11, последовательность природного подтипа D (SEQ ID NO:12), эталонную последовательность природного подтипа C (SEQ ID NO:13), модифицированную последовательность генотипа D, приведенную в SEQ ID NO:14, и переупорядоченную последовательность генотипа D, приведенную в SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей содержат одну или более последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:16-23 и SEQ ID NO:27-36. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей включают две или более из SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:36.

[0094] Некоторые варианты реализации включают способы стимулирования ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающие получение иммуногенной композиции или вакцины, содержащей один или более из вышеупомянутых полинуклеотидов,

кодирующих один или более эписенсусных антигенов, и введение иммуногенной композиции или вакцины нуждающемуся в этом субъекту. Некоторые варианты реализации включают способы стимулирования ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающие получение иммуногенной композиции или вакцины, содержащей один или более из вышеупомянутых эписенсусных антигенов, и введение иммуногенной композиции или вакцины нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей включают 1_CH_епі (SEQ ID NO:1), 1_GL_епі (SEQ ID NO:2), 2_CH_епі, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4, 2_CHGL_епі, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в (SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, 2_CHGL_епі, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, 3_GL_епі, которая содержит аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO:11, последовательность природного подтипа D (SEQ ID NO:12), эталонную последовательность природного подтипа C (SEQ ID NO:13), модифицированную последовательность генотипа D, приведенную в SEQ ID NO:14, и переупорядоченную последовательность генотипа D, приведенную в SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей содержат одну или более последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:16-23 и SEQ ID NO:27-36. В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, в которых одна или более эписенсусных последовательностей включают две или более из SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:36.

[0095] В любом из вышеупомянутых вариантов реализации иммуногенная композиция или вакцина может представлять собой профилактическую вакцину или терапевтическую вакцину.

[0096] Недавние открытия в области разработки вакцин против HBV включают идею вакцины, индуцирующей эффекторные Т-клетки памяти (TEM), чтобы предотвратить инфицирование HBV. В отличие от основных Т-клеток памяти (TCM), которые индуцируют с помощью обычных вакцин, TEM постоянно находятся в лимфоидных тканях и экстралимфоидных эффекторных сайтах и готовы сразу опосредовать противовирусную эффекторную функцию, таким образом создавая

постоянный иммунный щит на воротах проникновения вируса и сайтах реактивации вируса. Наиболее подходящую векторную систему для индукции и неограниченного поддержания ТЕМ получили из CMV. Предположительно благодаря непрерывному низкому уровню реактивации и/или экспрессии генов в постоянно инфицированных клетках CMV поддерживает как раз подходящий постоянный низкий уровень иммунной стимуляции, необходимый для поддержания ТЕМ без запуска истощения Т-клеток.

[0097] В некоторых вариантах реализации указанная иммуногенная композиция или вакцина может быть использована в контексте терапевтических вакцин. Например, вакцина может быть сконструирована с использованием стратегии кластерного анализа методом k-средних для идентификации набора из 6 - 10 последовательностей антигена, которые обеспечивают хороший охват эпитопов в популяции людей, инфицированных высоковариабельным патогеном, таким как HBV. В некоторых вариантах реализации вирус, инфицирующий субъекта, секвенируют и доставляют две или три вакцины (или одну или более вакцин, содержащих два или три полипептида или один или более полинуклеотидов, кодирующих два или три полипептида), которые обеспечивают хороший охват эпитопов в инфицирующем вирусе. Таким образом, обеспечивается эффективный охват эпитопов, при этом несовпадения эпитопов между вакциной и инфицирующим штаммом минимизируются.

[0098] В некоторых вариантах реализации предложена иммуногенная композиция или вакцина, содержащая каркас вектора HCMV, в котором отсутствуют некоторые участки генов CMV, и полинуклеотид, кодирующий эписенсусный антиген. В некоторых вариантах реализации в каркасе HCMV отсутствует область гена UL128-UL130 (которая включает ген UL128, ген UL130 и любую область между геном UL128 и геном UL130) и область гена UL146-UL147 (которая включает ген UL146, ген UL147 и любую область между геном UL146 и геном UL147). В некоторые варианты реализации также может быть включена делеция белка тегумента pp71 (гена UL82) (публикации заявок на патент США № 2014/0141038; 2008/0199493; 2013/0142823; и публикация заявки на международный патент № WO/2014/138209).

[0099] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к любому из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов, вакцин или композиций для применения для лечения инфекции HBV. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к любому из вышеупомянутых

полипептидов, полинуклеотидов, векторов, вакцин или композиций для применения для защиты субъекта от инфекции HBV.

[0100] В настоящем изобретении также предложено применение любого из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов, вакцин или композиций для изготовления лекарственного средства для применения для лечения инфекции HBV. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении дополнительно предложено применение любого из вышеупомянутых полипептидов, полинуклеотидов, векторов, иммуногенных композиций, вакцин или композиций для изготовления лекарственного средства для применения для защиты субъекта от инфекции HBV.

[0101] Типичные пути введения полипептидов, полинуклеотидов, вектора, вакцин или композиций, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, пероральный, местный, трансдермальный, ингаляционный, парентеральный, сублингвальный, буккальный, ректальный, вагинальный и интраназальный. Термин “парентеральный” в данном контексте включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутривенные инъекции или инфузионные методики. В некоторых вариантах реализации введение включает введение путем, выбранным из перорального, внутривенного, парентерального, внутрижелудочного, внутриплеврального, внутрилегочного, внутриректального, внутрикожного, внутрибрюшинного, внутриопухолевого, подкожного, местного, трансдермального, внутричерепного, интратекального, интраназального и внутримышечного введения.

[0102] Фармацевтические композиции согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения приготовлены таким образом, чтобы обеспечить биодоступность содержащихся в них активных ингредиентов при введении композиции пациенту.

Композиции, которые будут введены субъекту или пациенту, могут иметь форму одной или более единиц дозирования, где, например, таблетка может представлять собой одну единицу дозирования, и емкость описанных в настоящем документе полипептидов, полинуклеотидов, вектора, вакцин или композиций в жидкой форме может содержать множество единиц дозирования. Фактические способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники; например, *см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)*. Композиция, подлежащая введению, в любом случае будет содержать эффективное количество полипептида, полинуклеотида, вектора, вакцины или

композиции согласно настоящему изобретению для лечения или предотвращения HBV в соответствии с настоящим изобретением.

[0103] Композиция может быть в форме твердого вещества или жидкости. В некоторых вариантах реализации носитель(носители) являются твердыми частицами, так что композиции находятся, например, в форме таблетки или порошка. Носитель(и) может представлять собой жидкость, причем композиции представляют собой, например, масло для полости рта, жидкость для инъекций или аэрозоль, который можно применять, например, при ингаляционном введении. Фармацевтическая композиция, предназначенная для перорального введения, предпочтительно находится в твердой или жидкой форме, где полутвердые, полужидкие, суспензионные и гелевые формы включены в формы, рассматриваемые в настоящем документе как твердые или жидкие.

[0104] В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, пластины или тому подобного. Такая твердая композиция обычно содержит один или более инертных разбавителей или съедобных носителей. Кроме того, могут присутствовать одно или более из следующих веществ: связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательные вещества, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхляющие агенты, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и тому подобное; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или стеротекс; скользящие агенты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат, апельсиновый ароматизатор; и краситель. Когда композиция находится в форме капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

[0105] Композиция может быть в форме жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции, в качестве двух примеров.

Предпочтительные композиции, предназначенные для перорального введения, содержат, в дополнение к настоящим соединениям, один или более из подсластителя, консервантов, красителя/красящего агента и усилителя вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, может быть включено одно или более из поверхностно-

активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

[0106] Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут включать один или более из следующих адъювантов:

- 5 стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или
- 10 пластика. Физиологический раствор является предпочтительным адъювантом.
- 15

Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Жидкая композиция, предназначенная для парентерального или перорального введения, должна содержать такое количество полипептида, полинуклеотида, вектора, вакцины или композиции, как описано в настоящем документе, чтобы получить подходящую

- 20 дозировку.

[0107] Композиция может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может подходящим образом содержать раствор, эмульсию, мазь или гелевую основу. Основание, например, может содержать одно или более из следующего: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители,

25 такие как вода и спирт, и эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в композиции для местного введения. Если композиция предназначена для трансдермального введения, она может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который будет плавиться в

30 прямой кишке и высвобождать лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистое основание в качестве подходящего не раздражающего вспомогательного вещества. Такие основания включают, без ограничения, ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

[0108] Композиция может содержать различные материалы, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования.

Например, композиция может включать материалы, которые образуют оболочку покрытия вокруг активных ингредиентов. Материалы, которые образуют оболочку покрытия, как

5 правило, являются инертными и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других энтеросолюбильных покрывающих агентов. В качестве альтернативы активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Композиция в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывается с полипептидом, полинуклеотидом, вектором, вакциной или композицией согласно настоящему описанию
10 и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие агенты, которые могут действовать в этом качестве, включают моноклональные или поликлональные антитела, один или более белков или липосому. Композиция может состоять по существу из единиц дозирования, которые можно вводить в виде аэрозоля. Термин "аэрозоль" используется для обозначения различных систем, начиная от систем коллоидной природы и заканчивая
15 системами, состоящими из упаковок под давлением. Доставку можно осуществлять сжиженным или сжатым газом или с помощью подходящей накачивающей системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли можно доставлять в однофазных, двухфазных или трехфазных системах для доставки активного (-ых) ингредиента(-ов). Доставка аэрозоля включает в себя необходимую емкость, активаторы, клапаны,
20 дополнительные емкости и тому подобное, которые вместе могут образовывать набор. Специалист в данной области техники без излишних экспериментов может определить предпочтительные аэрозоли.

[0109] Следует понимать, что композиции согласно настоящему описанию также охватывают молекулы-носители для полинуклеотидов, как описано в настоящем
25 документе (*например*, липидные наночастицы, платформы доставки в наноразмерном масштабе и тому подобное).

[0110] Фармацевтические композиции могут быть получены с помощью методики, хорошо известной в данной области техники. Например, композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть получена путем объединения композиции,
30 которая содержит полипептид, полинуклеотид, вектор, вакцину или композицию, как описано в настоящем документе, и, необязательно, одну или более солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой с образованием раствора. Поверхностно-активное вещество может быть добавлено для облегчения образования

вариантов вакцин. Исследуемую популяцию HBV на основе генотипа В Китая использовали для идентификации вакцин, которые будут обеспечивать терапевтические эффекты. Были разработаны референсный набор вакцин на основе азиатских вакцин и набор мировых вакцин, а также обновленные генотипы на основе азиатских вакцин.

- 5 Консервативные области генома HBV находятся в белке С (за вычетом первых 29 аминокислот на N-конце), белке S и белке Р. Высоковариабельную область N-конца Р-белка удаляли из рассмотрения (см. Фигуру 6).

[0117] В отличие от случая профилактической вакцины, когда неизвестно, с какими вирусами может встретиться субъект, в случае терапевтической вакцины можно
10 получить последовательность инфицирующего вируса и произвести выравнивание с ней.

[0118] При выборе антигена для применения в иммуногенной композиции или вакцине учитывают два фактора: антигенные эпитопы должны соответствовать как можно
15 большему количеству эпитопов инфицирующих субъекта вирусами, а несовпадения эпитопов между антигеном и инфицирующими субъекта вирусами должны быть как можно меньшими, чтобы ответ на соответствующие эпитопы вакцины был настолько направленным, насколько это возможно.

[0119] Филогенез основных генотипов HBV демонстрирует тенденцию к менее
ясной структуре. Скорее, он является “звездообразным” с очень длинными внешними ветвями и очень короткими, неявно выраженными внутренними ветвями около основания.
20 Часть данной структуры, вероятно, возникла вследствие рекомбинации внутри подтипа. Хотя это сложно подсчитать, рекомбинация безусловно встречается относительно часто, и по аналогии с тем, что наблюдают в рамках рекомбинации внутри подтипа, она, вероятно, обширна. Учитывая структуру дерева, простое применение кластеризации на филогенетическом дереве для определения референсного набора возможных вакцин не
25 будет настолько эффективным, так как ассоциации внутри генотипа имеют ограниченное значение в точки зрения эпитопов. Напротив, необходимо учитывать взаимосвязи последовательностей с помощью подходящей меры, и референсный набор необходимо выбирать на основании сходства потенциальных эпитопов между природными штаммами и предполагаемыми конструкциями вакцин.

30 [0120] Последовательности EpiGraph идентифицировали с использованием аминокислотных 9-меров (см. Фигуру 4А), но этот способ может использовать k -меры любой длины в качестве референсной точки, где k представляет собой длину предполагаемого потенциального эпитопа. В прошлой работе с мозаичными эпитопами

оптимальное решение для 9-меров было очень близким к оптимальному для других близких длин (8, 10, 11, 12), и ожидается, что это справедливо и для способа EpiGraph.

[0121] Охват эпитопов вакцин, содержащих а) одну эписенсусную последовательность; б) две эписенсусные последовательности; в) три эписенсусные последовательности; г) одну естественную последовательность генотипа HBV; и е) две естественные последовательности генотипа HBV сравнивают на Фигурах 4А-7В. Как правило, вакцины на основе генотипов обеспечивают превосходный охват этого генотипа, но плохой охват других генотипов. Данные на Фигурах 5А-5С демонстрируют, что две и три валентные последовательности Global EpiGraph существенно улучшают охват всех основных генотипов, обеспечивая сравнимый охват В и С, по сравнению со специфическими вакцинами В и С. Например, как видно на Фигурах 5А-5С, охват генотипа D составляет примерно 90% при использовании трех эписенсусных антигенов, в отличие от охвата примерно 50% для В или С-специфических вакцин или даже В+С-специфических вакцин.

ПРИМЕР 2:

ВРЕМЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭПИСЕНСУСНЫХ АНТИГЕНОВ

[0122] Антигены, разработанные с применением способа EpiGraph с целью максимизации соответствия эпитопов, похожи на природные последовательности, но уже не кодируют нативные белки. Хотя при конструировании этих последовательностей придерживались теоретических рекомендаций для экспрессии данных искусственных аминокислотных последовательностей, белки могут проявлять неожиданные профили экспрессии или не могут экспрессировать стабильный полноразмерный белок.

[0123] Для того, чтобы оценить профиль экспрессии этих последовательностей в контексте клеток млекопитающих, синтезировали и клонировали полинуклеотиды, кодирующие эписенсусные антигены, для временной трансфекции с использованием способов, описанных в WO 2016/054654, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Вкратце, ДНК, кодирующую данные конструкции (Genscript, Пискатауэй, Нью-Джерси) синтезировали так, чтобы она содержала совместимые сайты клонирования для плазмидных векторов (pcDNA3.1 и pOri). Все вставки оптимизировали по кодонам для экспрессии в хозяине. Каждую конструкцию также модифицировали, чтобы устранить остаточную активность фермента нативной последовательности, что описано у Kulkarni и др. Vaccine (2011), содержание

которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Плазмидный вектор
линеаризовали с помощью подходящих эндонуклеаз и обрабатывали фосфатазой
кишечника телят, чтобы предотвратить рециркуляризацию пустого вектора. Фрагменты
вектора и вставки разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы
5 подтвердить размеры расщепленных фрагментов, и очищали для лигирования с помощью
набора для очистки продуктов ПЦР (Thermo Scientific). Вставки лигировали с
линеаризованным вектором при соотношении вставки к вектору, приблизительно равном
3:1, в течение 15 минут при комнатной температуре, применяя набор для быстрого
лигирования (Roche, Индианаполис, Индиана), трансформировали полученными
10 векторами химически компетентные *E. coli* (DH5-альфа), и высевали на чашки для
селекции антибиотиком. ДНК из полученных колоний подвергали скринингу на наличие
вставок путем расщепления рестриктазами.

[0124] Клоны, содержащие каждую из правильных вставок в подходящей
ориентации по отношению к промотору и поли(А)-последовательности вектора, растили в
15 суспензионной культуре для очистки плазмидной ДНК. Активно растущие
субконфлюэнтные клетки 293Т или HELA в 12-луночных культуральных планшетах
получали 500 мкл свежей среды (DMEM с 10% FBS) в то время, пока готовили липосомы.
Для того, чтобы получить липосомы, содержащие плазмидную ДНК, 250 мкл
бессывороточной среды смешивали с 500 нг плазмидной ДНК и 250 мкл бессывороточной
20 среды смешивали с 2 мкл липида (Lipofectamine 2000, Invitrogen). После 5 минут
инкубации при комнатной температуре эти растворы объединяли, перемешивали и
инкубировали в течение 20 минут. Содержащие ДНК липосомы (500 мкл),
сформировавшиеся в данном процессе, добавляли по каплям в культуру и оставляли
инкубироваться в течение 12 - 16 часов, по прошествии данного промежутка времени
25 трансфицирующую смесь заменяли на свежую среду. После дополнительного дня
инкубации культуры собирали путем соскабливания и центрифугирования. Супернатанты
удаляли путем аспирации и осадки клеток лизировали путем ресуспендирования в 100 мкл
загрузочного буфера, содержащего краситель, 5% ДСН и 10% 2-меркаптоэтанол, и
центрифугирования на колонке QiaShred (Qiagen, Валенсия, Калифорния).

30 **[0125]** Экспрессию эписенсусных антигенов демонстрировали с помощью
электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением ДСН (ПААГ/ДСН) и вестерн-
блоттинга с антителами к эпитопной метке V5 или гемагглютинаина (НА), вставленной в
каждую конструкцию. Вкратце, получали NuPAGE 4-12% гели Bis-Tris, загружали на них

20-50 мкг общего белка и подвергали электрофору при 110 – 120 Вольтах в течение 90 минут. Разделенные белки переносили на мембраны PVDF путем полусухого или влажного переноса при 30 Вольтах в течение 90 минут. Неспецифическое связывание блокировали с помощью раствора 10% обезжиренного сухого молока в солевом трис-буфере с добавлением 0,1% tween-20 (ФБР-Т) в течение 60 минут. Антитела к НА (Sigma) или V5 (Invitrogen) разбавляли в 5% растворе молока и инкубировали с мембранами в течение 1 часа, а затем трижды промывали TBS-Т перед добавлением разведенного 1:10000 конъюгированного с пероксидазой хрена вторичного антитела козы против антител мыши (Invitrogen) в течение 1 часа. Затем блоты промывали три раза в TBS-Т, проявляли, используя набор с субстратом для усиленной хемилюминесценции (ECL) (Thermo-Pierce), и визуализировали с помощью цифровой гелевой системы визуализации.

ПРИМЕР 3:

ВСТРАИВАНИЕ ЭПИСЕНСУСНЫХ АНТИГЕНОВ В ВАС-КОНСТРУКЦИИ ВЕКТОРА CMV И ЭКСПРЕССИЯ С ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ВИРУСА.

[0126] Эписенсусные антигены разработали таким образом, чтобы обеспечить хороший охват Т-клеточных эпитопов, типичных для спектра вирусных последовательностей и генотипов HBV, из которых они были получены. Для наиболее эффективного использования данных антигенов, полинуклеотиды, кодирующие антигены, были сконструированы в векторах CMV, для которых было продемонстрировано, что они продуцируют в три раза больший спектр CD8⁺ Т-клеток по сравнению с конкурирующими платформами. Широкое представление антигена и профили пожизненной экспрессии векторов на основе CMV продемонстрировали способность защищать и лечить обезьян макак-резус, инфицированных SIV. Алгоритм разработки эписенсусного антигена в комбинации с векторами CMV может обеспечить даже больший охват HBV внутри генотипов и по всем генотипам, когда его применяют по отношению к профилактическим вакцинам широкого спектра действия.

[0127] Полинуклеотиды, кодирующие эписенсусные последовательности, которые продемонстрировали экспрессию в системах временной трансфекции, переносили в каркасы CMV с использованием рекомбинации ВАС с отбором галактокиназой и канамицином. (Warming et al. Nucleic Acids Research. 2005. 33(4):1-12; и Paredes and Yu Curr Protoc Microbiol. 2012. Feb; Chapter 14:Unit14E.4; оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Кроме того, для улучшения

экспрессии эписенсусные последовательности, полученные из белков HBV или белковых доменов, таких как белок кора (С), белок поверхностного антигена (S), домен PreS1, домен PreS2 и белок полимеразы (Р), могут быть переупорядочены относительно порядка, в котором они встречаются в HBV дикого типа, как показано на Фигурах 11А-11В.

5 **[0128]** Рекомбинационная инженерия ВАС упрощает манипулирование большими последовательностями ДНК, используя регулируемые температурой и метаболитами ферменты рекомбинации в контексте штамма SW105 *E. coli*, содержащего исходный ВАС. Рекомбинация представляет собой последовательный двухэтапный процесс, состоящий из
10 этапа 1: вставка последовательности галактокиназы (galK) с геном устойчивости к антибиотику канамицину (kan) в целевой участок, а затем этапа 2: замена кассеты galK/kan на представляющий интерес антиген. Этап 1 приводит к тому, что рекомбинанты содержат вставку galK/kan после положительного отбора в kan, а этап 2 приводит к тому, что рекомбинанты содержат представляющий интерес антиген после отрицательного отбора в 2-дезоксигалактозе (DOG). Для обоих этапов последовательности, подлежащие
15 вставке, амплифицируют с помощью стандартной ПЦР с матричной ДНК, содержащей либо кассету galK/kan, либо представляющий интерес антиген, применяя праймеры с длинными (50+ п.о.) гомологичными плечами к последовательностям HCMV, фланкирующим сайт вставки.

[0129] Для подготовки бактериальных клеток к вставке кассеты galK/kan (этап 1),
20 культуры объемом 5 мл выращивали в течение ночи при 30 °С в 2 х YT или бульоне Terrific с 12,5 мкг/мл хлорамфеникола, и разбавляли 1:50 на следующее утро. Бактерии растили в течение приблизительно 2 - 4 дополнительных часов при 30 °С (до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,5-0,6), а затем подвергали тепловому шоку путем встряхивания при 42 °С в течение 15 минут, чтобы индуцировать ферменты рекомбинации. После такой
25 индукции бактерии осаждали (3000 об/мин, 10 минут, 4 °С), а затем промывали три раза в охлажденной до температуры льда воде. Клетки *E. coli* делали электрокомпетентными, чтобы внедрить в них продукт ПЦР, и компетентными для рекомбинации для вставки последовательности в целевой участок ВАС. Очищенную вставку (300 нг) объединяли с 40 мкл компетентных *E. coli* на льду, переносили в 1 мм кювету и подвергали
30 электропорации, применяя Bio-rad Gene Pulser Xcell. После электропорации бактерии разбавляли путем добавления 5 мл культуральной среды и позволяли им восстановиться путем встряхивания при 30 °С в течение 2 часов перед посевом на чашки с добавлением хлорамфеникола/канамицина. Чашки инкубировали при 30 °С в течение двух дней и

колонии подвергали скринингу путем расщепления рестриктазами и ПЦР для выявления событий рекомбинации.

[0130] ВАС-конструкции, положительные по вставке galK/kan, направляли на второй этап, на котором кассету galK/kan заменяли рекомбинацией с фрагментом ПЦР, содержащим представляющий интерес антиген. Для подготовки бактериальных клеток к замене кассеты galK/kan на этапе 2 бактерии выращивали и подвергали электропорации, как описано выше. Для восстановления путем электропорации бактерии разбавляли добавлением 5 мл культуральной среды и позволяли им восстановиться путем встряхивания при 30°C в течение по меньшей мере 4-4,5 часов. Затем клетки осаждали (3000 об/мин, 10 минут, 4 °C) и промывали три раза 1x средой M9 перед посевом на планшеты с минимальной средой M63 с добавлением глицерина, лейцина, биотина, DOG и хлорамфеникола. Затем колонии подвергали скринингу с помощью ПЦР, чтобы подтвердить замену кассеты galK/kan представляющим интерес антигеном. Положительные клоны повторно наносили штрихом на планшеты DOG и выделяли ДНК ВАС для дальнейшей характеристики путем расщепления рестриктазами и секвенирования.

[0131] Воспроизведение вируса: Для того, чтобы регенерировать вирус, ДНК ВАС переносили в клетки-хозяева млекопитающих, допускающие размножение вирусов. Вкратце, ДНК ВАС очищали с использованием набора ДНК плазмиды без эндотоксинов (Macherey-Nagel) и трансфицировали (16-24 мкг ДНК ВАС/T150) в конфлюэнтную колбу с первичными фибробластами человека, выращенными в DMEM с добавлением 1x глутамакс и 9% FBS при 37°C с 5% CO₂. Трансфекция была достигнута с использованием Lipofectamine 3000 в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). На следующий день среду меняли, а затем клетки ежедневно контролировали на предмет образования бляшек. Как только был достигнут полный цитопатический эффект (CPE), вирусный супернатант собирали, осветляли центрифугированием при 2500 x g в течение 5 мин при комнатной температуре и хранили при -80°C. Остальные присоединенные клетки собирали с помощью скребка для клеток в DPBS, осаждали путем центрифугирования (2500 об/мин, 5 минут) и хранили при -80°C.

[0132] Экспрессия вирусного эписенсусного антигена: Экспрессию эписенсусных антигенов тестировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением ДСН (ДСН-ПААГ) с последующим иммуоблоттингом, разработанным с помощью специфических антител к HBV или с антител к эпитопной метке V5 или

гемагглютини́на (НА), вставленной в каждую конструкцию. Вкратце, осадки клеток лизировали путем ресуспендирования в буфере для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), а белок количественно определяли с использованием стандартного анализа на бицинхониновую кислоту (BCA). Получали NuPAGE 4-12% гели Bis-Tris, загружали на них 20-50 мкг общего белка и подвергали электрофорезу при 110 – 130 Вольтах в течение 90 минут. Разделенные белки переносили на мембраны PVDF путем полусухого или влажного переноса при 30 Вольтах в течение 90 минут или при 15В в течение ночи. Неспецифическое связывание блокировали с помощью раствора 5% обезжиренного сухого молока в трис-буферном солевом растворе с добавлением 0,1% tween-20 (ФБР-Т) в течение 60 минут. Первичные антитела разбавляли в 5% растворе молока и инкубировали с мембранами в течение 1 часа, а затем трижды промывали TBS-T перед добавлением разведенного 1:10000 конъюгированного с пероксидазой хрена вторичного антитела козы против антител мыши в течение 1 часа. Затем блоты промывали три раза в TBS-T, проявляли, используя набор с субстратом для усиленной хемилюминесценции (ECL) (Thermo-Pierce), и визуализировали с помощью цифровой гелевой системы визуализации.

ПРИМЕР 4:

ПОПУЛЯЦИЯ ЭПИСЕНСУСНЫХ ВАКЦИН

[0133] Метод EpiGraph использовали для создания набора вакцин, содержащих полинуклеотиды, кодирующие эписенсусные антигены, применяя изначально векторы CMV, тем не менее, можно применять другие системы доставки вакцины.

[0134] В общей сложности было протестировано 58 стратегий различных эписенсусных антигенов и комбинаций антигенов для определения наиболее полного вакцинного лечения. Образцы HBV из dbHBV были разделены на три группы: образцы из Китая, образцы не из Китая и глобальные образцы. Глобальные образцы состоят из комбинации образцов из Китая и образцов, взятых не из Китая. В качестве контроля использовали вакцины против природного подтипа D и природного подтипа C. Вакцины с одним, двумя или тремя эписенсусными антигенами тестировали против каждой группы.

[0135] Контрольные образцы включали вакцины, содержащие полинуклеотиды, кодирующие последовательность природного подтипа D (SEQ ID NO:12), регистрационный номер GenBank Y07587; и референсную последовательность природного подтипа C (SEQ ID NO:13), регистрационный номер GenBank GQ358158. Затем вакцины, содержащие полинуклеотиды, кодирующие последовательности подтипов

D и C, сравнивали с вакцинами, содержащими полинуклеотиды, кодирующие: (a) 1_CH_eri (SEQ ID NO:1), разработанные с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая; (b) 1_GL_eri (SEQ ID NO:2), разработанные с использованием глобального набора из 3041 последовательности HBV; (c) 2_CH_eri, который содержит два эписенсусных антигена (SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4), разработанные с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая; (d) 2_CHGL_eri, который содержит два эписенсусных антигена – первый эписенсусный антиген, Eri1 (SEQ ID NO:5), который был разработан с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая, и второй эписенсусный антиген, Eri2 (SEQ ID NO:6), который был разработан с использованием глобального набора из 3041 последовательности HBV, причем Eri1 уже зафиксирован в растворе; (e) Eri7 и Eri8 (SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно), которые являются вариантами Eri1 и Eri2, модифицированными для индукции лучшей экспрессии; и (f) 3_GL_eri, который содержит три эписенсусных антигена (SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; и SEQ ID NO:11), разработанных с использованием глобального набора из 3041 последовательностей HBV.

[0136] Как показано на Фигуре 8, вакцина для двух эписенсусных антигенов, которая содержит полинуклеотид, кодирующий первую последовательность, разработанную с использованием образцов из Китая, и вторую последовательность, разработанную с использованием глобального набора, обеспечивает охват ~88% последовательностей из Китая, ~77% последовательностей не из Китая и ~80% глобальных последовательностей.

ПРИМЕР 5:

ОХВАТ ЭПИТОПОВ

[0137] Охват эпитопа HBV для вакцин, содержащих определенные эписенсусные последовательности антигена, был проанализирован с помощью компьютера. Группы для первоначального тестирования вакцины с CMV включали: 1) один эписенсусный антиген в популяции, основной для эпидемического генотипа Китая; 2) один эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват всех глобальных образцов вируса гепатита В; 3) два эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват образцов вируса гепатита В из Китая; 4) два эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват всех глобальных образцов вируса гепатита В; 5) три эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват всех глобальных образцов вируса

гепатита В; и 6) два эписенсусных антигена в популяции: первый эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват образцов вируса гепатита В из Китая, и второй эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват образцов вируса гепатита В из глобального набора.

- 5 **[0138]** Контрольные образцы включали вакцины, содержащие полинуклеотиды, кодирующие последовательность природного подтипа D (SEQ ID NO:12), регистрационный номер GenBank Y07587; и референсную последовательность природного подтипа С (SEQ ID NO:13), регистрационный номер GenBank GQ358158. Затем вакцины, содержащие полинуклеотиды, кодирующие последовательности подтипов
- 10 D и С, сравнивали с вакцинами, содержащими полинуклеотиды, кодирующие: (a) 1_CH_eri (SEQ ID NO:1), разработанные с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая; (b) 1_GL_eri (SEQ ID NO:2), разработанные с использованием глобального набора из 3041 последовательности HBV; (c) 2_CH_eri, который содержит два эписенсусных антигена (SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4), разработанные с использованием
- 15 1044 последовательностей HBV из Китая; (d) 2_CHGL_eri, который содержит два эписенсусных антигена – первый эписенсусный антиген, Epi1 (SEQ ID NO:5), который был разработан с использованием 1044 последовательностей HBV из Китая, и второй эписенсусный антиген, Epi2 (SEQ ID NO:6), который был разработан с использованием глобального набора из 3041 последовательности HBV, причем Epi1 уже зафиксирован в
- 20 растворе; (e) Epi7 и Epi8 (SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно), которые являются вариантами Epi1 и Epi2, модифицированными для индукции лучшей экспрессии; и (f) 3_GL_eri, который содержит три эписенсусных антигена (SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; и SEQ ID NO:11), разработанных с использованием глобального набора из 3041 последовательностей HBV.
- 25 **[0139]** Как видно на Фигурах 9А-10В, вакцина, содержащая 2_CHGL_eri, обеспечивает более 80 процентов точного охвата против последовательностей из Китая, более 75 процентов точного охвата против последовательностей не из Китая и 80 процентов точного охвата последовательностей глобального набора. Эти данные демонстрируют превосходный охват всех последовательностей HBV по сравнению с
- 30 контрольными вакцинами.

ПРИМЕР 6:

ЭПИСЕНСУСНЫЕ АНТИГЕНЫ HBV ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

[0140] Для большинства генотипов HBV N-концевой сборочный домен (NTD) HBV кора (C) участвует в сборке частиц кора, а С-концевой домен участвует в упаковке
5 комплекса прегеном/обратная транскриптаза. Поверхностные (S) белки являются продуктами одной открытой рамки считывания и отличаются тремя доменами: PreS1, PreS2 и S. Белок полимеразы (P) проявляет свойства как ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, так и РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптаза). Р-белок реплицирует геном HBV из инкапсулированной прегеномной матрицы РНК. Р-белок
10 состоит из 4 доменов: (1) домен терминального белка (TP), участвующий в белок-прайминговом механизме через консервативный тирозин; (2) неконсервативный спейсерный домен; (3) домен обратной транскриптазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза (RT) и ДНК-зависимая ДНК-полимераза (активный сайт: YMDD консервативный мотив)); и (4) домен РНКазы Н (активность рибонуклеазы Н).

[0141] Эписенсусные антигены разработали таким образом, чтобы обеспечить
15 хороший охват Т-клеточных эпитопов, типичных для спектра вирусных последовательностей, из которых они были получены. Инфекция, вызванная HBV генотипа D, представляет собой одну из наиболее распространенных инфекций HBV в США и Европе. Терапевтические вакцины, содержащие эписенсусные антигены или
20 нуклеотиды генотипа D (EpiD), кодирующие антигены EpiD, могут быть полезны для пациентов, которые прошли предварительный скрининг на конкретный генотип. В настоящем документе представлены примеры эписенсусного антигена генотипа D HBV (SEQ ID NO: 14), которые обеспечивают хороший охват генотипов HBV в США и Европе. В одном варианте, как показано на Фигуре 11А и 11В, эписенсусные антигены генотипа D
25 HBV, полученные из белка кора (C), доменов PreS1 и PreS2, белка поверхностного антигена (S) и белка полимеразы (P), первоначально использовали в том порядке, в котором они встречаются в геноме HBV: C-S-P ("CSP") (SEQ ID NO: 14), и были переупорядочены как S-P-C ("SPC") (SEQ ID NO: 15). Дополнительные варианты антигена были получены путем применения способа EpiGraph к последовательностям белка HBV, в
30 которых трансмембранные домены 1-2 или 1-4 белка S были удалены ("CSP ΔTM1-2," "CSP ΔTM1-4," "SPC ΔTM1-2," или "SPC ΔTM1-4") для уменьшения агрегации и улучшения экспрессии. Следовательно, эписенсусные антигены HBV также могут быть

получены из последовательностей белка HBV, содержащих один или более из вышеупомянутых вариантов.

[0142] Кроме того, для снижения потенциальной токсичности и повышения безопасности были получены эписенсусные антигены, полученные из вариантов Р-белка с мутациями и/или делецией в активных сайтах домена полимеразы. Примеры таких эписенсусных антигенов приведены, например, в SEQ ID NO: 7, 8 и 15. Мутации, присутствующие в последовательностях, используемых для разработки этих эписенсусных антигенов, представлены в Таблице 1 ниже. Также могут быть использованы другие варианты Р-белка, имеющие различные мутации или делеции.

Таблица 1: Мутационная модификация полимеразы в HBV генотипа D

Положение	Аминокислота(ы)	Модификация
538-541	YMDD	Удалено
689	D	Заменено на A
718	E	Заменено на A
737	D	Заменено на V
777	D	Заменено на A

[0143] Положения в левом столбце таблицы относятся к аминокислотным номерам в полноразмерной полимеразе в HBV генотипа D. Последовательность YMDD представляет собой активный сайт обратной транскриптазы. (См. Radziwill, *et al.*, *J Virol.* 1990 Feb;64(2):613-20, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.) Остальные 4 аминокислоты (D, E, D, D) являются активными сайтами РНКазы H. (См. Tavis *et al.*, *PLoS Pathog.* 2013 Jan;9(1):e1003125, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.)

[0144] Экспрессию эписенсусных антигенов, полученных из этих вариантов последовательностей, тестировали с помощью ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга, как описано выше (Фигуры 11A-11D). Удаление трансмембранных (ТМ) доменов не влияло на экспрессию (Фигура 11D).

[0145] Никакой значительной агрегации не наблюдалось ни с одним из вариантов антигена ЕpiD. Белковый порядок слияния антигена был связан с эффективной экспрессией. Переупорядоченные антигенные слитые белки SPC демонстрируют в значительной степени повышенную экспрессию.

[0146] Эписенсусные антигены HBV могут быть получены из одного или более из следующих белков или доменов белка HBV: корового (С) белка, поверхностного (S)

белка, белка PreS1, белка PreS2, трансмембранных доменов 1-4 (TM1-4) белка S, детерминанты и белка полимеразы (P). Эписенсусные антигены могут быть получены из различных белков HBV и белковых доменов, имеющих делеции или мутации, и/или эписенсусные антигены могут быть переупорядочены относительно их порядка в HBV для улучшения экспрессии или активности. В качестве иллюстрации эписенсусная последовательность, полученная из корового белка подтипа D HBV, представлена в SEQ ID NO:16, эписенсусная последовательность, полученная из белка PreS1 подтипа D HBV, представлена в SEQ ID NO:17, эписенсусная последовательность, полученная из белка PreS2 подтипа D HBV, представлена в SEQ ID NO:18, эписенсусная последовательность, полученная из поверхностного белка (S) подтипа D HBV, представлена в SEQ ID NO:19, эписенсусная последовательность, полученная из белка полимеразы (P) подтипа D HBV, представлена в SEQ ID NO:20 или 22, и эписенсусная последовательность, полученная из белка полимеразы (P) подтипа D HBV, содержащая мутации и делецию, представленные в Таблице 1, представлены в SEQ ID NO:23. Пример эписенсусной последовательности, полученной из поверхностного белка (S) подтипа C HBV, белка полимеразы (P) и корового белка (C), с антигенными последовательностями в порядке «СПС», представлен в SEQ ID NO:24. Примеры эписенсусных последовательностей, полученных из Р-белка, который имеет большую удаленную область, чем показанная в Таблице 1, включают эписенсусную последовательность, полученную из поверхностного белка (S) подтипа C HBV, белка полимеразы (P), имеющего делецию аминокислот 612-838, и белка кора (C), представленного в SEQ ID NO:25; и эписенсусную последовательность, полученную из поверхностного белка (S) подтипа D HBV, белка полимеразы (P), имеющего делецию аминокислот 601-827, и белка кора (C), представленного в SEQ ID NO:26. Обе последовательности SEQ ID NO:25 и 26 переупорядочены, обеспечивая последовательности антигена в порядке «СПС».

[0147] Дополнительные примеры эписенсусных последовательностей, полученных из Р-белка с делециями областей, показаны на Фигуре 12А и включают делеции аминокислот 1-200, 201-400 или 401-600 Р-белка. Данные экспрессии для конструкций, показанных на Фигуре 12А, показаны на Фигуре 12В.

[0148] Дополнительные примеры последовательностей эпизодов, полученных из корового белка HBV, представлены в SEQ ID NO:27, 28 и 34. Дополнительные примеры эписенсусных последовательностей, полученных из поверхностного белка HBV, представлены в SEQ ID NO:29. Дополнительные примеры эписенсусных

последовательностей, полученных из белка полимеразы HBV, представлены в SEQ ID NO:30-32 и SEQ ID NO:35-36.

[0149] Последовательности белков HBV и белковых доменов могут быть определены для любого подтипа HBV путем выравнивания последовательностей с последовательностями, описанными в настоящем документе. Например, полная геномная последовательность природного подтипа D HBV представлена в последовательности с регистрационным номером GenBank Y07587 (полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки). Р-белок кодируется нуклеотидами 1-1625 и 2309-3182 референсного гена GenBank Y07587. Белок PreS кодируется нуклеотидами 1-837 и 2850-3182 референсного гена GenBank Y07587. S-домен кодируется нуклеотидами 157-837 референсного гена GenBank Y07587. Белок PreC/C кодируется нуклеотидами 1816-2454 референсного гена GenBank Y07587. Белок С кодируется нуклеотидами 1903-2451 референсного гена GenBank Y07587. Кроме того, полная геномная последовательность природного подтипа С HBV представлена в GQ358158 (полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки). Р-белок кодируется нуклеотидами 1-1623 и 2307-3215 референсного гена GQ358158 GenBank. Белок S кодируется нуклеотидами 1-835 и 2848-3215 референсного гена GQ358158 GenBank. Белок PreC/C кодируется нуклеотидами 1814-2452 референсного гена GQ358158 GenBank. Белок С кодируется нуклеотидами 1901-2452 референсного гена GQ358158 GenBank.

ПРИМЕР 7:

ТЕСТИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ

[0150] Вакцины, содержащие сконструированные с помощью компьютера эпигенетические антигены, тестировали на макаках-резус (RM). Ожидают, что ответы Т-клеток на CMV будут гораздо обширнее и, следовательно, будут покрывать гораздо больший процент последовательностей, чем описано ранее для других векторов. Таким образом, даже при относительно небольшом количестве животных, должны наблюдаться достаточные ответы на эпитоп для того, чтобы оценить влияние изменения последовательности на возможность вступать в перекрестные реакции в рамках данных ответов. Количество и величину всех ответов на вакцины определяли, применяя совпадающие с вакциной наборы пептидов. После того, как определили целевые пептиды, применяя только такие пептиды, которые положительны у каждого животного, определяли влияние природной изменчивости на каждый вызывающий ответ на вакцину

пептид. Природные варианты, которые исследовали, были выбраны на основании вариантов, обнаруженных в исходной панели. Непараметрические и вычислительные статистические способы с повторной выборкой использовали в качестве первичного способа оценки влияния изменчивости эпитопа на уменьшение величины или

прекращение узнавания. Данные анализы, тем не менее, дополняются применением обобщенных линейных моделей, при необходимости, чтобы исследовать влияние более сложных взаимодействий на возможность перекрестного ответа Т-клеток.

[0151] Группы для первоначального тестирования вакцины с CMV включали векторы, кодирующие: 1) один эписенсусный антиген в популяции, основной для эпидемического генотипа Китая; 2) один эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват всех глобальных образцов HBV; 3) два эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват образцов HBV из Китая; 4) два эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват всех глобальных образцов HBV; 5) три эписенсусных антигена в популяции, которые обеспечивают охват всех глобальных образцов HBV; и 6) два эписенсусных антигена в популяции: первый эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват образцов HBV из Китая, и второй эписенсусный антиген в популяции, который обеспечивает охват образцов HBV из глобального набора, 7) эписенсусный антиген, полученный с использованием усеченной последовательности Pol, которая обеспечивает охват эпитопов подтипа С HBV (SEQ ID NO: 25), и 8) эписенсусный антиген, полученный с использованием усеченной последовательности Pol, которая обеспечивает охват эпитопов подтипа D HBV (SEQ ID NO: 26). Контрольные образцы включали вакцины, содержащие полинуклеотиды, кодирующие последовательность природного подтипа D (SEQ ID NO: 12), регистрационный номер GenBank Y07587; и референсную последовательность природного подтипа С (SEQ ID NO: 13), регистрационный номер GenBank GQ358158.

[0152] До десяти когорт из 5 макак-резус (RM) инокулировали посредством 10^6 PFU векторов HCMV следующим образом: до восьми когорт - каждая получала одну из вакцин 1-8, перечисленных выше; одна когорта получала вакцину, содержащую полинуклеотид, кодирующий природный подтип D; и одна когорта получала вакцину, содержащую полинуклеотид, кодирующий природный подтип С. Когорта 3 получала эписенсусный антиген плюс другой вектор индивидуализированной вакцины, а когорта 4 получала эписенсусный антиген плюс оба вектора индивидуализированной вакцины.

[0153] Макак-резус (RM) инокулировали подкожно в день 0 и в неделю 12 и прослеживали в долгосрочном исследовании в течение одного года. Поскольку на вакцинацию векторами HCMV не влияет уже существующий иммунитет к RhCMV, то для данных экспериментов использовали животных, которые были естественным образом инфицированы RhCMV. Анализ внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии (ICS) использовали для определения ответа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на отдельные последовательные 15-мерные пептиды, содержащие последовательности вакцины внутри вставок вакцины, которые вводили каждому животному (который будет представлять собой совокупный вызванный вакциной ответ). Затем определили, распознают ли данные специфические к эпитопу Т-клетки варианты эпитопа как в целевом штамме, так и в нецелевых штаммах. Для пептидов, для которых выявили ответы на специфические для штамма эпитопы, сравнивали величину, функциональную avidность и функциональные особенности (продукцию IFN- γ , TNF- α , IL-2 и MIP-1 β и экстернализацию CD107) данных ответов на “исходные” (последовательности вставки вакцины) варианты пептида, чтобы определить степень функциональной способности вступать в перекрестные реакции. В выбранных случаях использовали анализ укорачивания, чтобы определить основной эпитоп для сходного сравнительного анализа. Для того, чтобы определить процент присутствующих ограниченных MHC-II CD8⁺ Т-клеток, “блокирующие” МАТ, специфические к MHC-I и MHC-II, и полученный из инвариантной цепи специфический к MHC-II связывающий пептид CLIP использовали для ингибирования специфических для гриппа ответов CD8⁺ Т-клеток в PBMC.

[0154] Хотя конкретные варианты реализации изобретения были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что различные варианты реализации изобретения, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов реализации изобретения, и что различные изменения могут быть внесены в них без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

[0155] Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и непатентные публикации, указанные в описании и/или перечисленные в паспорте заявки, включая предварительную заявку на патент США № 62/893546, поданную 29 августа 2019 г., и предварительную заявку на патент США № 62/941125, поданную 27 ноября 2019 г., включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, если явно не указано иное. Аспекты вариантов реализации изобретения могут быть модифицированы, при необходимости, для

использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов реализации изобретения.

[0156] Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты реализации изобретения в свете приведенного выше подробного описания. В целом, в следующей

- 5 формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами реализации изобретения, раскрытыми в описании и формуле изобретения, а должны толковаться как включающие все возможные варианты реализации изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые такая формула изобретения имеет право. Соответственно,
- 10 формула изобретения не ограничена настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-11 или SEQ ID NO:14-36.
2. Полипептид, содержащий две или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:16-36.
3. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19 или 29, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, 21, 27, 28 или 34, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, 22, 23, 30, 31, 35 или 36.
4. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.
5. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6.
6. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8.
7. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11.
8. Полипептид по п. 3, дополнительно содержащий одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:17 и 18.

9. Вектор на основе цитомегаловируса (CMV), содержащий полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1-36.

10. Вектор на основе CMV по п. 9, отличающийся тем, что вектор на основе CMV представляет собой вектор на основе CMV человека (HCMV) или вектор на основе CMV макаки-резус (RhCMV).

11. Вектор на основе CMV по п. 9 или п. 10, отличающийся тем, что в векторе на основе CMV отсутствует ген UL82.

12. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что вектор на основе CMV не содержит область гена UL128-UL130 и не содержит область гена UL146-UL147.

13. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что вектор на основе CMV имеет интактную область гена UL128-UL130 и интактную область гена UL146-UL147.

14. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат одну или более из SEQ ID NO:1-11, SEQ ID NO:14-15 и SEQ ID NO:24-26.

15. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат одну или более из SEQ ID NO:16-23 и SEQ ID NO:27-36.

16. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат две или более из SEQ ID NO:16-23 и SEQ ID NO:27-36.

17. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат:

- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO:19 или 29;
- b) последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:16, 21, 27, 28 или 34; и
- c) последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:20, 22, 23, 30, 31, 33, 35 или 36.

18. Вектор на основе CMV по п. 17, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей дополнительно содержат одну или более из SEQ ID NO:17 и 18.

19. Вектор на основе CMV по любому из пп. 15-18, отличающийся тем, что последовательности, кодируемые полинуклеотидом, упорядочены для улучшения экспрессии.

20. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат:

- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO:3; и
- b) последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

21. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат:

- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO:5; и
- b) последовательность, представленную в SEQ ID NO:6.

22. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат:

- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO:7; и
- b) последовательность, представленную в SEQ ID NO:8.

23. Вектор на основе CMV по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что одна или более аминокислотных последовательностей содержат:
- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO:9;
 - b) последовательность, представленную в SEQ ID NO:10; и
 - c) последовательность, представленную в SEQ ID NO:11.
24. Композиция, содержащая два или более векторов на основе CMV по любому из пп. 9-23.
25. Вакцина против вируса гепатита В (HBV), содержащая один или более полипептидов по любому из пп. 1-8.
26. Вакцина против вируса гепатита В (HBV), содержащая вектор на основе CMV и полинуклеотид, кодирующий один или более эписенсусных антигенов HBV.
27. Вакцина по п. 26, отличающаяся тем, что вектор на основе CMV представляет собой вектор на основе CMV человека (HCMV) или вектор на основе CMV макака-резус (RhCMV).
28. Вакцина по п. 26 или 27, отличающаяся тем, что в векторе на основе CMV отсутствует ген UL82.
29. Вакцина по п. 28, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий один или более эписенсусных антигенов HBV, заменяет ген UL82.
30. Вакцина по любому из пп. 26-29, отличающаяся тем, что в векторе на основе CMV отсутствует область гена UL128-UL130 и отсутствует область гена UL146-UL147.
31. Вакцина по любому из пп. 26-29, отличающаяся тем, что вектор на основе CMV имеет интактную область гена UL128-UL130 и интактную область гена UL146-UL147.

32. Вакцина по любому из пп. 26-31, отличающаяся тем, что полинуклеотид кодирует два или более эписенсусных антигенов HBV.
33. Вакцина по любому из пп. 26 - 31, отличающаяся тем, что один или более эписенсусных антигенов содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-36.
34. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1.
35. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2.
36. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3.
37. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.
38. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5.
39. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6.
40. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7.
41. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8.
42. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9.

43. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10.
44. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11.
45. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14.
46. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15.
47. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что указанный эписенсусный антиген содержит одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-23 и SEQ ID NO: 27-36.
48. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24.
49. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:25.
50. Вакцина по п. 33, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:26.
51. Вакцина по любому из пп. 26-50, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит одну или более эписенсусных последовательностей, полученных из одного или более из белка С, белка S или белка Р.
52. Вакцина по п. 51, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит эписенсусные последовательности, полученные из белка С, белка S и консервативной области белка Р.

53. Вакцина по п. 51 или 52, отличающаяся тем, что эписенсусные последовательности, полученные из белка С, белка S и белка Р упорядочены для улучшения экспрессии.

54. Вакцина по любому из пп. 51-52, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген дополнительно содержит эписенсусные последовательности, полученные из одного или более из домена PreS1, домена PreS2 и неконсервативной области белка Р.

55. Вакцина по любому из пп. 26-54, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна белковая последовательность, из которой получен эписенсусный антиген, содержит одну или более мутаций.

56. Вакцина по п. 55, отличающаяся тем, что мутация представляет собой делецию или замену.

57. Вакцина по п. 55, отличающаяся тем, что мутация представляет собой мутацию Р-белка, представленную в Таблице 1.

58. Вакцина по любому из пп. 26-57, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит две или более эписенсусных последовательностей.

59. Вакцина по п. 58, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит две эписенсусные последовательности, разработанные с использованием последовательностей HBV из Китая.

60. Вакцина по п. 59, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4.

61. Вакцина по п. 58, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит эписенсусную последовательность, разработанную с использованием

последовательностей HBV из Китая, и эписенсусную последовательность, разработанную с использованием последовательностей HBV из глобального набора.

62. Вакцина по п. 61, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

63. Вакцина по п. 61, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

64. Вакцина по п. 58, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит три эписенсусные последовательности, разработанные с использованием последовательностей HBV из глобального набора.

65. Вакцина по п. 64, отличающаяся тем, что эписенсусный антиген содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

66. Вакцина против HBV, содержащая:

- a) один или более эписенсусных антигенов HBV;
- b) один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более эписенсусных антигенов HBV; или
- c) один или более векторов, содержащих один или более полинуклеотидов, при этом один или более полинуклеотидов кодируют один или более эписенсусных антигенов HBV.

67. Вакцина по п. 66, отличающаяся тем, что вакцина содержит:

- a) два или более эписенсусных антигенов HBV;
- b) два или более полинуклеотидов, кодирующих один или более эписенсусных антигенов HBV; или

с) два или более векторов, содержащих один или более полинуклеотидов, при этом один или более полинуклеотидов кодируют один или более эписенсусных антигенов HBV.

68. Композиция, содержащая две или более вакцин против HBV по любому из пп. 26-67.

69. Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что первая вакцина против HBV кодирует или содержит первый эписенсусный антиген, разработанный с использованием образцов HBV из Китая, и вторая вакцина против HBV кодирует или содержит второй эписенсусный антиген, разработанный с использованием образцов HBV из Китая.

70. Композиция по п. 69, отличающаяся тем, что первый эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, а второй эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

71. Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что первая вакцина против HBV кодирует или содержит первый эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из Китая, и вторая вакцина против HBV кодирует или содержит второй эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из глобального набора.

72. Композиция по п. 71, отличающаяся тем, что первый эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, а второй эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6.

73. Композиция по п. 71, отличающаяся тем, что первый эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, а второй эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8.

74. Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что первая вакцина против HBV кодирует или содержит первый эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из глобального набора, вторая вакцина против HBV кодирует или содержит второй эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из глобального набора, и третья вакцина против HBV кодирует или содержит третий эписенсусный антиген, разработанный с использованием последовательностей HBV из глобального набора.

75. Композиция по п. 74, отличающаяся тем, что первый эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, второй эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, и третий эписенсусный антиген содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11.

76. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для последовательностей HBV из Азии.

77. Вакцина или композиция по п. 76, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для последовательностей HBV из Китая.

78. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для последовательностей HBV из США.

79. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для последовательностей HBV из Европы.

80. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для последовательностей HBV из США и Европы.

81. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для глобального набора последовательностей HBV.

82. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа А HBV.

83. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа В HBV.

84. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа С HBV.

85. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа СВ HBV.

86. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа D HBV.

87. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа DC HBV.

88. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа DE HBV.

89. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа E HBV.

90. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для эпидемического генотипа F HBV.

91. Вакцина по любому из пп. 26-67 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что по меньшей мере один эписенсусный антиген является основным для генотипа HBV, отличного от генотипа A, B, C, CB, D, DC, DE, E и F.

92. Вакцина по любому из пп. 26-67 и 76-91 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что указанная вакцина представляет собой профилактическую вакцину.

93. Вакцина по любому из пп. 26-67 и 76-91 или композиция по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что указанная вакцина представляет собой терапевтическую вакцину.

94. Вакцина по любому из пп. 26-67 и 76-91 или композиция по любому из пп. 68-75, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

95. Способ лечения HBV у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 нуждающемуся в этом субъекту.

96. Способ защиты субъекта от инфекции HBV, включающий введение эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 нуждающемуся в этом субъекту.

97. Способ выработки или индукции иммунного ответа на HBV у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 нуждающемуся в этом субъекту.

98. Полипептид по любому из пп. 1-8, вектор по любому из пп. 9-23, вакцина по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиция по любому из пп. 24 или 68-75 для применения для лечения HBV.

99. Полипептид по любому из пп. 1-8, вектор по любому из пп. 9-23, вакцина по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиция по любому из пп. 24 или 68-75 для применения для защиты субъекта от инфекции HBV.

100. Полипептид по любому из пп. 1-8, вектор по любому из пп. 9-23, вакцина по любому из пп. 25-67 или 76-94 или композиция по любому из пп. 24 или 68-75 для применения для выработки или индукции иммунного ответа на HBV у субъекта.

101. Применение полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 и 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 для изготовления лекарственного средства для применения для лечения HBV.

102. Применение полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 и 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 для изготовления лекарственного средства для применения для защиты субъекта от инфекции HBV.

103. Применение полипептида по любому из пп. 1-8, вектора по любому из пп. 9-23, вакцины по любому из пп. 25-67 и 76-94 или композиции по любому из пп. 24 или 68-75 для изготовления лекарственного средства для применения для выработки или индукции иммунного ответа на HBV у субъекта.

104. Способ разработки и получения вакцины против HBV для субъекта в географической области, включающий:

(a) разработку одного или более эписенсусных антигенов, которые эффективно охватывают разнообразие генотипов HBV в пределах этой географической области; и

b) получение одного из:
вакцины против HBV, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую эписенсусные антигены; или
вакцины против HBV, содержащей эписенсусные антигены.

105. Способ разработки и получения вакцины против HBV для субъекта, включающий:

(a) определение аминокислотной последовательности вирусов HBV у субъекта;

(b) разработку одного или более эписенсусных антигенов для эффективного охвата разнообразия генотипа HBV в вирусах, присутствующих у субъекта; и

c) получение одного из:
вакцины против HBV, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую эписенсусные антигены; или
вакцины против HBV, содержащей эписенсусные антигены.

106. Способ индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти, включающий:

(a) разработку одного или более эписенсусных антигенов;
(b) получение вакцины, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более эписенсусных антигенов; и

(c) введение указанной вакцины нуждающемуся в этом субъекту.

107. Способ лечения инфекции HBV у субъекта, включающий:

(a) получение иммуногенной композиции, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более эписенсусных антигенов; и

(b) введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту.

108. Способ предотвращения инфекции HBV у субъекта, включающий:

(a) получение иммуногенной композиции, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более эписенсусных антигенов; и

(b) введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту.

109. Способ индукции иммунного ответа на HBV у субъекта, включающий:

(a) получение иммуногенной композиции, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более эписенсусных антигенов; и

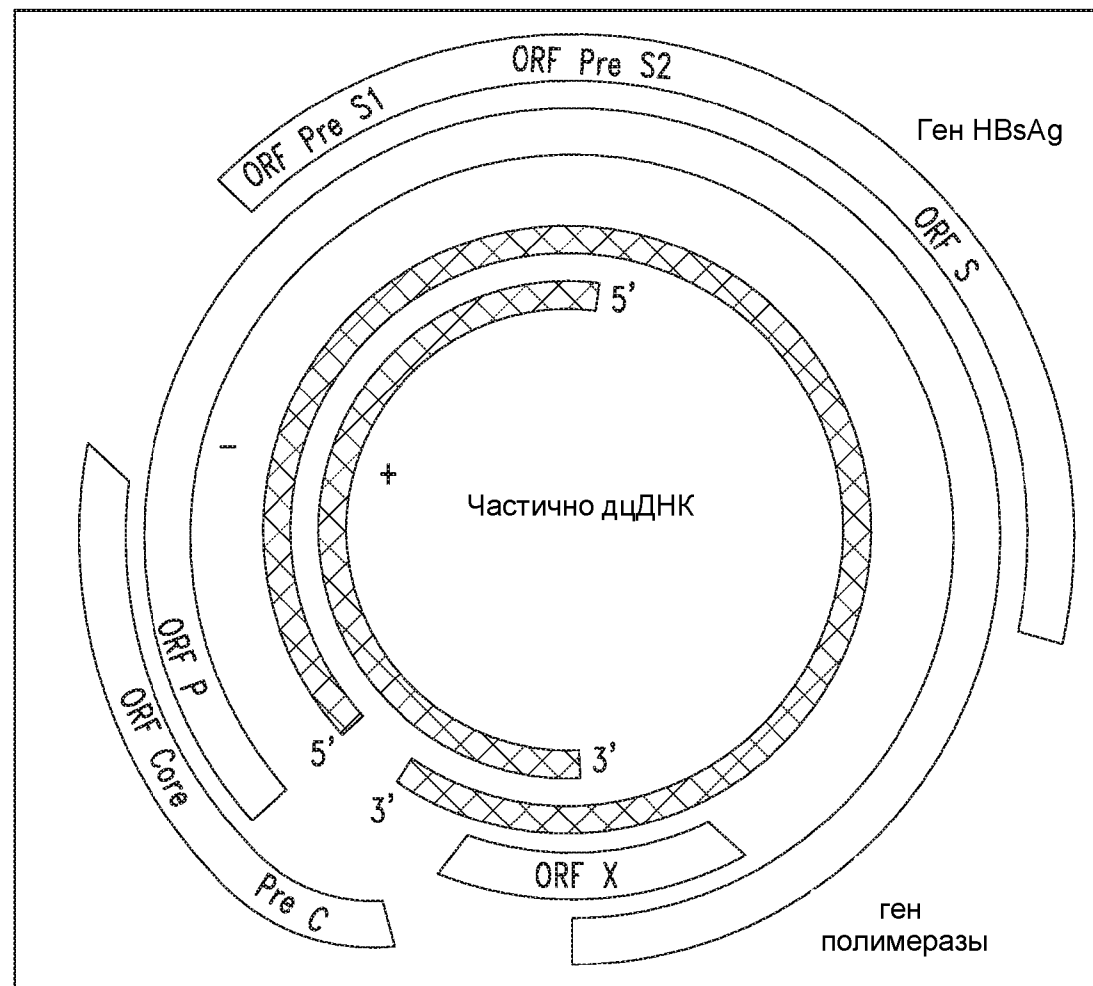
(b) введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту.

110. Способ индукции ответа эффекторных Т-клеток памяти у субъекта, включающий:

(a) получение иммуногенной композиции, содержащей каркас CMV и нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более эписенсусных антигенов; и

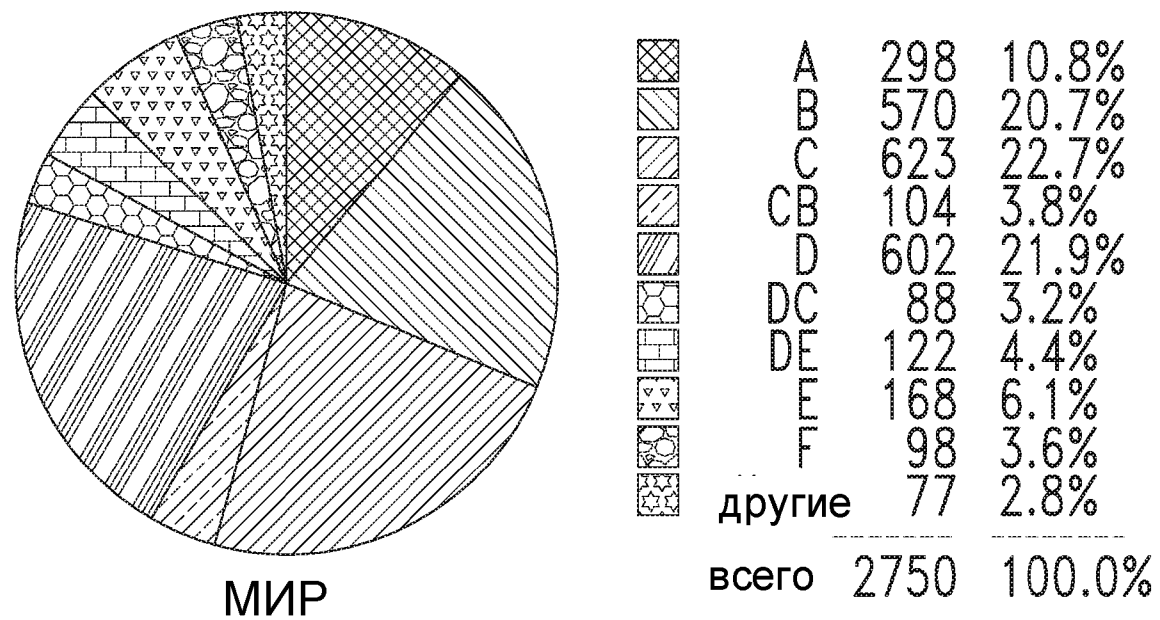
(b) введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту.

111. Способ по любому из пп. 104-110, отличающийся тем, что один или более эписенсусных антигенов содержат одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-11, SEQ ID NO:14-36.



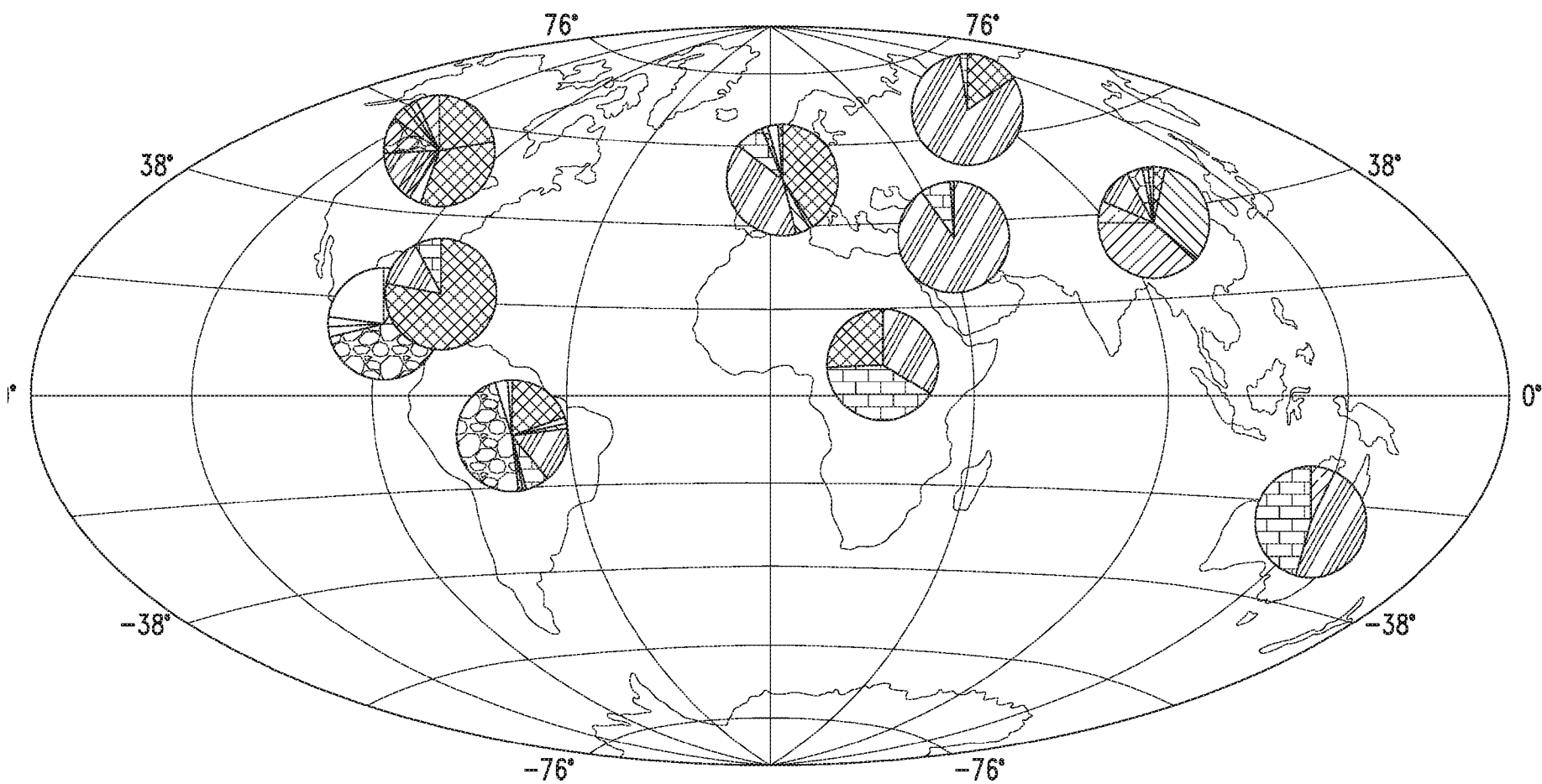
ФИГ. 1

2/24



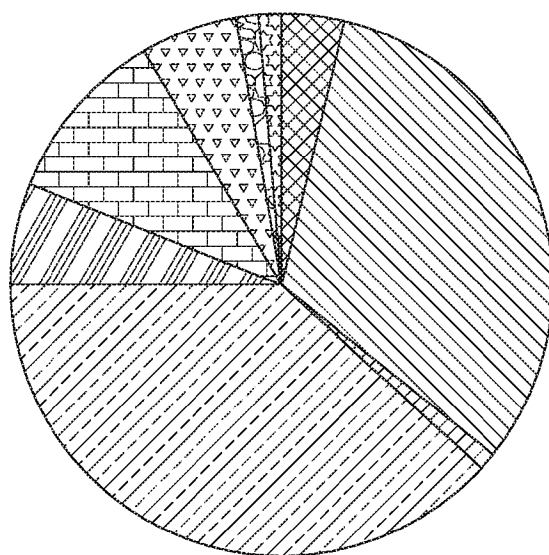
ФИГ. 2А

3/24



ФИГ. 2В

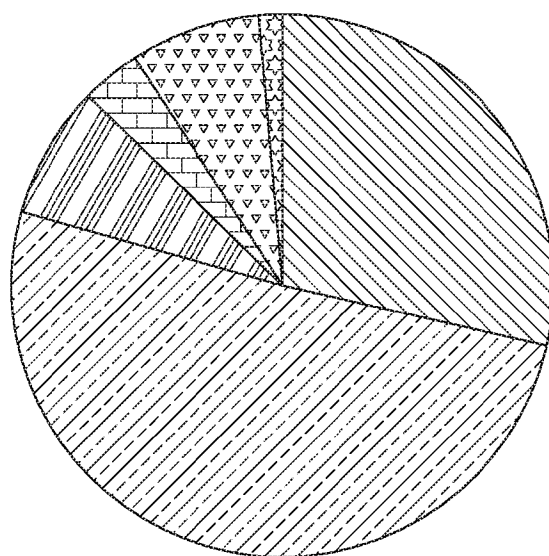
4/24



АЗИЯ

	A	55	3.4%
	B	536	32.8%
	BC	14	0.9%
	C	620	37.9%
	CB	104	6.4%
	D	175	10.7%
	DC	87	5.3%
	DE	22	1.3%
	другие	22	1.3%

всего	1635	100.0%
-------	------	--------



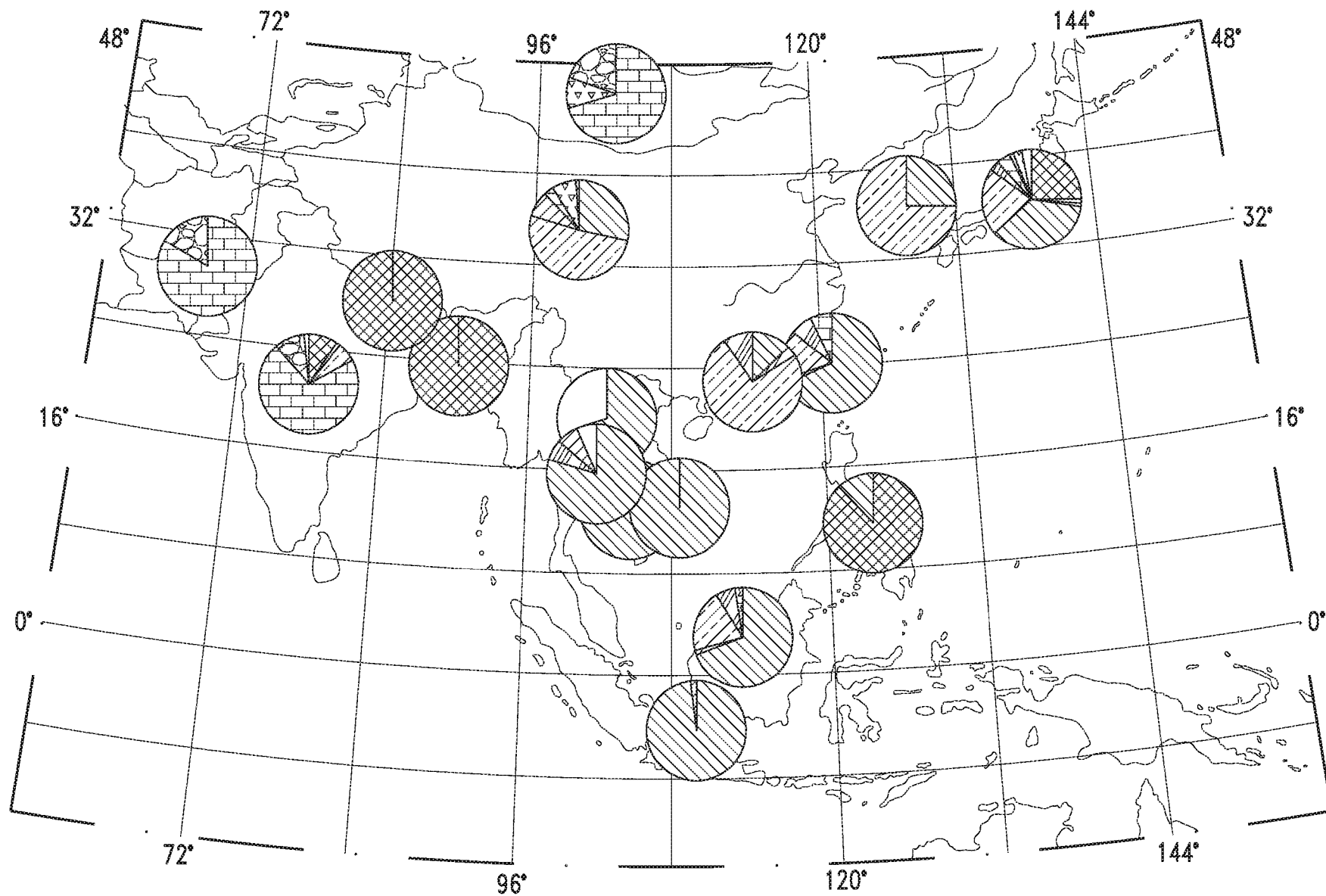
КИТАЙ

	B	298	28.5%
	C	528	50.6%
	CB	85	8.1%
	D	35	3.4%
	DC	86	8.2%
	другие	12	1.1%

всего	1044	100.0%
-------	------	--------

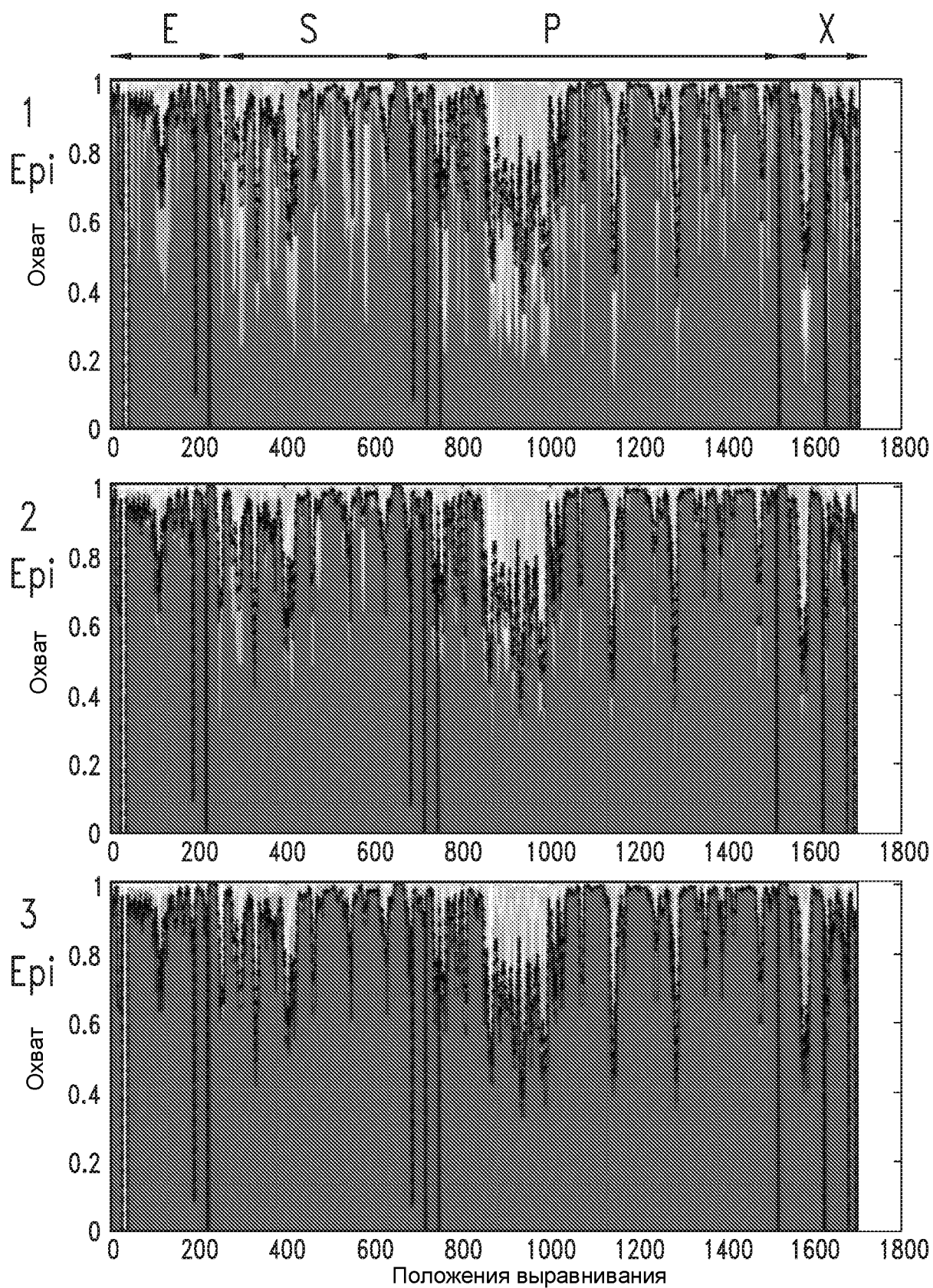
ФИГ. 3А

5/24



ФИГ. 3В

6/24



Положения выравнивания (ранжировано по охвату)

всего 9-меров

точное совпадение

до 7/9 совпадений

Верхн. граница: 3 антигена

xxxxxx

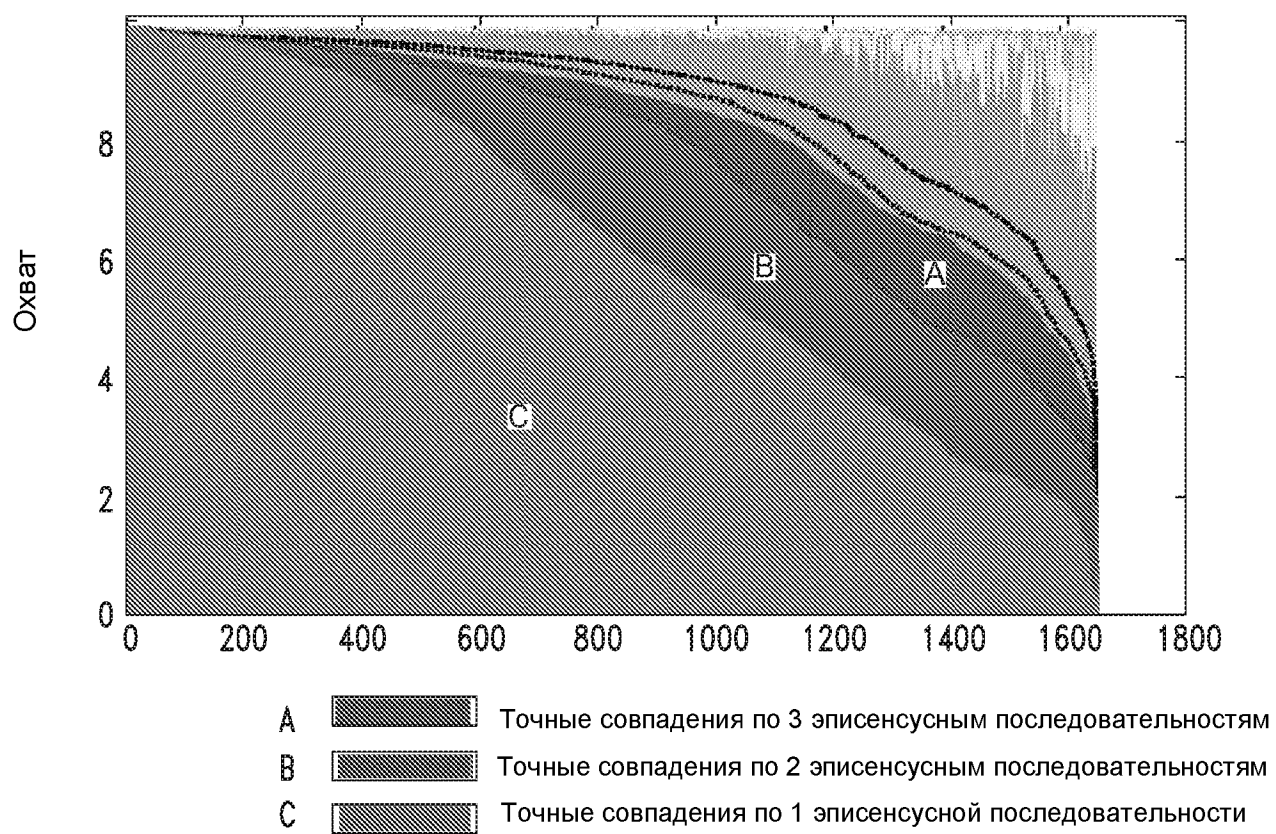
до 8/9 совпадений

Верхн. граница: 4 антигена

xxxxxxxx

ФИГ. 4А

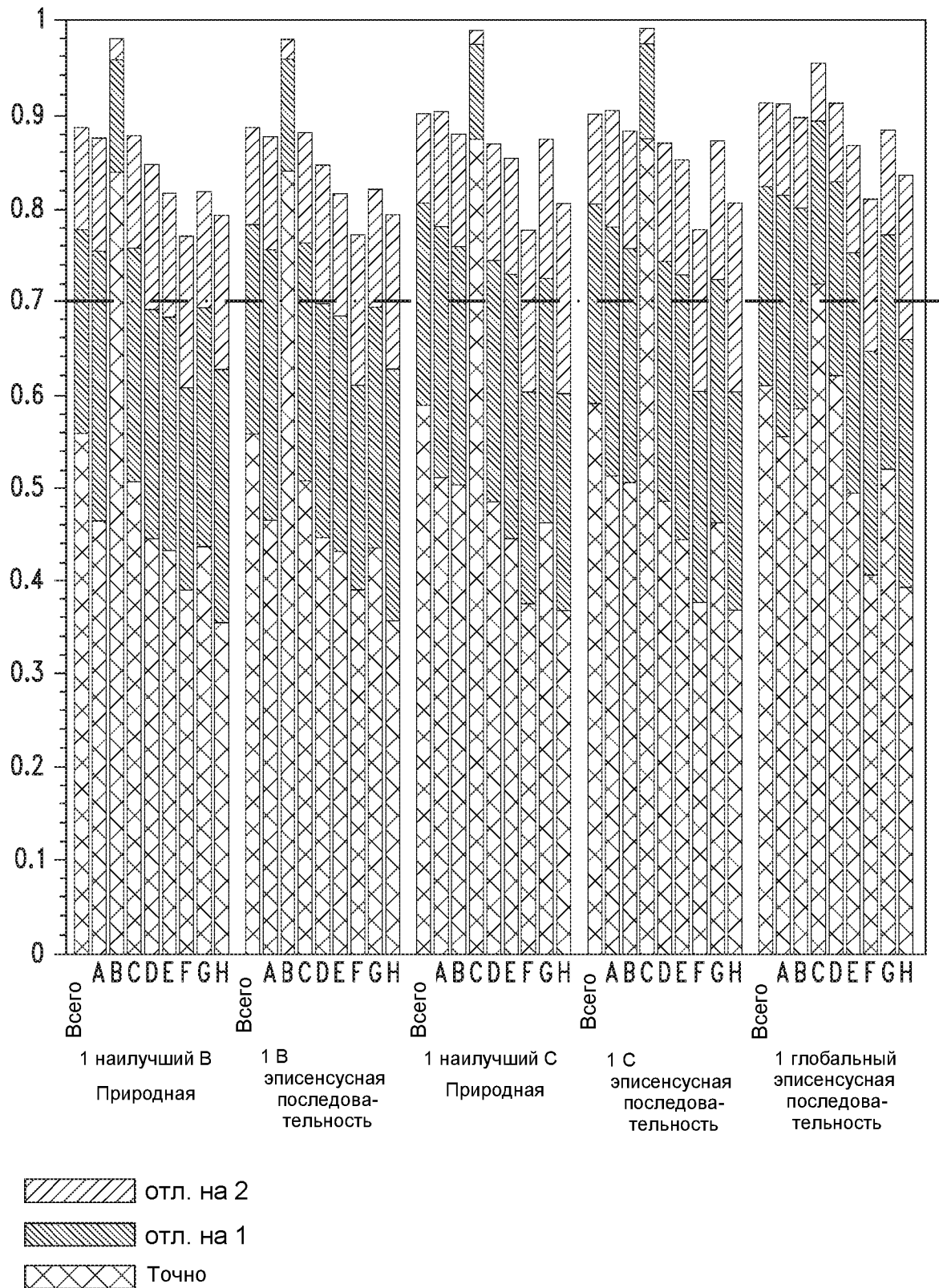
7/24



ФИГ. 4В

8/24

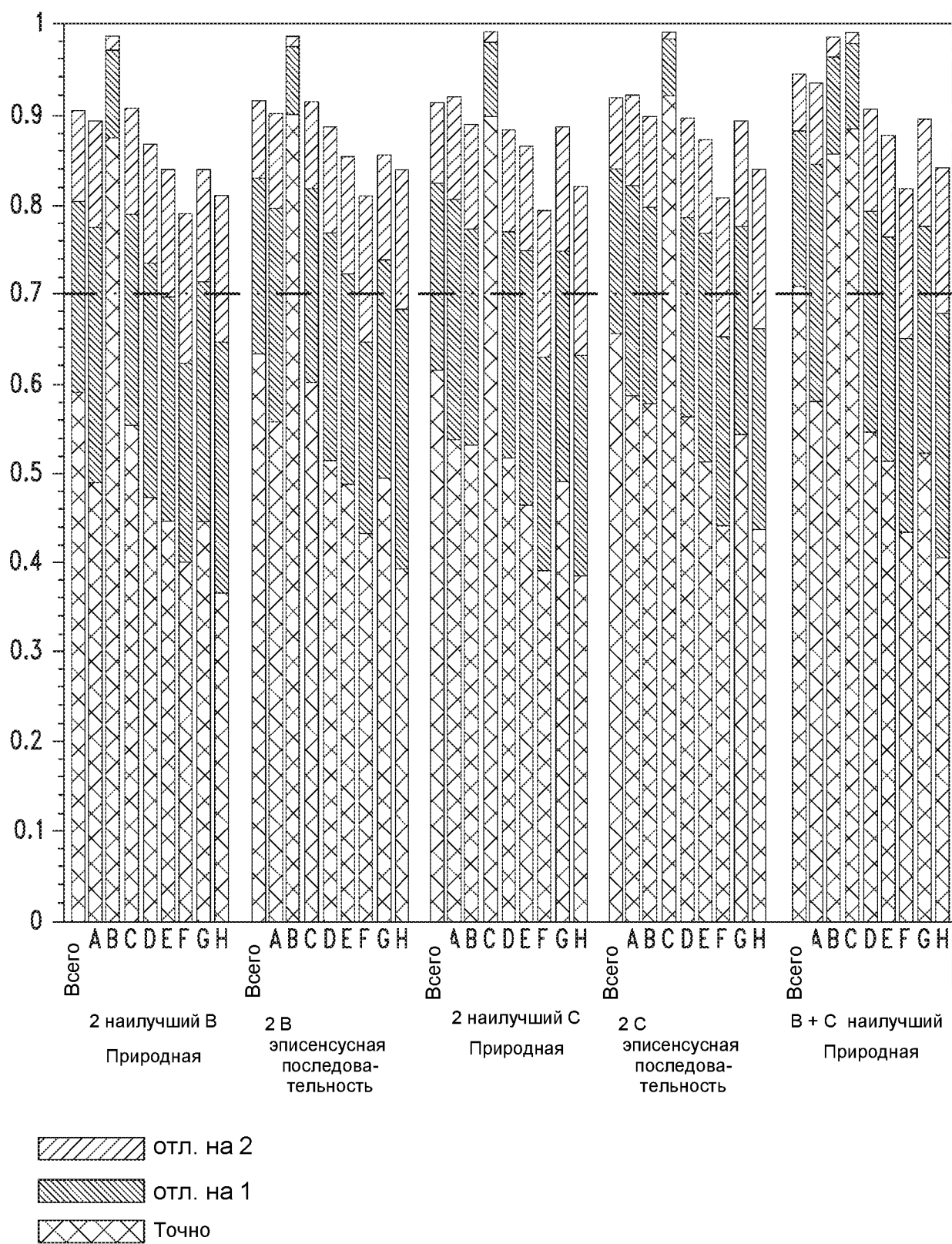
1 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ



ФИГ. 5А

9/24

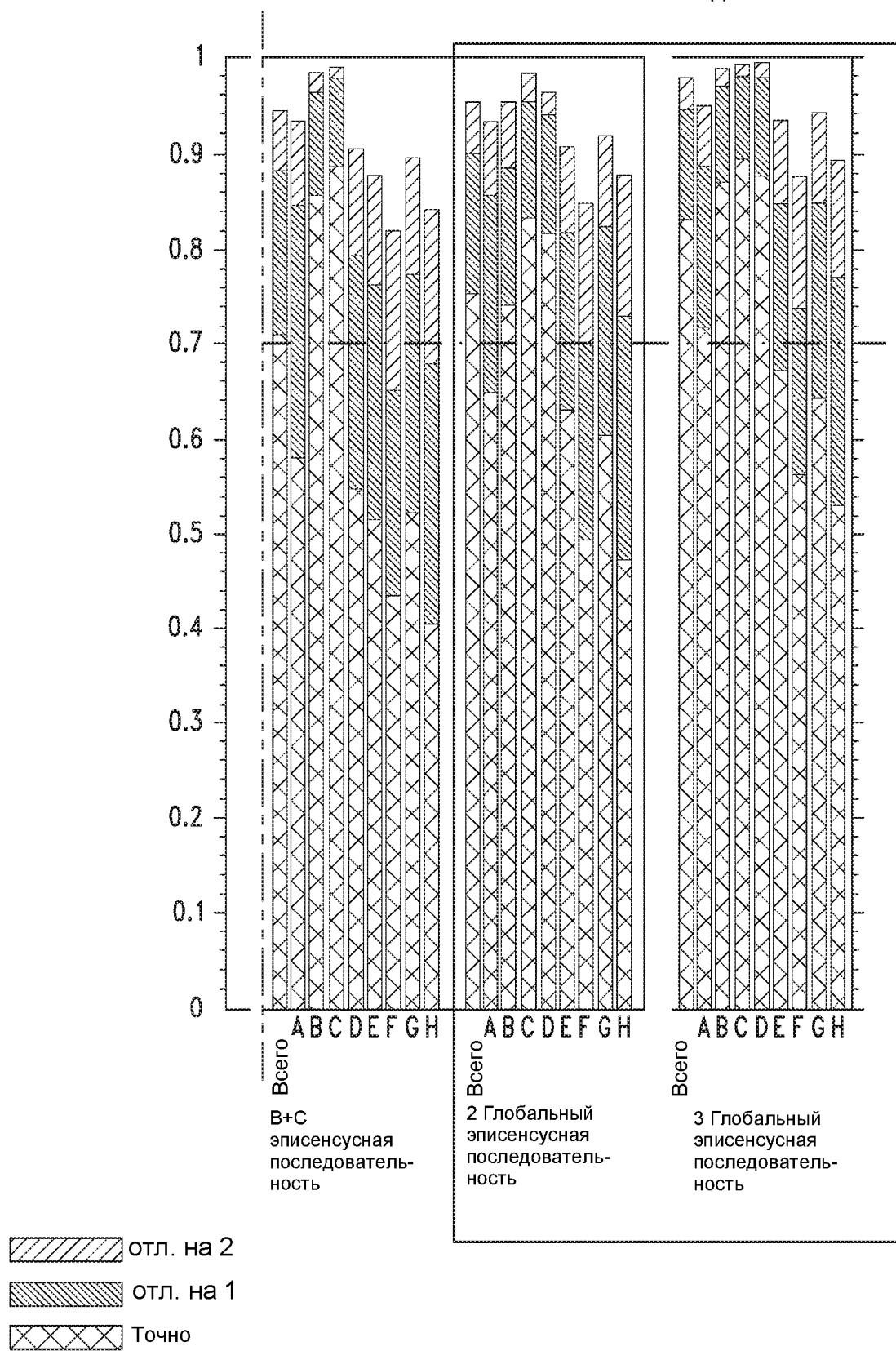
2 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ



ФИГ. 5В

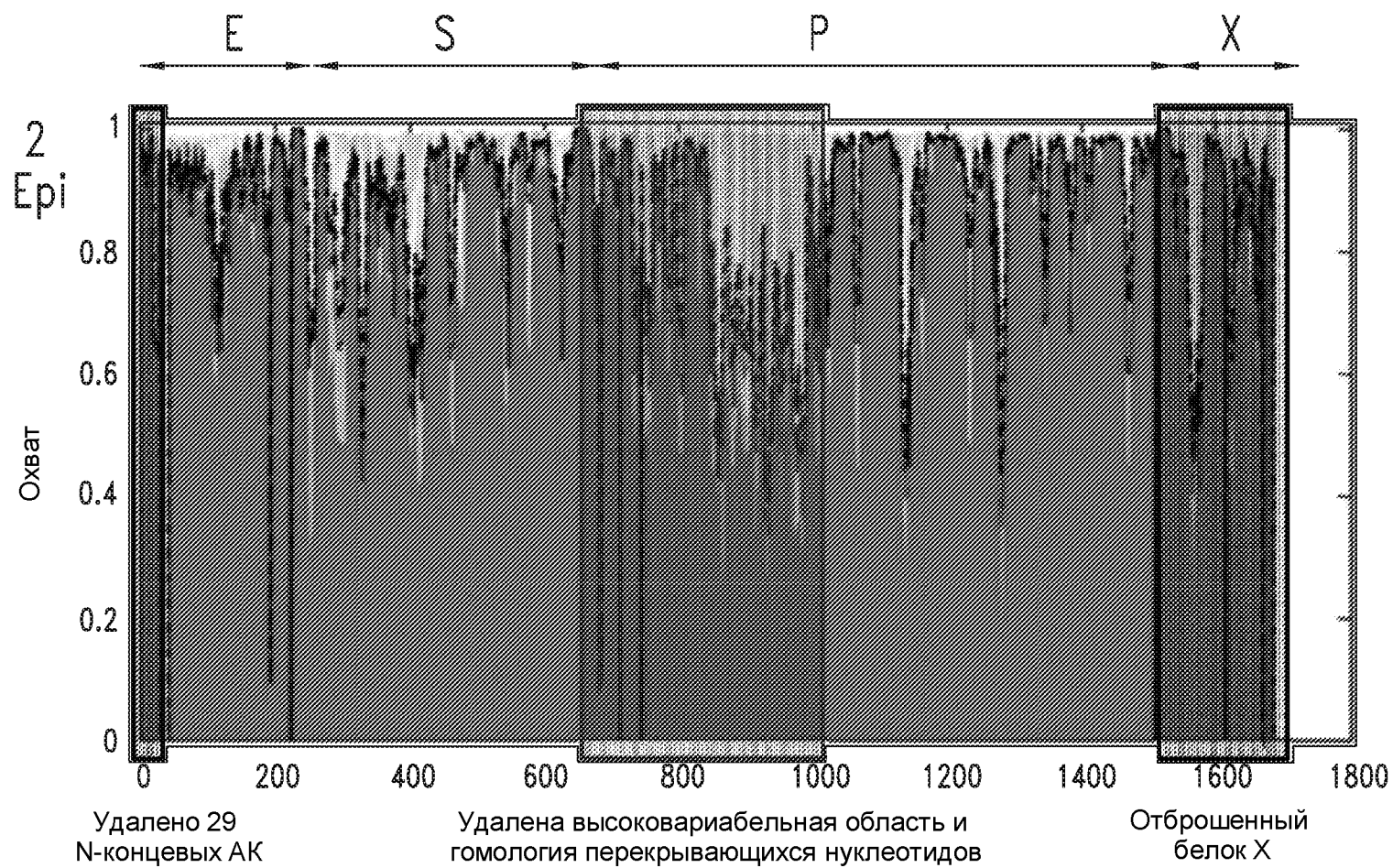
10/24

3 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ



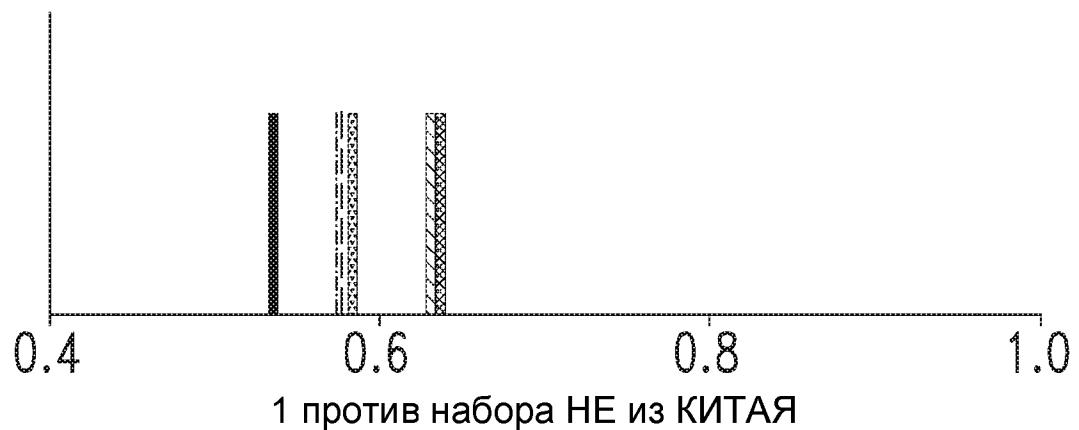
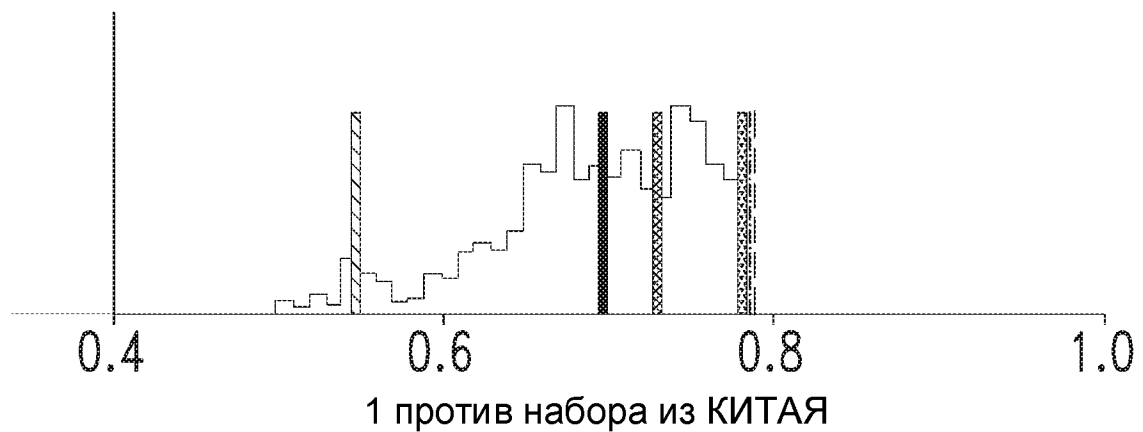
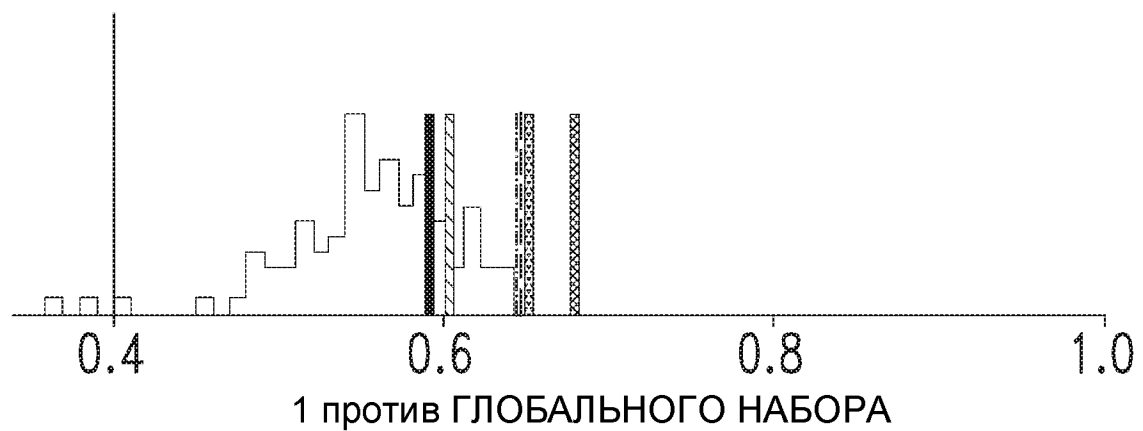
ФИГ. 5С

11/24



ФИГ. 6

12/24



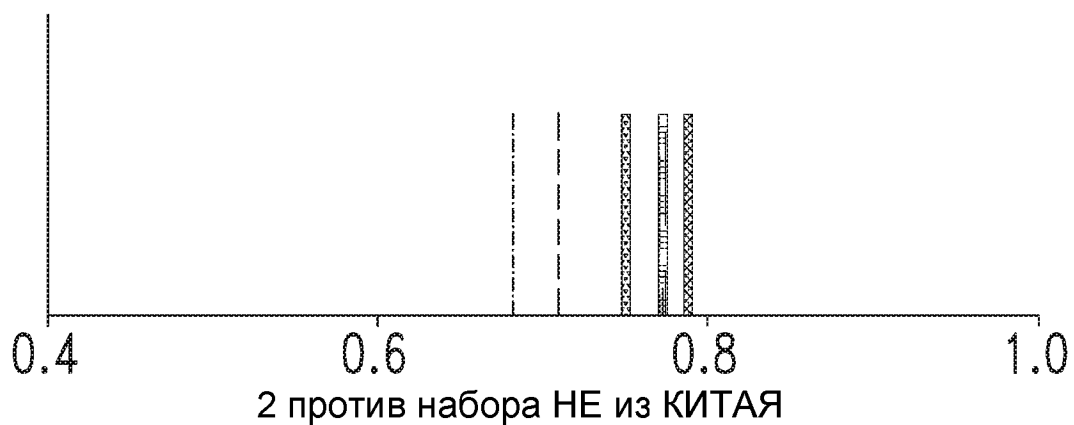
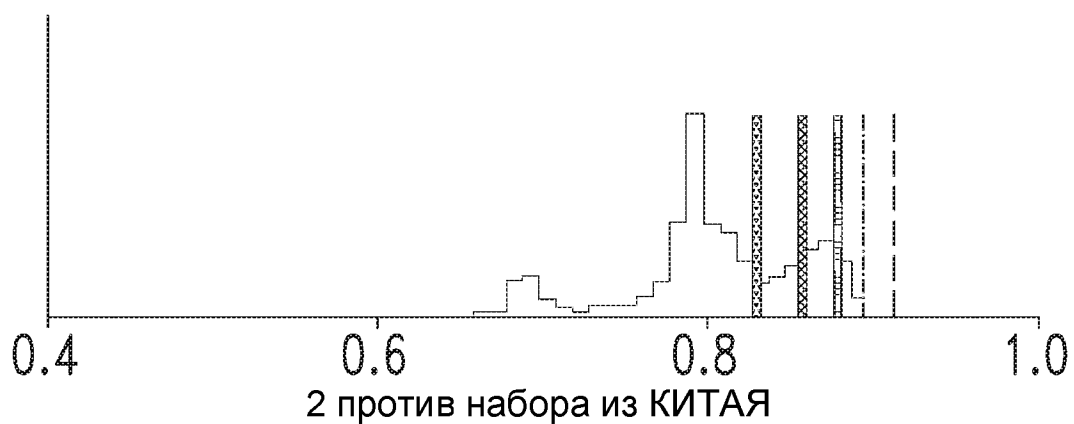
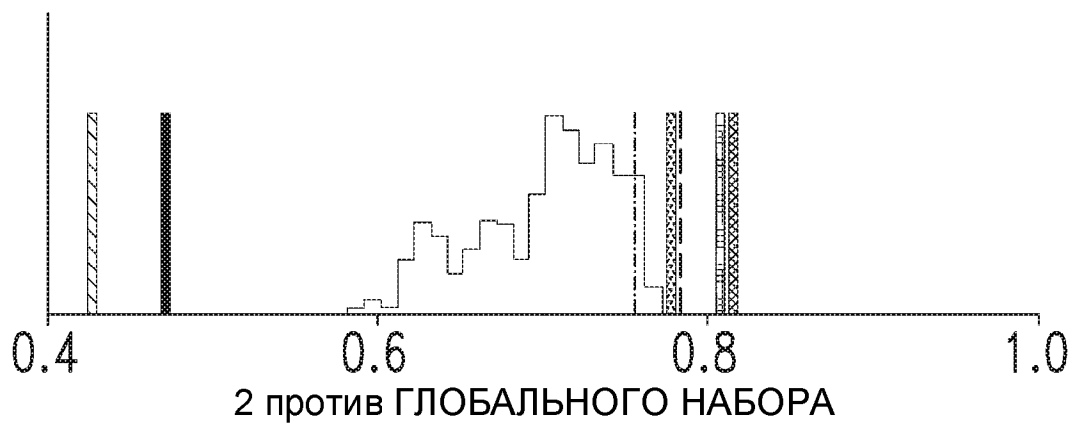
- Dvac Вакцина генотипа D
- Cref Референсный штамм генотипа С
- CHn Наилучш. природн. послед. из Китая
- Che эписенс. последоват. из Китая
- GLn наилучш. глобал. природн. послед.
- Gle Глобалн. эписенс. последоват.
- 2CHGLe

Гистограммы:

Охват PTE
На 1000 случайно
Выбранные природные
штаммы

ФИГ. 7А

13/24



- Dvac Вакцина генотипа D
- Cref Референсный штамм генотипа C
- CHn Наилучш. природн. послед. из Китая
- Che эписенс. последоват. из Китая
- GLn наилучш. глобал. природн. послед.
- Gle Глобал. эписенс. последоват.
- ZCHGLE

Гистограммы:

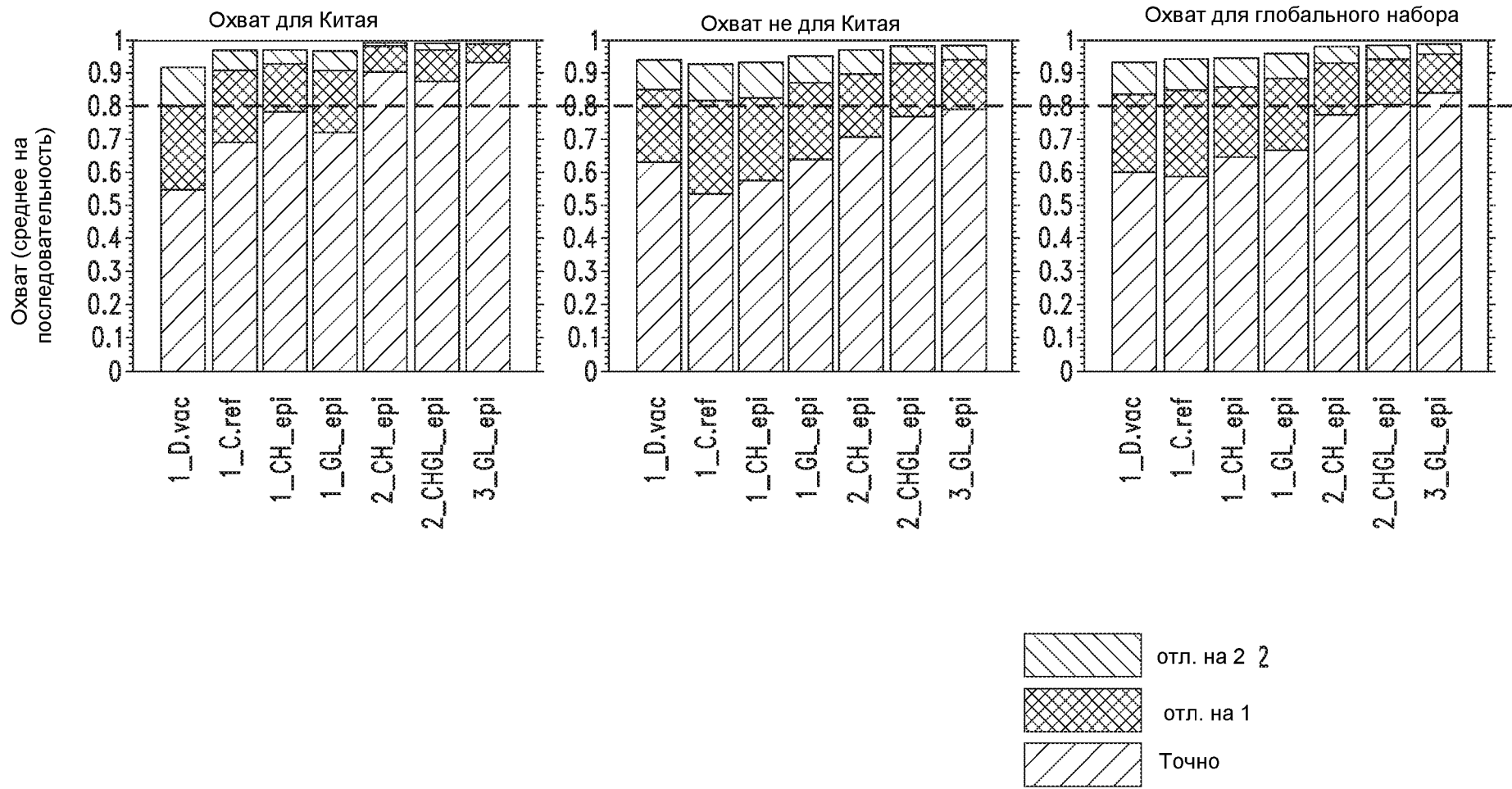
Охват PTE
На 1000 случайно
Выбранные природные
штаммы

ФИГ. 7B

14/24

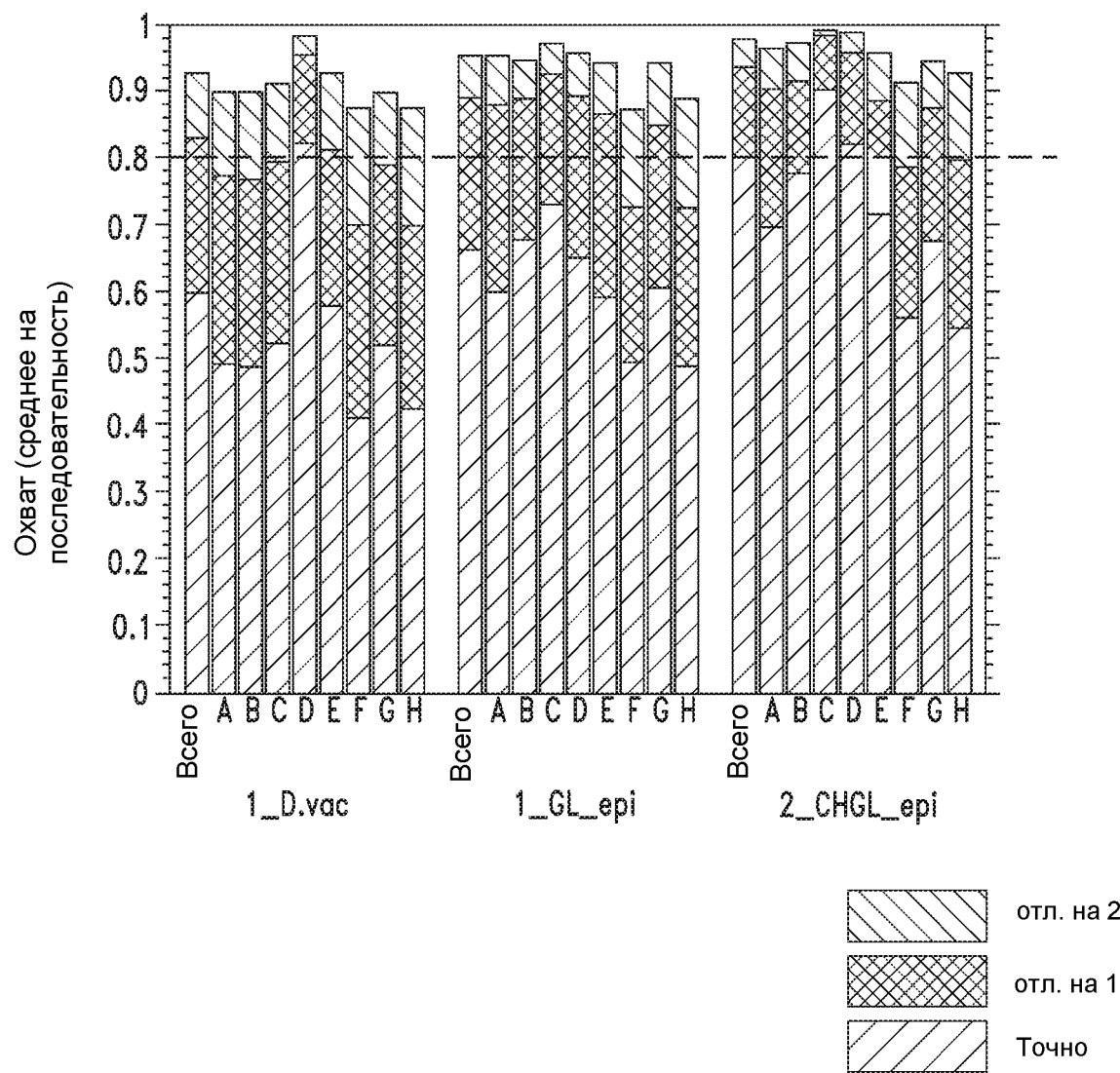
		Вакцина	Параметры	Из Китая				Не из Китая				Глобальный			
				Из Ки- тая	loff	Наибол. редкая	Кол-во редких	Точно	loff	Наибол. редкая	Кол-во редких	Точно	loff	Наиб. редкая	Кол-во редких
	1	D. вакцина (Y07587)		0.548	0.809	0	9	0.633	0.853	1	9	0.603	0.837	1	9
	1	C. вакцина (GQ358158)		0.696	0.913	0	9	0.536	0.820	1	23	0.591	0.852	1	5
	1	1_China_Nat	1 Наилучш. природная последоват. из Китая	0.786	0.929	177	1	0.576	0.825	42	1	0.649	0.861	219	1
E1	1	1_China_Epi	1; редк. 20; выровн. 1: первая из 2 китайских	0.788	0.931	215	1	0.577	0.827	97	1	0.650	0.863	320	1
	1	1_China_Nat	1 Наилучш. природн. последоват. из глоб. набора	0.781	0.927	7	1	0.583	0.828	19	2	0.652	0.823	27	2
C1	1	1_Global_Epi	1; редк. 70; 1 off 1, aligned_1; первая из 2 глобальных	0.731	0.926	6	2	0.637	0.883	51	2	0.679	0.898	100	1
	2	2_China_Nat	1 Наилучш. природная последоват. из Китая	0.894	0.984	2	9	0.681	0.897	0	9	0.755	0.927	2	9
E	2	2_China_Epi	1; редк. 20; выровн.	0.911	0.985	21	3	0.709	0.901	3	3	0.779	0.930	27	3
	2	2_China_Nat	1 Наилучш. природн. последоват. из глоб. набора	0.829	0.956	0	9	0.749	0.823	1	9	0.777	0.935	1	9
A	2	2_China_Epi	1; редк. 70	0.857	0.963	0	9	0.787	0.938	47	3	0.811	0.947	75	3
H	2	2_ChinaGlobal_Epi (перв. эписенс., оптимизир. по геномным посл. Китая и втор. эписенс., оптимизир по глоб. когорте	10110; редк. 70; фиксированная китайская; выровн.	0.879	0.971	0	9	0.772	0.930	47	3	0.809	0.944	75	3
D	3	3_China_Epi	10110; редк. 15	0.924	0.992	0	65	0.848	0.961	2	1	0.875	0.971	16	10

ФИГ. 8



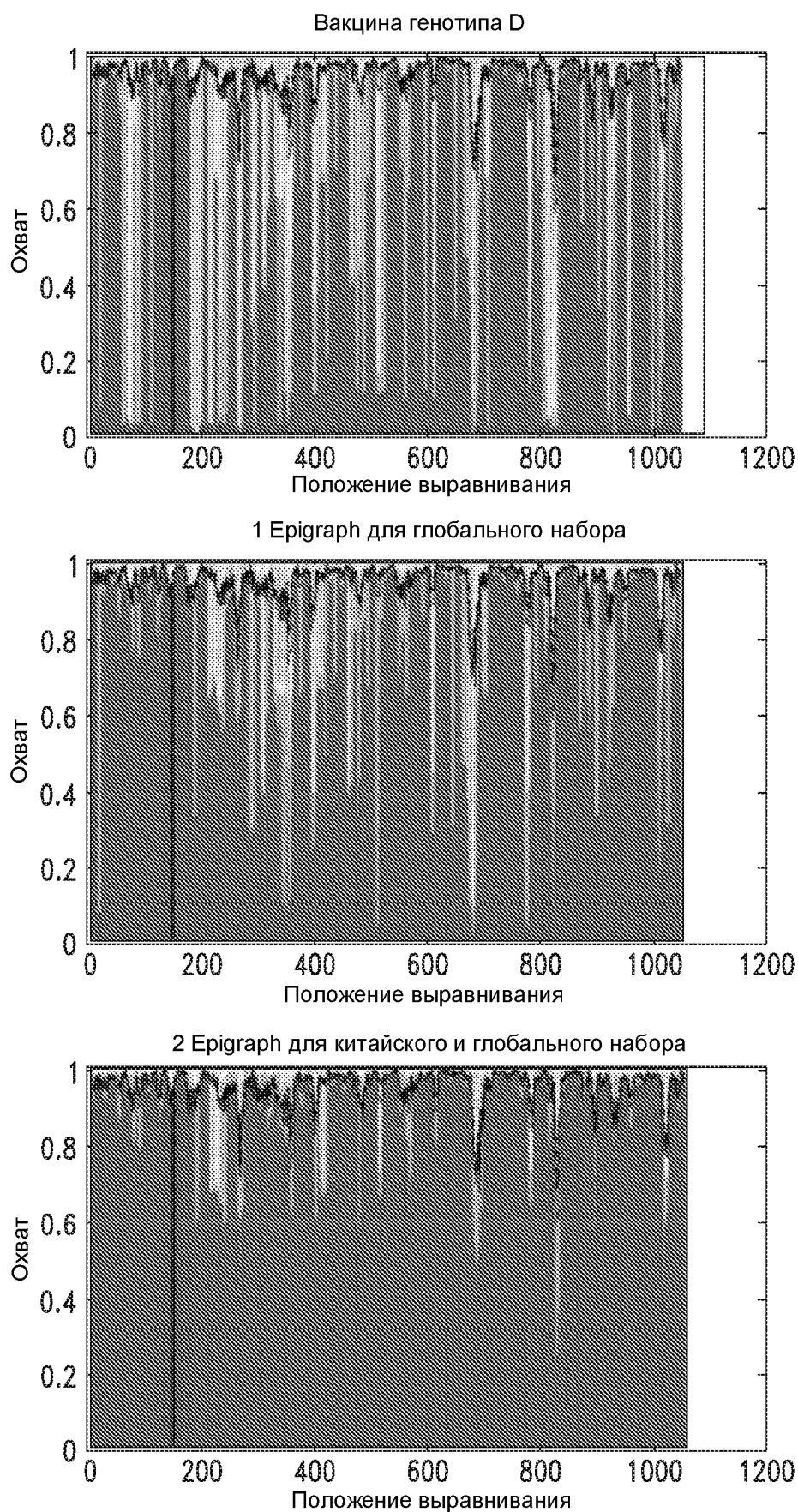
ФИГ. 9А

16/24



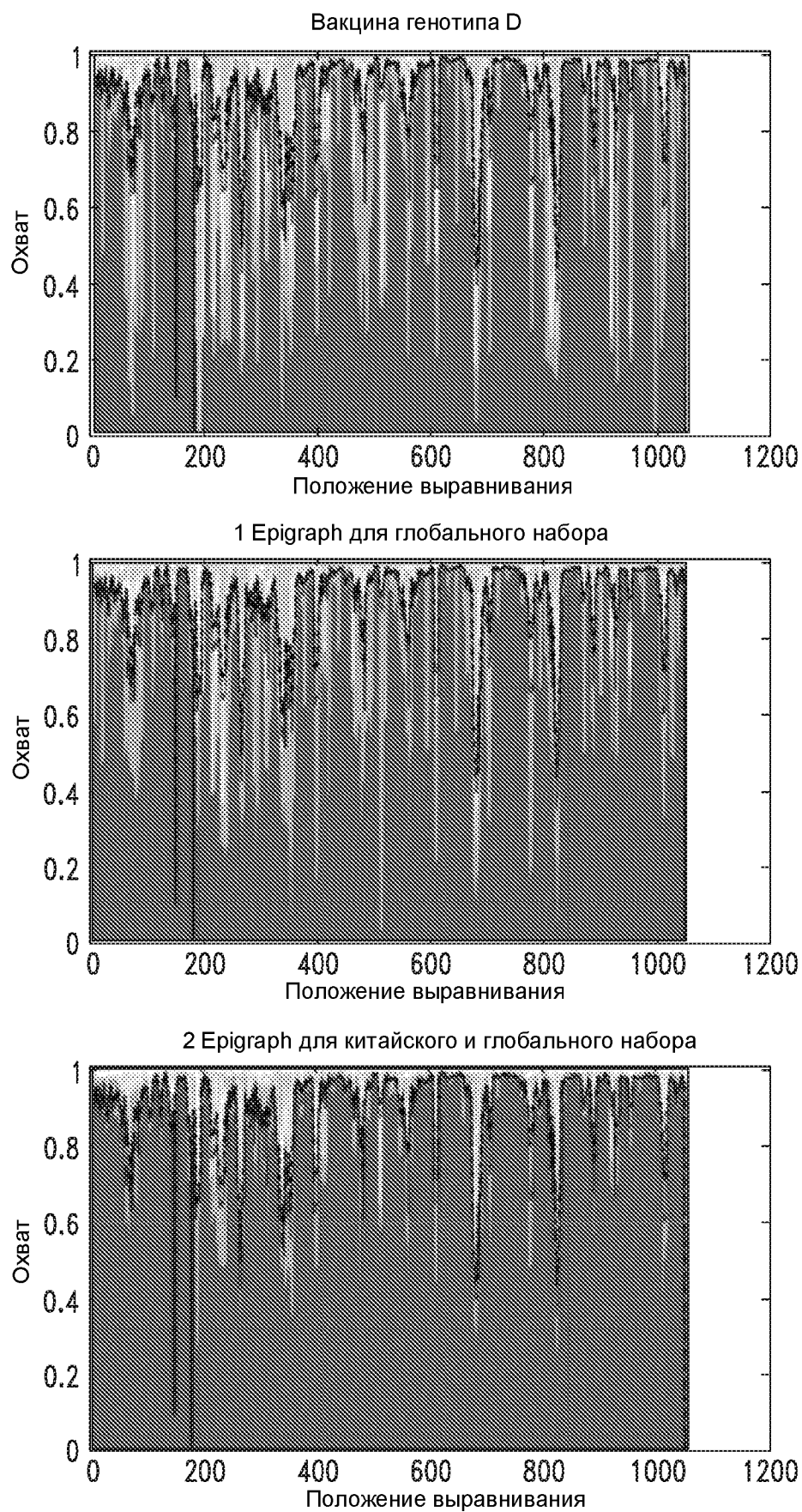
ФИГ. 9В

17/24

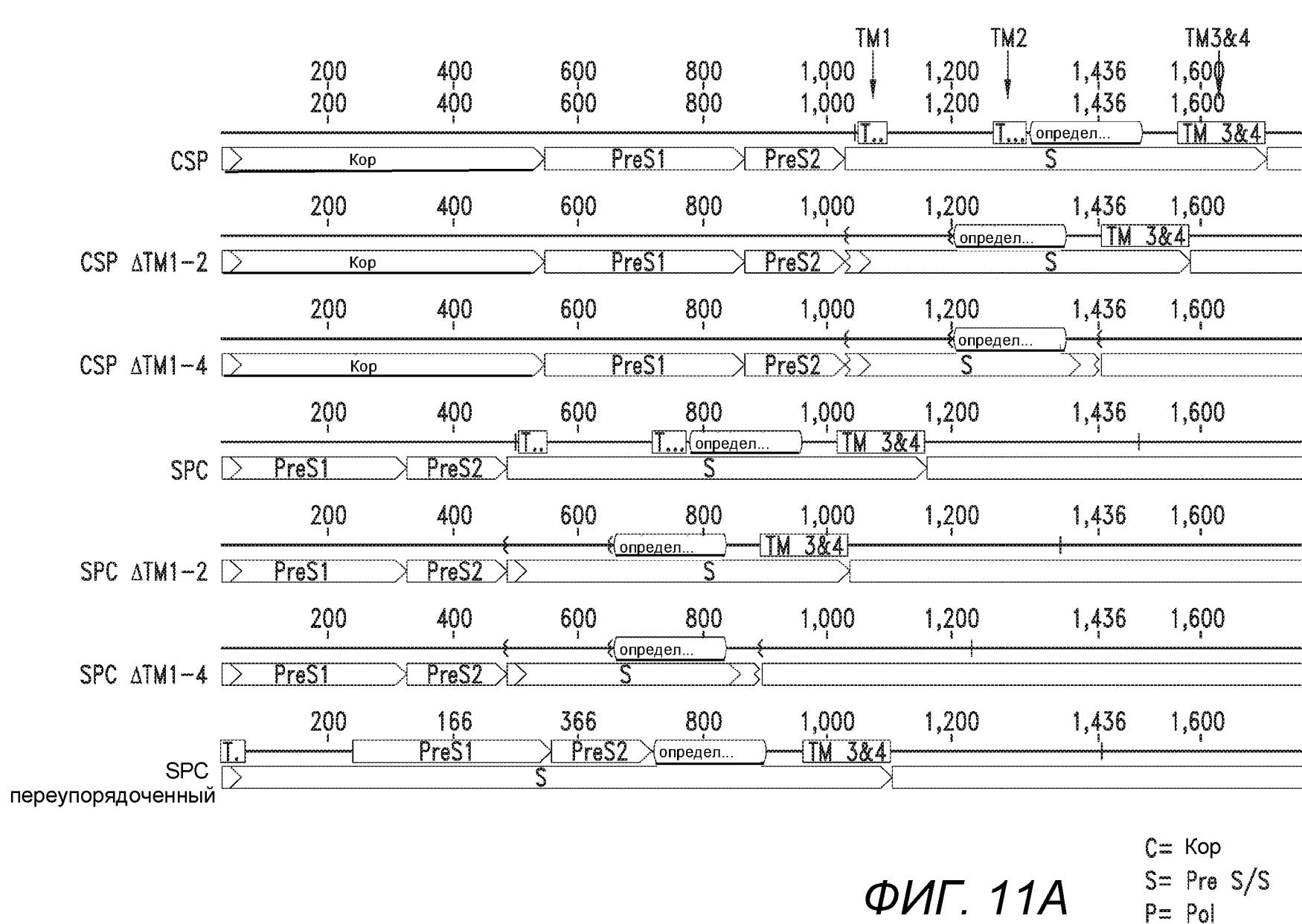


ФИГ. 10А

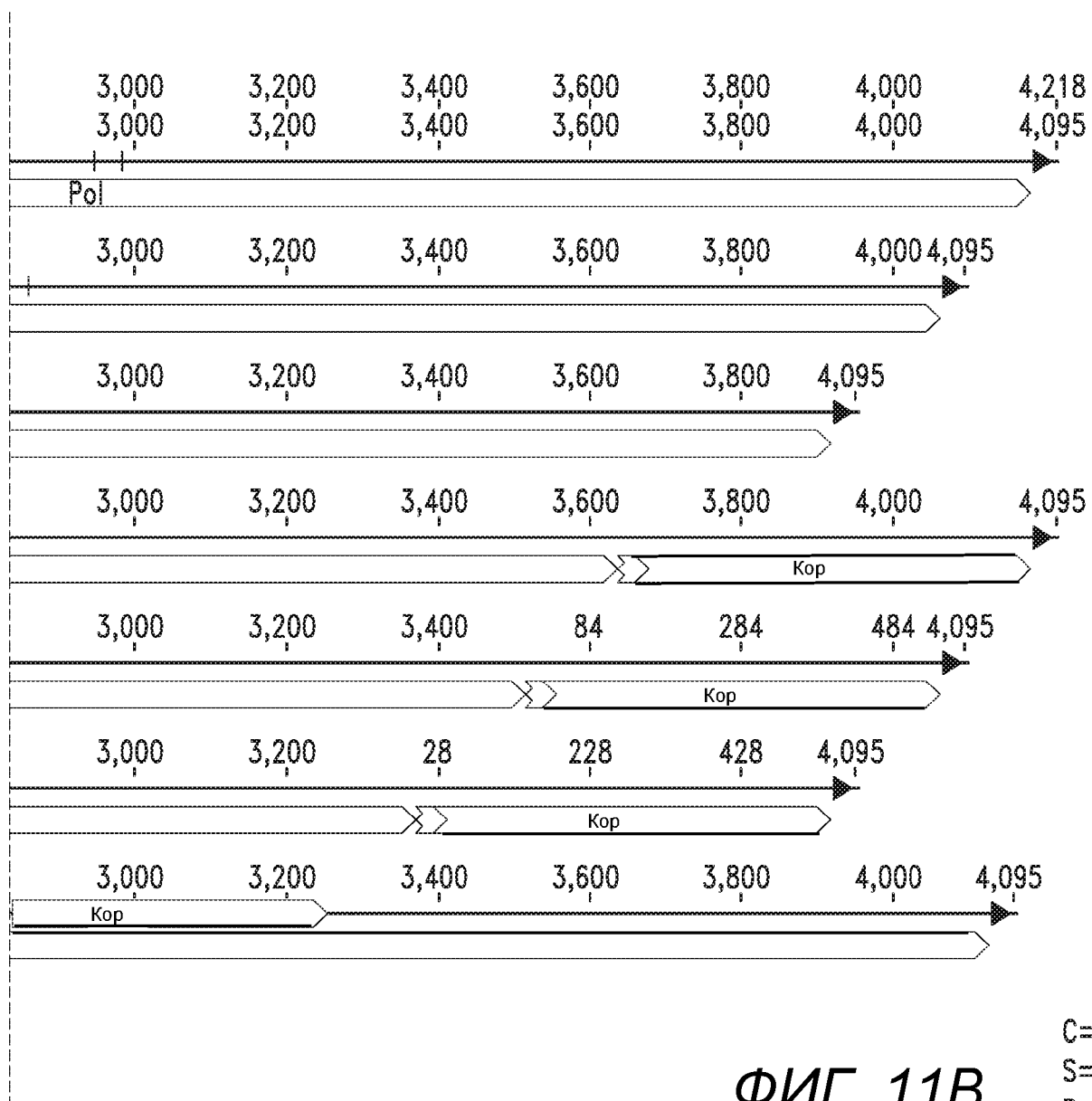
18/24



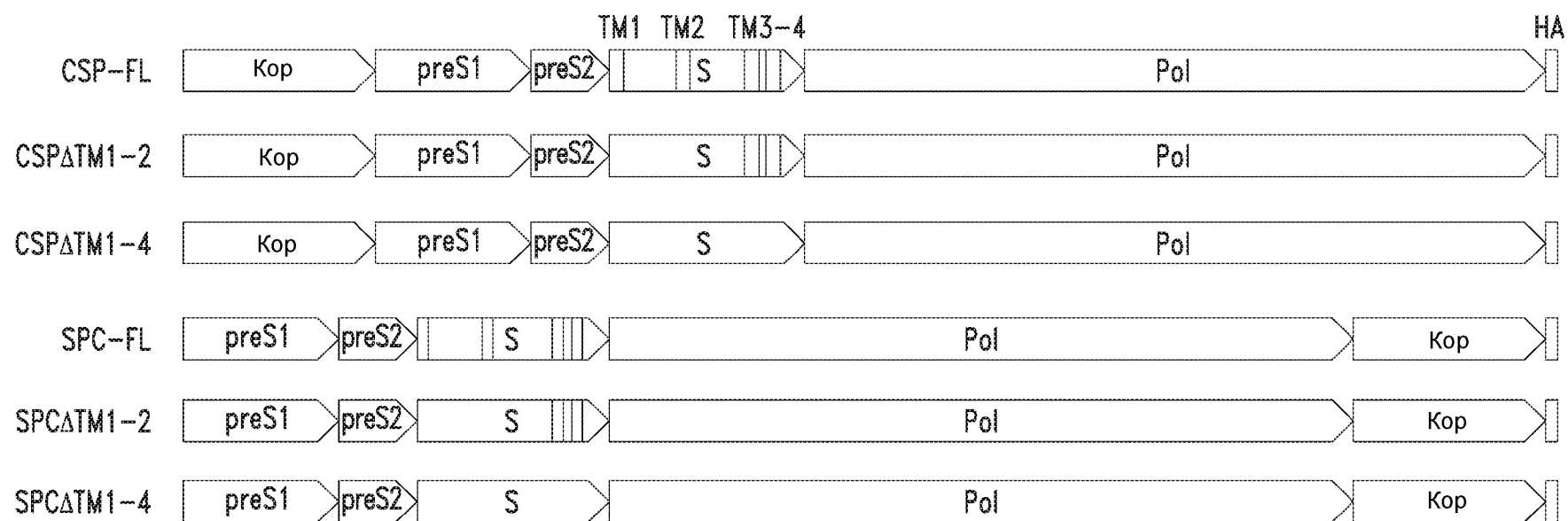
ФИГ. 10В



20/24

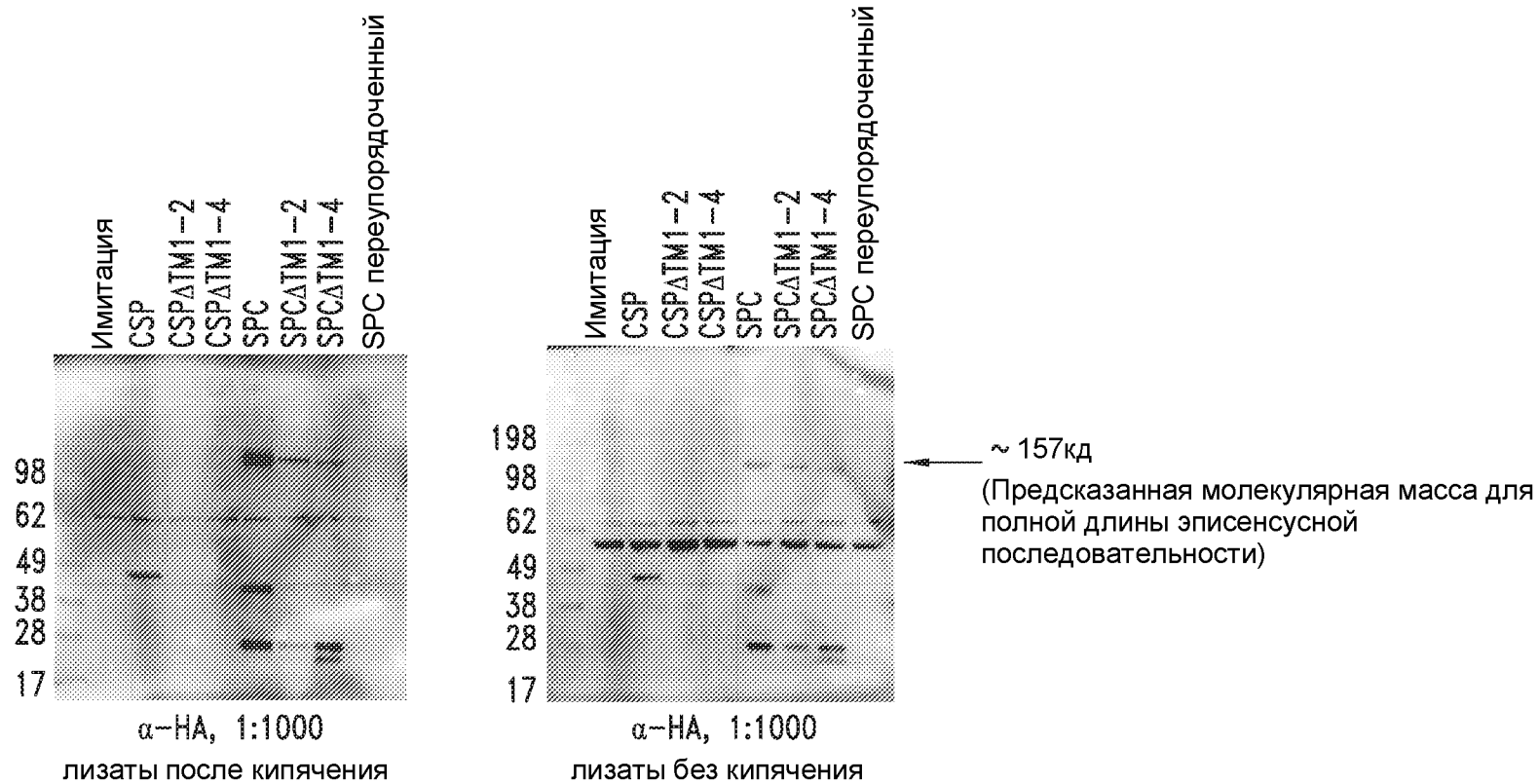


21/24



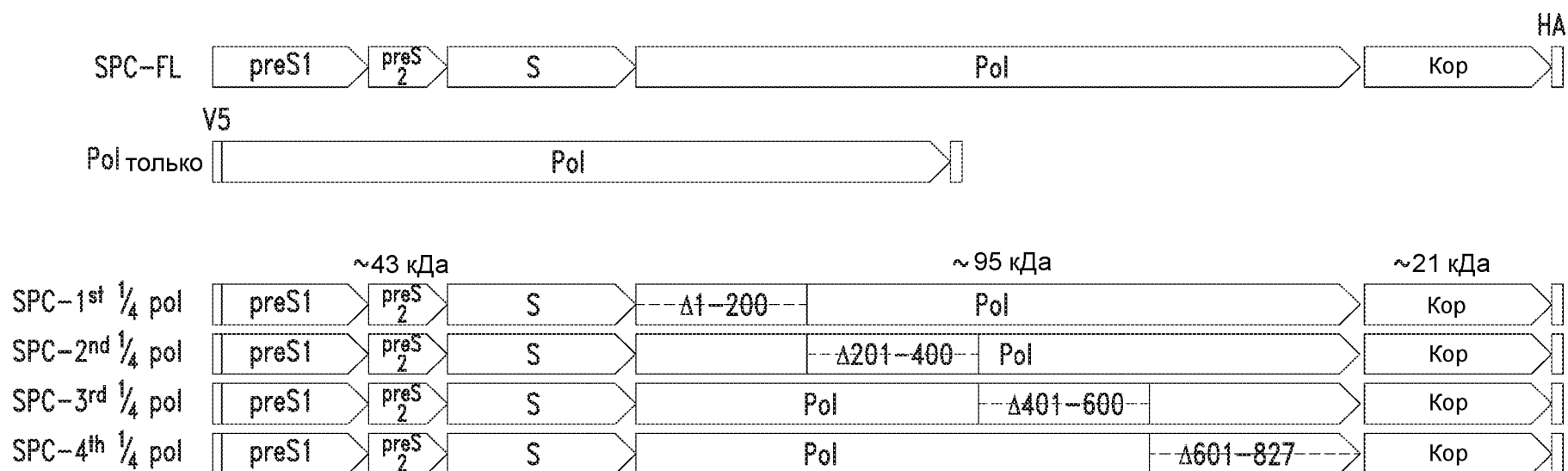
ФИГ. 11С

22/24



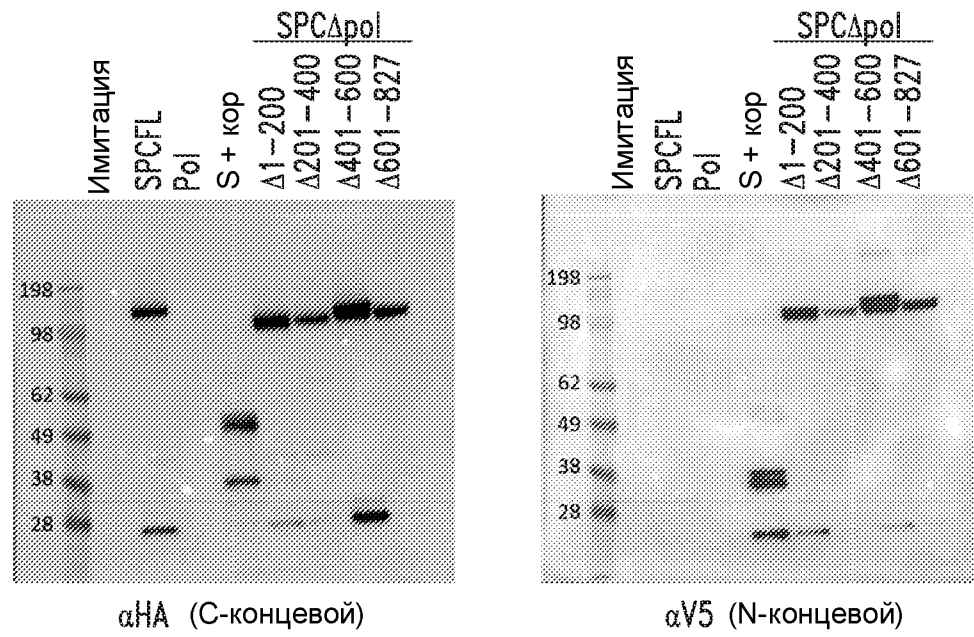
ФИГ. 11D

23/24



ФИГ. 12А

24/24



ФИГ. 12В