

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043316**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.12**(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)(21) Номер заявки  
**202090386**(22) Дата подачи заявки  
**2018.07.27****(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ репРНК ИММУНИЗАЦИЙ**(31) **62/538,070; 62/546,259**(32) **2017.07.28; 2017.08.16**(33) **US**(43) **2020.05.20**(86) **PCT/US2018/044075**(87) **WO 2019/023566 2019.01.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL);  
МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЮТ ОФ  
ТЕКНОЛОДЖИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Вогелс Роналд, Ван Дер Нет  
Колфсотен Марейн (NL), Ирвин  
Даррелл Дж., Уайсс Рон, Портер Эли  
Блантон, Мело Мариане Бандейра  
(US), Китада Тасуку (BE)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,  
Соколов Р.А. (RU)**

(56) US-A1-2014271714  
WO-A1-2005046621  
WO-A1-2016036971  
WO-A2-2013006842  
VIGNUZZI M. ET AL. "Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein.", THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, JUL 2001,

vol. 82, no. Pt 7, July 2001, (2001-07), pages 1737-1747, XP002786109, ISSN: 0022-1317, the whole document

J.S. LEE ET AL. "Venezuelan Equine Encephalitis Virus-Vectored Vaccines Protect Mice against Anthrax Spore Challenge", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 71, no. 3, 1 March 2003, (2003-03-01), pages 1491-1496, XP055519514, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.71.3.1491-1496.2003, the whole document

ZHAO H.P. ET AL. "Prime-boost immunization using alphavirus replicon and adenovirus vectored vaccines induces enhanced immune responses against classical swine fever virus in mice", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 131, no. 3-4, 15 October 2009, (2009-10-15), pages 158-166, XP026600296, ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2009.04.003, [retrieved on 2009-04-11], cited in the application, the whole document

SUN Y. ET AL. "Enhanced immunity against classical swine fever in pigs induced by prime-boost immunization using an alphavirus replicon-vectored DNA vaccine and a recombinant adenovirus", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1-2, 15 September 2010, (2010-09-15), pages 20-27, XP027205394, ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2010.04.005, [retrieved on 2010-04-14], the whole document

BAREFOOT B. ET AL. "Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 26, no. 48, 11 November 2008, (2008-11-11), pages 6108-6118, XP026034582, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2008.09.007, [retrieved on 2008-09-20], the whole document

LJUNGBERG KARL ET AL. "Self-replicating alphavirus RNA vaccines", EXPERT REVIEW OF VACC, EXPERT REVIEWS LTD, GB, vol. 14, no. 2, 1 February 2015, (2015-02-01), pages 177-194, XP008175780, ISSN: 1744-8395, DOI: 10.1586/14760584.2015.965690, the whole document

(57) Описаны композиции и способы для индукции иммунного ответа против иммуногена у человека. Индуцированный иммунный ответ получают путем введения гетерологичной прайм-буст комбинации in vitro транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК) и аденовирусного вектора. Композиции и способы можно использовать для обеспечения защитного иммунитета против заболевания, такого как вирусная инфекция или рак, у человека.

**043316 B1**

**043316 B1**

### **Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web как ASCII отформатированный перечень последовательностей с именем файла "sequence\_listing", дата создания 26 июля 2017 года, и который имеет размер около 23045 байт. Перечень последовательностей, представленный одновременно через EFS-Web, является частью описания изобретения и включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

### **Область, к которой относится изобретение**

Изобретение относится к способам и композициям для индукции иммунного ответа у субъекта-человека. В частности, индуцированный иммунный ответ получают путем введения гетерологичной прайм-буст комбинации *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК) и аденовирусного вектора. Такие способы и композиции обеспечивают сильную индукцию гуморального и клеточного иммунных ответов против иммуногена у субъекта-человека, что можно использовать для обеспечения эффективного лечения и/или защиты против заболевания, такого как опухоль или инфекционное заболевание, у субъекта-человека.

### **Предпосылки создания изобретения**

Вакцины можно использовать для обеспечения иммунной защиты против патогенов, таких как вирусы, бактерии, грибки или простейшие, а также против рака.

Инфекционные заболевания являются второй по значимости причиной смерти во всем мире после сердечно-сосудистых заболеваний, но являются основной причиной смерти у младенцев и детей (Lee and Nguyen, 2015, *Immune Network*, 15 (2): 51-7). Вакцинация является наиболее эффективным средством профилактики различных инфекционных заболеваний. Целью вакцинации является формирование патоген-специфического иммунного ответа, обеспечивающего длительную защиту от инфекции. Несмотря на значительный успех вакцин, разработка безопасных и сильных вакцин по-прежнему необходима из-за появления новых патогенов, повторного появления старых патогенов и неоптимальной защиты, предоставляемой существующими вакцинами. Имеющие важное значение заболевания, возникающие или вновь возникающие в последнее время, включают следующие: тяжелый острый респираторный синдром (SARS) в 2003 году, пандемия гриппа H1N1 в 2009 году и вирус Эбола в 2014 году. В результате возникает необходимость в разработке новых и эффективных вакцин против возникающих заболеваний.

Рак является одной из основных причин смерти в западном мире, при этом наиболее распространенными являются рак легких, молочной железы, предстательной железы и колоректальный рак (Butterfield, 2015, *BMJ*, 350: h988). Существует несколько клинических подходов к лечению рака, включая хирургию, химиотерапию, лучевую терапию и лечение низкомолекулярными ингибиторами сигнальных путей. Было показано, что каждый из этих стандартных подходов модулирует противоопухолевый иммунитет путем увеличения экспрессии опухолевых антигенов в опухоли или вызывая высвобождение антигенов из умирающих опухолевых клеток и путем стимулирования противоопухолевого иммунитета для терапевтического эффекта. Иммуноterapia является перспективной областью, которая предлагает альтернативные методы лечения рака. Противораковые вакцины предназначены для стимулирования опухоль-специфических иммунных ответов, особенно цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам. Клиническая эффективность должна быть улучшена, чтобы противораковые вакцины стали полноценной альтернативой или дополнением к традиционным методам лечения рака. До настоящего времени предпринимались значительные усилия для лучшего понимания основных требований к клинически эффективным противораковым вакцинам. Последние данные подчеркивают, что важными требованиями, среди прочего, являются (1) использование мультиэпитопных иммуногенов, возможно, происходящих из различных опухолевых антигенов; (2) выбор эффективных адъювантов; (3) связь противораковых вакцин с агентами, способными противодействовать регуляторной среде, присутствующей в микроокружении опухоли; и (4) необходимость выбора окончательной композиции и режима вакцины после точных предварительных испытаний, сравнивающих различные композиции антигенов (Fenoglio et al., 2013, *Hum Vaccin Immunother*, (12): 2543-7). Для удовлетворения этих требований необходимо новое поколение противораковых вакцин, обладающих как иммунологической, так и клинической эффективностью.

Потенциал вакцин на основе нуклеиновых кислот исследуют в течение многих лет (Vogel and Sarver N, 1995, *Clin Microbiol Rev.*, 8(3):406-10). В настоящее время проводятся клинические испытания с использованием вакцин на основе ДНК или вакцин на основе мРНК, в том числе клинические испытания вакцин на основе мРНК против вирусных мишеней, таких как вирус бешенства (см., например, world wide web at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov); Alberer et al., *The Lancet*, published online July 2017, world wide web at [dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31665-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31665-3); DeFrancesco et al., *Nature Biotechnology*, 35: 193-197).

В следующем поколении вакцин на основе мРНК используется самореплицирующаяся РНК (репРНК), которая основана на самореплицирующемся механизме положительно-полярных РНК-вирусов, таких как альфа-вирусы (см., например, Bogers et al., 2015, *J Infect Dis.*, 211 (6):947-55). Такие репРНК индуцируют транзиторную высокую экспрессию антигена в широком диапазоне тканей организма хозяина и способны действовать как в делящихся, так и в неделящихся клетках.

Альфа-вирусы принадлежат к семейству тогавирусов и имеют линейные одноцепочечные РНК-

геномы с положительной полярностью, включающие два функциональных сегмента, каждый со своим собственным промотором. Первый сегмент, расположенный на 5'-конце генома, кодирует неструктурные белки, которые составляют самособирающуюся репликазу, которая синтезирует РНК-геном с отрицательной полярностью, РНК-геном с положительной полярностью и субгеномную РНК. Второй сегмент кодирует структурные оболочечные и капсидные белки. Самореплицирующиеся РНК (репРНК), также называемые альфа-вирусными репликонами, представляют собой нуклеиновые кислоты, происходящие из полноразмерного вируса, в котором гены, кодирующие структурные белки, удалены таким образом, что репликон способен реплицироваться в клетке, но не способен размножаться как вирус. В случае систем экспрессии антигенов на основе репРНК, гены, кодирующие антигены, могут быть встроены ниже субгеномного промотора вместо генов, кодирующих структурные белки. РепРНК могут доставляться в клетку в виде молекулы ДНК, из которой запускается репРНК, упакованными в частицу вирусного репликона (VRP) или в виде оголенной модифицированной или немодифицированной молекулы РНК

Исследование вакцин на основе репРНК все еще находится на доклинических стадиях, но клинические испытания, как ожидается, начнутся не позднее чем через пару лет. Исследования показали, что объединение репРНК, запускаемой из ДНК или упакованной в вирусные репликационные частицы (VRP), с аденовирусными векторами при гетерологичной прайм-буст вакцинации стимулирует иммунные ответы (см., например, WO2005046621; Zhao et al., 2009, *Vet Immunol Immunopathol.*, 131: 158-166 и Naslund et al., 2007, *J Immunol*, 178: 6761-6769). Кроме того, было показано, что гуморальные ответы, индуцированные вакциной на основе репРНК, могут быть усилены вакциной на основе белка (Bogers et al., Id.).

Однако гетерологичная вакцинация с использованием аденовирусного вектора в сочетании с плазмидой ДНК, из которой запускается репРНК, имеет несколько проблем. Например, ДНК плазмиды связаны с проблемами безопасности, такими как загрязнение бактериальной продукцией, риск интеграции ДНК в геном хозяина и отсутствие самоограничивающейся экспрессии антигенов. С другой стороны, гетерологичная вакцинация с использованием аденовирусного вектора в сочетании с репРНК, запускаемой из VRP, требует пакующей клеточной линии для продукции VRP, что является дорогостоящим и длительным процессом со сложными производственными проблемами. Использование вакцины на основе белка в сочетании с репРНК имеет ограничение, заключающееся в том, что вакцины на основе белка требуют дорогостоящей и длительной продукции белка клетками с риском загрязнения. Кроме того, большинство вакцин на основе белка имеют проблемы стабильности и требуют холодовой цепи, и, как правило, вакцины на основе белка ограничиваются стимуляцией гуморальных иммунных ответов.

Соответственно, в данной области существует потребность в улучшенных вакцинах на основе технологии репРНК, которые можно использовать для индукции защитного гуморального и клеточного иммунитета против иммуногенов, особенно когда требуется быстрый ответ в случае вспышки пандемии. Производство таких вакцин должно быть экономически выгодным, и они должны иметь минимальные побочные эффекты. Кроме того, они предпочтительно должны быть эффективны против широкого ряда антигенов.

### Сущность изобретения

Изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая схемы гетерологичной прайм-буст иммунизации с использованием двух разных вакцинных платформ: (i) *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся мРНК (репРНК) и (ii) вакцины на основе аденовирусного вектора.

Было обнаружено, что проблемы, связанные с применением вакцины на основе ДНК, упакованных в VRP вакцин и вакцин на основе белка, некоторые из которых обсуждаются выше, можно обойти с использованием *in vitro* продукции репРНК, которая представляет собой не содержащий ДНК продукт, который можно получить с использованием быстрого универсального и бесклеточного способа получения (Kallen and Thess, 2014, *Ther Adv Vaccines*, 2(1) 10-31). Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что объединение IVT репРНК с аденовирусным вектором в схеме гетерологичной прайм-буст иммунизации приводит к индуцированным гуморальным и клеточным иммунным ответам, которые сильнее, чем ответы, получаемые в результате отдельных или гомологичных прайм-буст иммунизации аденовирусным вектором или IVT репРНК. Изобретение поэтому можно использовать для получения высокоэффективных вакцин против широкого ряда мишеней.

В одном общем аспекте, изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта-человека путем введения гетерологичной прайм-буст иммунизации, включающей комбинацию IVT репРНК и аденовирусного вектора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные прайм-буст комбинации IVT репРНК и аденовирусного вектора генерируют индуцированный иммунный ответ на антигенный белок или его иммуногенный полипептид у субъекта-человека. Антигенный белок или его иммуногенный полипептид может представлять собой любой антигенный белок или его иммуногенный полипептид. Например, антигенный белок или его иммуногенный полипептид может происходить из патогена, например вируса, бактерии, грибка, простейшего, или рака, например опухоли.

Соответственно, один общий аспект изобретения относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающему:

- a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное

количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

б. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере общую антигенную детерминанту.

Другой общий аспект изобретения относится к комбинации для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающей:

а. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

б. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где одну из композиций вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а другую композицию вводят субъекту-человеку для усиления иммунного ответа,

где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту.

Другой общий аспект изобретения относится к применению комбинации в соответствии с вариантом осуществления изобретения для индукции иммунного ответа у субъекта-человека.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция, включающая IVT репРНК, является примирующей композицией, а композиция, включающая аденовирусный вектор, является бустерной композицией.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения индуцированный иммунный ответ включает индуцированный гуморальный, или ответ антител, иммунный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека. Такой ответ, например, может характеризоваться большим процентом отвечающих пациентов, например, более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% протестированных субъектов, как определено твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения индуцированный иммунный ответ включает индуцированный клеточный иммунный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.

В одном варианте осуществления изобретения усиленный иммунный ответ, генерируемый этим способом, включает усиленный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека. Такой ответ, например, может характеризоваться большим процентом CD8<sup>+</sup> отвечающих пациентов, например более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% протестированных субъектов, как определено иммуноферментным спот-анализом (ELISPOT) или методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). В другом варианте осуществления изобретения усиленный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ, генерируемый этим способом, включает увеличение или индукцию полифункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфических в отношении по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков. Такие полифункциональные CD8<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют более чем один цитокин, например, два или более из IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа.

В одном варианте осуществления изобретения усиленный иммунный ответ, генерируемый этим способом, включает усиленный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека. Такой ответ, например, может характеризоваться большим процентом CD4<sup>+</sup> отвечающих пациентов, например более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% протестированных субъектов, как определено методом ELISPOT или методом ICS. В другом варианте осуществления изобретения усиленный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ, генерируемый этим способом, включает увеличение или индукцию полифункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, специфических в отношении по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков. Такие полифункциональные CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют более чем один цитокин, например два или более из IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения индуцированный иммунный ответ включает индуцированный ответ антител, индуцированный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ и индуцированный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.

В предпочтительных вариантах осуществления, IVT репРНК представляет собой репРНК на основе

вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE). В предпочтительных вариантах осуществления каркас IVT репРНК представляет собой один из тех, которые описаны Frolov et al. (1999, J Virol., 73(5):3854-65). В предпочтительных вариантах осуществления каркас IVT репРНК представляет собой каркасную последовательность SEQ ID NO: 3 без вставки белка рге-F RSV.

В предпочтительных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 26 (Ad26) или вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 35 (Ad35).

В вариантах осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 1-52 недель после введения примирующей композиции. В одном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2-52 недель после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4-52 недель после введения примирующей композиции. В одном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 1 неделю после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 8 недель после введения примирующей композиции. В других вариантах осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 6, 10, 12, 14, 16, 20, 24 или более недель после введения примирующей композиции.

В одном варианте осуществления изобретения первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из патогена, такого как вирус, бактерия, грибок или простейшее. В предпочтительных вариантах осуществления первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из вируса. В другом варианте осуществления изобретения антигенный белок происходит из рака. В предпочтительных вариантах осуществления первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из опухоли.

В одном варианте осуществления изобретения первый полинуклеотид и второй полинуклеотид кодируют один и тот же антигенный белок или его иммуногенный полипептид. В другом варианте осуществления изобретения первый полинуклеотид и второй полинуклеотид кодируют разные иммуногенные полипептиды или эпитопы одного и того же антигенного белка. Еще в одном варианте осуществления изобретения первый полинуклеотид и второй полинуклеотид кодируют разные, но родственные, антигенные белки или их иммуногенный полипептид. Например, родственные антигенные белки могут быть по существу схожими белками, происходящими из одного и того же антигенного белка, или разными антигенными белками, происходящими из одного и того же патогена или опухоли.

В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

В одном варианте осуществления изобретения способ по изобретению обеспечивает защитный иммунитет субъекту-человеку против заболевания, связанного с антигенным белком, такого как опухоль или инфекционное заболевание. В одном предпочтительном варианте осуществления прайм-буст комбинация IVT репРНК и аденовирусного вектора индуцирует защитный иммунный ответ против опухоли у субъекта-человека. В другом предпочтительном варианте осуществления прайм-буст комбинация IVT репРНК и аденовирусного вектора индуцирует иммунный ответ против патогена у субъекта-человека.

В предпочтительных вариантах осуществления первый или второй антигенный белок происходит из F белка до слияния из респираторно-синцитиального вируса (RSV-preF), и первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй антигенные белки каждый независимо включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, их иммуногенные полипептиды и их комбинации.

В предпочтительных вариантах осуществления IVT репРНК включает нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, происходящий из RSV-preF белка. Предпочтительно, IVT репРНК включает нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, или его иммуногенный полипептид или антигенную детерминанту. Наиболее предпочтительно, IVT репРНК включает нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

#### **Краткое описание чертежей**

Представленное выше краткое описание, а также последующее подробное описание изобретения будет лучше понято при прочтении вместе с прилагаемыми чертежами. Должно быть понятно, что изобретение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На чертежах:

фиг. 1 представляет схематическое изображение репРНК на основе VEE-вируса, кодирующей RSV-preF белок;

фиг. 2 представляет план эксперимента для исследования гомологичной IVT репРНК иммунизации, в котором анализ осуществляли методом ELISA;

фиг. 3 представляет RSV-preF белок-специфические гуморальные иммунные ответы из исследова-

ния гомологичной IVT репРНК иммунизации, определенные методом ELISA;

фиг. 4 представляет план эксперимента для исследования гомологичной IVT репРНК иммунизации, в котором анализ осуществляли методом ELISPOT;

фиг. 5 представляет RSV-preF белок-специфические Т-клеточные ответы из исследования гомологичной IVT репРНК иммунизации, определенные при помощи IFN- $\gamma$  ELISPOT анализа с использованием РВМС и CTL-активирующего пептида KYKNAVTEL из RSV-F;

фиг. 6 представляет план эксперимента для исследования гетерологичной иммунизации с использованием IVT репРНК и аденовирусного вектора, в котором анализ осуществляли методом ELISA и ELISPOT;

фиг. 7 представляет RSV-preF белок-специфические гуморальные иммунные ответы из исследования гетерологичной иммунизации с использованием IVT репРНК и аденовирусного вектора, определенные методом ELISA; и

фиг. 8 представляет RSV-preF белок-специфические Т-клеточные ответы из исследования гетерологичной иммунизации с использованием IVT репРНК и аденовирусного вектора, определенные методом IFN- $\gamma$  ELISPOT с использованием спленоцитов.

#### **Подробное описание изобретения**

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описаны в предшествующем уровне техники и в описании; каждый из этих ссылочных документов полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., которые включены в настоящее описание, представлено в целях обеспечения контекста для изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что какие-либо или все из вышеперечисленных являются частью предшествующего уровня техники в отношении любых изобретений, раскрытых или заявленных.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае, некоторые термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, процитированные в настоящей заявке, включены посредством ссылки, как если бы они были изложены полностью в настоящей заявке. Следует отметить, что используемые в настоящей заявке и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалистам в данной области техники будет понятно, или они смогут установить, с использованием не более чем рутинного экспериментирования, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке. Такие эквиваленты предназначены для охвата изобретением.

В настоящем описании и в формуле изобретения, которая следует далее, если контекст не требует иного, следует понимать, что слово "включать" и такие варианты, как "включает" и "включающий", подразумевают включение единого целого или стадии или группы единых целых или стадий, но не исключение любого другого единого целого или стадии или группы единых целых или стадий. В контексте настоящей заявки термин "включающий" может быть заменен термином "содержащий" или "включающий в себя" или иногда, когда он используется в настоящей заявке, термином "имеющий". В контексте настоящей заявки "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в элементе формулы изобретения. В контексте настоящей заявки "по существу состоящий из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. В каждом случае в настоящей заявке любой из терминов "включающий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов.

В контексте настоящей заявки союз "и/или" между множеством перечисляемых элементов понимается как охватывающий как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Предполагается, что любой из этих вариантов соответствует смыслу и поэтому удовлетворяет требованию термина "и/или", как он используется в настоящей заявке. Также должно быть понятно, что одновременная применимость более чем одного из вариантов соответствует смыслу и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

В контексте настоящей заявки термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, лечение которого будет или было осуществлено способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В контексте настоящей заявки термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно человека.

Защитный иммунитет зависит как от врожденного, так и от адаптивного иммунного ответа. В кон-

тексте настоящей заявки термин "иммунный ответ" относится к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунологического ответа на антиген, который был введен субъекту способами по изобретению. "Гуморальные" иммунные ответы относятся к продукции антител В-клетками, а "клеточный" иммунный ответ относится к цитотоксической активности CD8+ эффекторных Т-клеток и CD4+ Т-клеток, также известных как хелперные Т-клетки. CD4+ Т-клетки играют ключевую роль как в гуморальном, так и в клеточном иммунном ответе.

В контексте настоящей заявки термин "индуцирующий" или "стимулирующий" и их вариации относятся к любому измеримому увеличению клеточной активности. Индукция иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию или созревание популяции иммунных клеток, увеличение продукции цитокинов и/или другой показатель повышения иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления индукция иммунного ответа может включать увеличение пролиферации В-клеток, продуцирование антиген-специфических антител, увеличение пролиферации антиген-специфических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или повышение экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимуляторных маркеров.

В контексте настоящей заявки термин "индуцированный ответ антител" или "индуцированный гуморальный иммунный ответ" относится к ответу антител у субъекта-человека, которому вводят прайм-буст комбинацию репРНК и аденовирусного вектора по изобретению, который усиливается по меньшей мере в 1,5, 2, 2,5 или более раз в сравнении с соответствующим иммунным ответом, наблюдаемым у человека, которому вводили гомологичную прайм-буст иммунизацию либо только с репРНК, либо только с аденовирусным вектором в сопоставимых дозах с использованием такой же прайм-буст схемы.

В контексте настоящей заявки термин "индуцированный клеточный иммунный ответ" относится к клеточному иммунному ответу у человека, которому вводят прайм-буст комбинацию репРНК и аденовирусного вектора в соответствии с изобретением, который увеличивается по меньшей мере 1,5, 2, 2,5 раз или в сравнении с соответствующим иммунным ответом, наблюдаемым у человека, которому вводили гомологичную прайм-буст иммунизацию либо только с репРНК, либо только с аденовирусным вектором в сопоставимых дозах, с использованием такой же прайм-буст схемы.

В контексте настоящей заявки термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфекцию или заболевание, связанное с антигенным белком или его иммуногенным полипептидом, против которого была сделана вакцинация. Обычно у субъекта, у которого развился защитный иммунный ответ, развиваются только легкие или умеренные клинические симптомы, или вообще нет никаких симптомов. Обычно субъект, имеющий защитный иммунный ответ или защитный иммунитет против определенного антигенного белка, не умирает в результате инфекции или заболевания, связанного с антигенным белком.

В контексте настоящей заявки термин "иммунологически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Иммунологически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, анализы *in vitro* необязательно могут быть использованы для определения оптимальных диапазонов доз. Выбор конкретной эффективной дозы может осуществить (например, при помощи клинических испытаний) специалист в данной области с учетом некоторых факторов, включая заболевание, которое нужно лечить или предотвратить, симптомы, связанные с заболеванием, массу тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалистам в данной области. Точная доза для применения в препарате также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

В контексте настоящей заявки термин "транскрибированный *in vitro*" относится к способу, в котором РНК ферментативно синтезируют *in vitro* бесклеточным способом, например, с использованием клеточных экстрактов или выделенных ферментов.

В контексте настоящей заявки термин "самореплицирующаяся РНК", "самореплицирующийся РНК-репликон" или "репРНК" или "РНК-репликон" относится к молекуле РНК, экспрессирующей гены неструктурного белка альфа-вируса, таким образом, что она может направлять свою собственную амплификацию репликации в клетке, без продуцирования вирусного потомства. Например, репРНК может включать 5' и 3' последовательности распознавания репликации альфа-вируса, кодирующие последовательности для неструктурных белков альфа-вируса, гетерологичный ген, кодирующий антиген и средства для экспрессии антигена, и путь полиаденилирования. РепРНК по изобретению может содержать одну или несколько мутаций, таких как аттенуирующие мутации или мутации, которые улучшают функциональность. РепРНК по изобретению может содержать модифицированные нуклеиновые основания, такие как те, которые описаны в US 2011/0300205, соответствующее содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки. Например, репРНК по изобретению могут содержать модифицированные нуклеозиды, включая, но не ограничиваясь этим, m1G (1-метилгуанозин), m2G (N2-метилгуанозин), m7G (7-метилгуанозин), Gm (2'-О-метилгуанозин), m22G (N2,N2-диметилгуанозин), m2Gm (N2,2'-О-диметилгуанозин) и m22Gm (N2,N2,2'-О-триметилгуанозин).

В контексте настоящей заявки термин "антигенный белок" относится к белку, который способен стимулировать иммунный ответ у позвоночного. В контексте настоящей заявки термин "его иммуногенный полипептид" или "его иммуногенный фрагмент" относится к фрагменту антигенного белка, который сохраняет способность стимулировать иммунный ответ. В контексте настоящей заявки термин "антигенная детерминанта" или "эпитоп" относится к области антигенного белка, которая специфически взаимодействует с антителом.

В контексте настоящей заявки термин "носитель" относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липид-содержащей везикуле, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники для использования в фармацевтических композициях. Должно быть понятно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. В контексте настоящей заявки термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному веществу, которое не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего раскрытия, любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в фармацевтической композиции на основе репРНК IVT или на основе аденовирусного вектора, можно использовать в изобретении. Подходящие эксципиенты включают, но не ограничиваются этим, стерильную воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин, этанол или т.п. и их комбинации, а также стабилизаторы, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или другие подходящие белки и редуцирующие сахара.

В контексте настоящей заявки термин "примирующая композиция", "примирующая иммунизация" или "прайм-иммунизация" относится к первичной стимуляции антигеном с использованием первой композиции по изобретению. В частности, термин "примирование" или "потенцирование" иммунного ответа, как используется в настоящей заявке, относится к первой иммунизации с использованием антигена, которая индуцирует иммунный ответ на желаемый антиген и вызывает более высокий уровень иммунного ответа на желаемый антиген при последующей повторной иммунизации тем же антигеном. В контексте настоящей заявки термин "бустерная композиция", "бустерная иммунизация" или "бустер-иммунизация" относится к дополнительной иммунизации, вводимой млекопитающему, или эффективной у млекопитающего, после первичной иммунизации. В частности, термин "усиление" иммунного ответа, как используется в настоящей заявке, относится к введению композиции, доставляющей тот же самый антиген, который кодируется при первичной иммунизации.

В контексте настоящей заявки термин "патоген" относится к инфекционному агенту, такому как вирус, бактерия, грибок, паразит или прион, который вызывает заболевание у хозяина.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при их сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измеряют, используя алгоритмы сравнения последовательностей, которые являются известными и стандартными для специалистов в данной области техники.

В контексте настоящей заявки термин "по существу идентичный", в отношении полипептидной последовательности антигена, относится к полипептиду антигена, имеющему по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с эталонной полипептидной последовательностью. Термин "по существу идентичный", в отношении последовательности нуклеиновой кислоты, относится к последовательности нуклеотидов, имеющей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с эталонной нуклеиновокислотной последовательностью.

Еще одним указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептиды по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реактивен с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой. Таким образом, полипептид типично по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

В изобретении обнаружено, что гетерологичные прайм-буст комбинации, в частности комбинации репРНК IVT и аденовирусного вектора, неожиданно эффективны для генерирования защитных иммунных ответов у людей.

Антигенные белки.

Любая представляющая интерес ДНК может быть встроена в конструкции репРНК и аденовирусные векторы, описанные в настоящей заявке, для гетерологичной экспрессии из репРНК и векторов. Чужеродные гены для встраивания в геном вируса в экспрессируемой форме могут быть получены с ис-



пользованием традиционных методов выделения желаемого гена с учетом настоящего раскрытия. Для организмов, которые содержат ДНК-геном, гены, кодирующие представляющий интерес антиген, могут быть выделены из геномной ДНК; для организмов с РНК-геномами желаемый ген может быть выделен из кДНК-копий генома. Антигенный белок также может кодироваться рекомбинантной ДНК, которая модифицирована на основании природной последовательности, например, для оптимизации антигенного ответа, экспрессии генов и т.д.

В некоторых вариантах осуществления изобретения прайм-буст комбинации репРНК и аденовируса генерируют индуцированный иммунный ответ на антигенный белок или его иммуногенный полипептид у субъекта-человека. Антигенный белок может быть любым антигенным белком, связанным с инфекцией или заболеванием.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, антигенный белок или его иммуногенный полипептид может быть выделен или может происходить из патогена, такого как вирус (например, филовирус, аденовирус, арбовирус, астровирус, коронавирус, коксаки-вирус, цитомегаловирус, вирус денге, Эпштейна-барра вирус, вирус гепатита, герпесвирус, вирус иммунодефицита человека, папиллома-вирус человека, Т-лимфотропный вирус человека, вирус гриппа, JC вирус, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус кори, вирус контагиозного моллюска, вирус эпидемического паротита, норовирус, паровирус, полиовирус, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, риновирус, ротавирус, вирус краснухи, вирус оспы, вирус ветряной оспы, вирус Западного Нила, вирус зика и т.д.), бактерия (например, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Micobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* и т.д.), грибок (например, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida species*, *Aspergillus species* и т.д.), простейшее (например, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosome*, *cryptosporidiums*, *isospora*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii* и т.д.), или рака (например, рака мочевого пузыря, рака толстой кишки и рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, лейкоза, рака легкого, меланомы, не-ходжкинской лимфомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака щитовидной железы и т.д.).

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, антигенный белок или его иммуногенный полипептид может быть выделен из, или происходит из, опухоли, такой как рак.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты экспрессируют антигенные домены, а не целый антигенный белок. Эти фрагменты могут иметь любую длину, достаточную для того, чтобы быть иммуногенными или антигенными. Фрагменты могут быть длиной не менее четырех аминокислот, предпочтительно 8-20 аминокислот, но могут быть длиннее, например длиной 100, 200, 660, 800, 1000, 1200, 1600, 2000 или более аминокислот, или иметь любую промежуточную длину.

Специалисту в данной области будет понятно, что молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигенный белок, могут быть модифицированы, например, молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке, могут быть мутированы, при условии, что модифицированный экспрессируемый белок вызывает иммунный ответ против патогена или заболевания. Таким образом, используемый в настоящей заявке термин "антигенный белок" относится к белку, который включает по меньшей мере одну антигенную детерминанту патогена или опухоли, описанную выше. Термин "антигенные белки" также охватывает антигенные белки, которые являются по существу схожими.

#### IVT репРНК.

РепРНК, полезные в изобретении, происходят из альфа-вирусов, которые являются одноцепочечными РНК-вирусами с положительной полярностью. В одном варианте осуществления РепРНК, которую можно использовать в изобретении, содержит 7-метилгуанозинный кэп, 5' нетранслируемую область, РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) полипротеин Р1234 (т.е. неструктурные белки, nsPs), субгеномный промоторный элемент, представляющую интерес варибельную область, из которой экспрессируют антигенный белок, 3' нетранслируемую область и а поли(А) хвост.

РепРНК, полезные в изобретении, могут происходить из любого самореплицирующегося вируса, содержащего плюс-цепь РНК, например, репРНК могут происходить из семейств вирусов *Togaviridae* или *Arteriviridae*, таких как аура-вирус, вирус Бабанки, вирус *Barmah Forest*, вирус *Bebaru*, вирус *Buggy Creek*, вирус Чикунгунья, вирус восточного конского энцефалита, вирус Эверглейдс, вирус Форт-Морган, вирус Гета, вирус Хайленд J, вирус Кызылагач, вирус Майаро, вирус Мидлбург, вирус Мукамбо, вирус Ндumu, вирус О'Ньонг-Ньонг, вирус Пиксуна, вирус реки Росс, SA AR86, вирус Сагияма, вирус леса Семлики, вирус Синдбис, вирус Уна, вирус венесуэльского лошадиного энцефалита, вирус западного лошадиного энцефалита, вирус Ватароа, артеривирус африканских сумчатых крыс, артеривирус обезьян *DeBrazza*, вирус артериита лошадей, вирус красного колобуса Кибале, вирус краснохвостых мартышек Кибале, вирус, повышающий лактатдегидрогеназу, вирус бабуинов *Mikumi 1*, вирус *Rebjah*, вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней. В предпочтительных вариантах осуществления репРНК по изобретению происходят из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE). Примеры предпочтительных репРНК каркасов изобретения включают каркасы, описанные *Frolov et al.*, *Id.* и каркасную последовательность SEQ ID NO: 3 без вставки белка pre-F RSV.

Получение *in vitro* транскрибированной РНК (IVT) хорошо известно в данной области, и стандарт-

ные процедуры IVT и очистки могут быть использованы для получения репРНК IVT, полезных в изобретении, с учетом настоящего изобретения.

Получение репРНК IVT описано, например, в US 2011/0300205 и US2013/0195968, соответствующее содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Например, молекулы репРНК могут быть получены путем IVT молекулы ДНК, которая кодирует самореплицирующуюся молекулу РНК, с использованием подходящей ДНК-зависимой РНК-полимеразы, такой как РНК-полимераза фага T7, РНК-полимераза фага SP6, РНК-полимераза фага T3 и т.д. В методе IVT можно использовать кДНК матрицу, созданную и размноженную в плазмиде из бактерий, или созданную синтетически, например, методами синтеза генов и/или ПНР. При необходимости можно использовать соответствующие реакции кэппирования-присоединения, и поли-А может кодироваться в ДНК матрице или может быть добавлен с использованием поли-А реакции. Подходящие способы синтеза можно использовать по отдельности или в комбинации с одним или несколькими другими способами (например, с использованием технологии рекомбинантной ДНК или РНК) для получения IVT репРНК молекулы по изобретению. Подходящие способы синтеза *de novo* хорошо известны в данной области и могут быть адаптированы для конкретных применений.

Как правило, IVT репРНК, полезную в изобретении, получают с использованием молекулы ДНК, из которой может быть транскрибирована репРНК. Таким образом, изобретение также обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют репРНК по изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной путем клонирования или полученной синтетическим путем. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

IVT репРНК, полезные в изобретении, могут быть включены в подходящие системы доставки для введения. В предпочтительных вариантах осуществления IVT репРНК, полезные в изобретении, сформулированы в невирионные частицы для введения. Подходящие невирионные частицы описаны, например, в US 2011/0300205 и US2013/0195968, соответствующее содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Например, полезные системы доставки включают липосомы, полимерные частицы, нетоксичные и биоразлагаемые микрочастицы, электропорацию, инъекцию оголенной РНК и катионные субмикронные эмульсии масло-в-воде. В предпочтительных вариантах осуществления IVT репРНК, полезные в изобретении, сформулированы в композиции липидных наночастиц (LNP) (см., например, Semple et al., 2010, *Nat Biotechnol.* 28 (2): 172-176, соответствующее содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки).

В контексте настоящей заявки термин "липидная наночастица" или "LNP" относится к любой композиции липидов, которую можно использовать для доставки терапевтического продукта, включая, но не ограничиваясь этим, липосомы или везикулы, где водный объем инкапсулирован амфипатическими липидными бислоями, или где липиды покрывают внутреннюю часть, которая включает терапевтический продукт, или липидные агрегаты или мицеллы, где липид-инкапсулированный терапевтический продукт содержится в относительно неупорядоченной смеси липидов.

В конкретных вариантах осуществления LNP включают катионный липид для инкапсулирования и/или повышения доставки IVT репРНК в клетку-мишень. Катионный липид может быть любым видом липида, который несет чистый положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Липидные наночастицы можно получить путем включения многокомпонентных липидных смесей с различными соотношениями с использованием одного или нескольких катионных липидов, некаатионных липидов и ПЭГ-модифицированных липидов. Некоторые катионные липиды описаны в литературе, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие катионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP).

Композиции LNP могут включать анионные липиды. Анионные липиды могут представлять собой любой вид липидов, который несет чистый отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Анионные липиды в сочетании с катионными липидами используются для уменьшения общего поверхностного заряда LNP и для введения pH-зависимого разрушения двухслойной структуры LNP, способствующего высвобождению нуклеотидов. Некоторые анионные липиды описаны в литературе, многие из которых коммерчески доступны. Например, подходящие анионные липиды для использования в композициях и способах по изобретению включают 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (DOPE).

LNP можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. Например, LNP могут быть получены с использованием инъекции этанола или разбавления этанолом, гидратации тонких пленок, замораживания-оттаивания, пресса Фрэнча или экструзии с использованием мембран, диафильтрации, обработки ультразвуком, диализа с использованием детергентов, эфирной инфузии и обращенно-фазового выпаривания. В предпочтительных вариантах осуществления LNP, используемые в изобретении, получают путем разбавления этанолом.

Аденовирусы.

Аденовирус по изобретению принадлежит к семейству *Adenoviridae* и предпочтительно относится к роду *Mastadenovirus*. Это может быть человеческий аденовирус, но также и аденовирус, который заражает другие виды, включая, но не ограничиваясь этим, бычий аденовирус (например, бычий аденовирус 3,

BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус обезьян и аденовирус приматов, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус горилл). Предпочтительно аденовирус представляет собой человеческий аденовирус (HAdV или AdHu); в изобретении человеческий аденовирус подразумевается, если он относится к Ad без указания вида, например, краткое обозначение "Ad5" означает то же самое, что HAdV5, что означает человеческий аденовирус серотипа 5), или аденовирус обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или горилл (ChAd, AdCh или SAdV). В настоящем изобретении под человеческим аденовирусом подразумевается Ad без указания вида, например, краткое обозначение "Ad26" означает то же самое, что и HAdV26, что означает человеческий аденовирус серотипа 26. Также в настоящей заявке обозначение "rAd" означает рекомбинантный аденовирус, например, "rAd26" относится к рекомбинантному человеческому аденовирусу 26.

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

Преимуществами этих серотипов являются низкая серопревалентность и/или низкие титры существующих нейтрализующих антител в человеческой популяции и опыт применения на людях в клинических испытаниях.

Аденовирусы обезьян обычно также имеют низкую серопревалентность и/или низкие титры существующих нейтрализующих антител в человеческой популяции, и было сообщено о значительном объеме работ с использованием векторов на основе аденовирусов шимпанзе (например, US 6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina et al., 2001, J Virol 75: 11603-13; Cohen et al., 2002, J Gen Virol 83: 151-55; Kobinger et al., 2006, Virology 346: 394-401; Tatis et al., 2007, Molecular Therapy 15: 608-17; см. также обзор Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62; обзор Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39). Следовательно, в других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с изобретением основан на аденовирусе обезьян, например, аденовирусе шимпанзе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе обезьян типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Аденовирусные векторы rAd26 и rAd35.

В предпочтительном варианте осуществления в соответствии с изобретением аденовирусные векторы включают капсидные белки из двух редких серотипов: Ad26 и Ad35. В типичных вариантах осуществления вектор представляет собой rAd26 или rAd35 вирус.

Таким образом, векторы, которые можно использовать в изобретении, включают капсидный белок Ad26 или Ad35 (например, волокнистый, пентоновый или гексоновый белок). Специалистам должно быть понятно, что в векторах по изобретению необязательно нужно использовать целый Ad26 или Ad35 капсидный белок. Таким образом, в векторах по изобретению можно использовать химерные капсидные белки, которые включают по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35. Векторы по изобретению также могут включать капсидные белки, где волокнистые, пентоновые и гексоновые белки происходят каждый из разных серотипов, при условии, что по меньшей мере один капсидный белок происходит из Ad26 или Ad35. В предпочтительных вариантах осуществления волокнистые, пентоновые и гексоновые белки происходят каждый из Ad26 или каждый из Ad35.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что элементы, происходящие из множества серотипов, могут быть объединены в один рекомбинантный аденовирусный вектор. Таким образом, может быть получен химерный аденовирус, который сочетает в себе желательные свойства из разных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный аденовирус по изобретению может сочетать отсутствие существующего иммунитета серотипов Ad26 и Ad35 с такими характеристиками, как температурная стабильность, сборка, заякоривание, выход продукции, перенаправленное или улучшенное заражение, стабильность ДНК в клетке-мишени и т.п.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор, полезный в изобретении, происходит в основном или полностью из Ad35 или из Ad26 (т.е. вектор представляет собой rAd35 или rAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус является дефицитным по репликации, например, потому что он содержит делецию в E1 области генома. Для аденовирусов по изобретению, происходящих из Ad26 или Ad35, типичным является обмен E4-orf6 кодирующей последовательности аденовируса с E4-orf6 аденовируса человеческой подгруппы C, такой как Ad5. Это делает возможным размножение таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих клеточных линиях, которые экспрессируют E1 гены Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т.п. (см., например, Navenga et al, 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467). В некоторых вариантах осуществления аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 35 с делецией в E1 области, в которую бы-

ла клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4-orf6 областью Ad5. В некоторых вариантах осуществления аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 26 с делецией в E1 области, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с E4-orf6 областью Ad5. Что касается аденовируса Ad35, обычно сохраняется 3'-конец открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п.н. непосредственно перед открытой рамкой считывания pIX, или включающий это фрагмент, такой как фрагмент размером 243 п.н. непосредственно перед старто-кодоном pIX, отмеченный на 5'-конце рестрикционным сайтом Bsu36I, т.к. это увеличивает стабильность аденовируса, поскольку промотор гена pIX частично находится в этой области (см., например, Havenga et al, 2006, выше; WO 2004/001032).

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно в данной области техники.

Получение rAd26 векторов описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virology* 81(9): 4654-63. Иллюстративные геномные последовательности Ad26 можно найти в GenBank Accession EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 WO 2007/104792. Получение rAd35 векторов описано, например, в патенте США № 7270811 и в Vogels et al., (2003) *J Virology* 77(15): 8263-71. Иллюстративную геномную последовательность Ad35 можно найти в GenBank Accession AC\_000019.

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

Типично, аденовирусный вектор, полезный в изобретении, получают с использованием нуклеиновой кислоты, включающей полный рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмидный, космидный или бакуловирусный вектор). Таким образом, изобретение также обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют аденовирусные векторы по изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению можно получить путем клонирования или синтетическим путем. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

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

Пакующую клеточную линию обычно используют для получения достаточного количества аденовирусных векторов по изобретению. Пакующая клетка представляет собой клетку, которая включает те гены, которые были делетированы или инактивированы в дефектном по репликации векторе, что позволяет вирусу реплицироваться в клетке. Подходящие клеточные линии включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

В некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор может экспрессировать гены или части генов, которые кодируют антигенные пептиды. Эти чужеродные гетерологичные или экзогенные пептиды или полипептиды могут включать последовательности, которые являются иммуногенными, такие как, например, опухоль-специфические антигены (TSA), бактериальные, вирусные, грибковые и протозойные антигены.

Гетерологичный ген, кодирующий антигенный пептид, может находиться под контролем промотора (т.е. функционально связанный с промотором), происходящего из аденовируса (например, главный поздний промотор), или может находиться под контролем гетерологичного промотора. Примеры подходящих гетерологичных промоторов включают CMV промотор и RSV промотор. Предпочтительно, промотор расположен перед представляющим интерес гетерологичным геном внутри экспрессионной кассеты.

Иммуногенные композиции.

Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммунологически эффективное количество репРНК или аденовирусных векторов для применения в изобретении. Композиции могут быть сформулированы в виде вакцин (также называемые "иммуногенными композициями") в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции могут включать адьюванты для усиления иммунных ответов. Оптимальные количества каждого компонента в композиции можно определить методами, хорошо известными специалистам в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия.

Получение и использование иммуногенных композиций хорошо известны специалистам в данной области. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, нефтяные, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или раствор другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Композиции по изобретению могут содержать репРНК или аденовирусные векторы, экспресси-

рующие один или несколько антигенных белков или их иммуногенных полипептидов. Эти антигенные пептиды или полипептиды могут включать любые последовательности, которые являются иммуногенными, включая, но не ограничиваясь этим, опухоль-специфические антигены (TSA), бактериальные, вирусные, грибковые и протозойные антигены. Например, антигенный белок или его иммуногенный полипептид может происходить из патогена, например вируса, бактерии, грибка, простейшего, или он также может происходить из опухоли. В одном или нескольких предпочтительных аспектах композиции по изобретению включают репРНК или аденовирусные векторы, экспрессирующие один или несколько антигенных белков из вируса, такого как респираторно-синцитиальный вирус (RSV, вирус гриппа, ВИЧ, вирус эбола, HPV, HSV, CMV, RSV, вирус гепатита, вирус зика, вирус SARS, вирус Чикунгунья, вирус денге или вирус Западного Нила.

Антигенные белки могут представлять собой любой белок из любого пневмовируса, содержащий антигенную детерминанту. В предпочтительном варианте осуществления антигенные белки представляют собой F-белок до слияния из респираторно-синцитиального вируса (RSV-preF).

В предпочтительном варианте осуществления антигенные белки, кодируемые IVT репРНК или аденовирусными векторами, имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, их иммуногенные полипептиды и их комбинации.

Иммуногенные композиции, используемые в изобретении, могут включать адьюванты.

Адьюванты, подходящие для совместного введения в соответствии с изобретением, должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для людей, включая QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL - 1005, GERBU, TERамид, PSC97B, Adjuver, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, квасцы и MF59.

Другие адьюванты, которые можно вводить, включают лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (gCSF), гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (gMCSF), фактор некроза опухоли (TNF), эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 или кодирующие нуклеиновые кислоты.

Композиции по изобретению могут включать фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны мешать эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого вещества может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, интрамукозального (например, кишечного), интраназального или интраперитонеального путей.

Способ усиления иммунного ответа.

Изобретение обеспечивает улучшенный способ примирования и усиления иммунного ответа на любой антигенный белок или его иммуногенный полипептид у субъекта-человека с использованием IVT репРНК в комбинации с аденовирусным вектором.

В соответствии с одним общим аспектом изобретения, способ индукции иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включает:

a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примиряющей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

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

Предпочтительно, усиленный иммунный ответ также включает усиленный CD4+ ответ или усиленный CD8+ Т-клеточный ответ против антигенного белка у субъекта-человека. Усиленный CD4+ Т-клеточный ответ, вызываемый способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения, может представлять собой, например, повышение или индукцию доминирующего CD4+ Т-клеточного ответа против антигенного белка и/или увеличение или индукцию полифункциональных CD4+ Т-клеток, специфических в отношении антигенного белка, у субъекта-человека. Полифункциональные CD4+ Т-клетки экспрессируют более чем один цитокин, например, два или более из IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа. Усиленный CD8+ Т-клеточный ответ, вызываемый способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения, может представлять собой, например, увеличение или индукцию полифункциональных CD8+ Т-клеток, специфических в отношении антигенного белка, у субъекта-человека.

Более предпочтительно, усиленный иммунный ответ, вызываемый способом в соответствии с вари-

антом осуществления изобретения, включает усиленный CD4+ Т-клеточный ответ, усиленный ответ антител и усиленный CD8+ Т-клеточный ответ против антигенного белка у субъекта-человека.

Анализы, которые можно использовать для определения иммунных ответов, хорошо известны в данной области техники. Некоторые из таких анализов включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), ELISPOT (иммуноферментный спот-анализ) и ICS (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов). Анализы ELISA определяют, например, уровни секретируемых антител или цитокинов. Когда ELISA анализы используют для определения уровней антител, которые связываются с определенным антигеном, индикатором гуморального иммунного ответа, они также могут отражать активность CD4+ Т-клеток, поскольку продукция высокоаффинных антител В-клетками зависит от активности CD4+ хелперных Т-клеток. ELISPOT и ICS представляют собой одноклеточные анализы, которые анализируют, например, ответы Т-клеток на определенный антиген. Анализы ELISPOT измеряют секреторную активность отдельных клеток, а анализы ICS анализируют уровни внутриклеточных цитокинов. CD4+ специфические и CD8+ специфические Т-клеточные ответы можно определить с использованием ICS анализов.

В одном или нескольких вариантах осуществления изобретения IVT репРНК используют для примирования иммунного ответа, а вектор Ad26 или Ad35 используют для усиления иммунного ответа, в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В других вариантах осуществления изобретения вектор Ad26 или Ad35 используют для примирования иммунного ответа, а IVT репРНК используют для усиления иммунного ответа, в соответствии с вариантом осуществления изобретения.

Антигены в примирующих и бустерных композициях необязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть по существу схожими друг с другом.

Введение иммуногенных композиций обычно осуществляют внутримышечным, подкожным или внутрикожным путем. Однако можно использовать и другие способы введения, такие как внутривенный, кожный или интраназальный. Внутримышечное введение иммуногенных композиций можно осуществить при помощи иглы для инъекции композиции в виде суспензии. Альтернативой является использование безыгольного инъекционного устройства для введения композиции (с использованием, например, Biojector(TM) или лиофилизованного порошка, содержащего композицию).

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения композиция должна быть в форме парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут легко получить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактированный раствор Рингера для инъекций. IVT репРНК по изобретению можно сформулировать в липидных наночастицах для введения. В композиции можно включить консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки, по мере необходимости. Также можно использовать лекарственные формы с замедленным высвобождением.

Как правило, введение будет иметь профилактическую цель для генерирования иммунного ответа против антигена до заражения или развития симптомов. Заболевания и расстройства, которые можно лечить или предотвращать в соответствии с изобретением, включают такие, в которых иммунный ответ может играть защитную или терапевтическую роль. В других вариантах осуществления IVT репРНК и аденовирусный вектор можно вводить для профилактики после контактирования с возбудителем инфекции.

Иммуногенные композиции, содержащие IVT репРНК и аденовирусный вектор, вводят субъекту, вызывая иммунный ответ у субъекта. Количество композиции, достаточное для индукции определяемого иммунного ответа, определяется как "иммунологически эффективная доза". Как показано ниже, иммуногенные композиции по изобретению индуцируют гуморальный, а также клеточный иммунный ответ. В предпочтительном варианте осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фактическое количество вводимых композиций, а также скорость и время введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания, расстройства или состояния, которое лечат. Назначение лечения, например, принятие решения о дозировке и т.д., входит в сферу ответственности врачей общей практики и других врачей и, как правило, учитывает заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ применения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методов и протоколов, указанных выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

После получения IVT репРНК и аденовирусных векторов и необязательного формулирования таких частиц в композиции композицию можно вводить индивидууму, в частности человеку.

Терапевтически эффективное количество или дозировка могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, состояние здоровья), независимо от того, является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эф-

фективности.

В одной иллюстративной схеме IVT репРНК вводят (например, внутримышечно) в объеме от около 100 мкл до около 10 мл, содержащем дозу  $\leq 200$  мкг,  $\leq 100$  мкг,  $\leq 50$  мкг, или  $\leq 10$  мкг IVT репРНК, но экспрессию можно наблюдать при значительно более низких уровнях, например  $\leq 1$  мкг,  $\leq 100$  нг,  $\leq 10$  нг или  $\leq 1$  нг IVT репРНК на дозу. Предпочтительно, IVT репРНК вводят в объеме от 0,25 мл до 1,0 мл. Более предпочтительно, IVT репРНК вводят в объеме 0,5 мл.

Типично, IVT репРНК вводят в количестве около 10-100 мкг на дозу. В предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК вводят в количестве около 10 мкг на дозу. В другом предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК вводят в количестве около 25 мкг на дозу. В другом предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК вводят в количестве около 50 мкг на дозу. В другом предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК вводят в количестве около 75 мкг на дозу. В другом предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК вводят в количестве около 100 мкг на дозу.

В одной иллюстративной схеме аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от около 100 мкл до около 10 мл, содержащем концентрации около  $10^4$ - $10^{12}$  вирусных частиц/мл. Предпочтительно, аденовирусный вектор вводят в объеме от 0,25 мл до 1,0 мл. Более предпочтительно, аденовирусный вектор вводят в объеме 0,5 мл.

Типично, аденовирус вводят в количестве от около  $10^9$  до около  $10^{12}$  вирусных частиц (vp) субъекту-человеку за одно введение, более типично в количестве от около  $10^{10}$  до около  $10^{12}$  vp. В предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор вводят в количестве около  $5 \times 10^{10}$  vp. В другом предпочтительном варианте осуществления, аденовирусный вектор вводят в количестве около  $0,8 \times 10^{10}$  vp. В другом предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор вводят в количестве около  $2 \times 10^{10}$  vp. В другом предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор вводят в количестве около  $4 \times 10^{10}$  vp.

Композиции по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации другими лечениями, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

Бустерные композиции вводят через несколько недель или месяцев после введения примиряющей композиции, например, примерно через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 неделю, 32 недели, 33 недели, 34 недели, 35 недель, 36 недель, 37 недель, 38 недель, 39 недель, 40 недель, 41 неделю, 42 недели, 43 недели, 44 недели, 45 недель, 46 недель, 47 недель, 48 недель, 49 недель, 50 недель, 51 неделю или один-два года после введения примиряющей композиции.

Предпочтительно, бустерную композицию вводят через 1-52 недели после введения примиряющей композиции. В предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2-52 недели после введения примиряющей композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4-52 недели после введения примиряющей композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 1 неделю после введения примиряющей композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2 недели после введения примиряющей композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4 недели после введения примиряющей композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 8 недель после введения примиряющей композиции.

Примиряющая и бустерная композиции по изобретению может каждая включать одну, две, три или множество доз.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против опухоли у субъекта-человека.

Способ включает:

a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий антигенный белок, продуцируемый клеткой опухоли, по существу аналогичный антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий антигенный белок, по существу аналогичный антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа против опухоли у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примиряющей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

Предпочтительно, индуцированный иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет против опухоли у субъекта-человека.

В предпочтительном варианте осуществления композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, бустерную композицию вводят через 1-52 недели после введения примирующей композиции. Бустерную композицию также можно вводить позже, чем через 52 недель после введения примирующей композиции.

В одном варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2-52 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4-52 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 1 неделю после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 8 недель после введения примирующей композиции.

В дополнительных вариантах осуществления бустерную композицию вводят по меньшей мере через 2 недели или по меньшей мере через 4 недели после введения примирующей композиции. Еще в некоторых вариантах осуществления бустерную композицию вводят через 4-12 недель или через 4-8 недель после введения примирующей композиции.

В предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК представляет собой репРНК на основе VEE-вируса.

В предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор представляет собой Ad26 или Ad35 вектор.

Антигенный белок, продуцируемый клеткой опухоли, может представлять собой любой опухолевый антиген. В предпочтительном варианте осуществления опухолевый антиген представляет собой опухоль-специфический антиген, который присутствует только на опухолевых клетках. Опухолевый антиген также может представлять собой опухоль-ассоциированный антиген, который присутствует на некоторых опухолевых клетках, а также некоторых нормальных клетках.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления, изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против вируса у субъекта-человека. Способ включает:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий антигенный белок вируса, по существу аналогичный антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

б. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий антигенный белок, по существу аналогичный антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа против вируса у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

Предпочтительно, усиленный иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет против вируса у субъекта-человека.

В предпочтительном варианте осуществления композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.

В одном варианте осуществления бустерную композицию вводят через 1-52 недели после введения примирующей композиции. Бустерную композицию также можно вводить позже, чем через 52 недели после введения примирующей композиции.

В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2-52 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4-52 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 1 неделю после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 2 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 4 недели после введения примирующей композиции. В другом варианте осуществления изобретения бустерную композицию вводят через 8 недель после введения примирующей композиции.

В дополнительных вариантах осуществления бустерную композицию вводят по меньшей мере че-



рез 2 недели или по меньшей мере через 4 недели после введения примирующей композиции. Еще в некоторых вариантах осуществления бустерную композицию вводят через 4-12 недель или через 4-8 недель после введения примирующей композиции.

В предпочтительном варианте осуществления IVT репРНК представляет собой репРНК на основе VEE-вируса.

В предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор представляет собой Ad26 или Ad35 вектор.

Антигенный белок может представлять собой любой антигенный белок вируса. В предпочтительном варианте осуществления антигенный белок представляет собой гликопротеин или нуклеопротеин вируса.

### **Варианты осуществления**

Изобретение обеспечивает также следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой способ индукции иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий:

a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

Вариант осуществления 2 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 1, где композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.

Вариант осуществления 3 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 1, где композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой бустерную композицию.

Вариант осуществления 4 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-3, где индуцированный иммунный ответ включает индуцированный иммунный ответ антител против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.

Вариант осуществления 5 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 4, где индуцированный иммунный ответ антител определяют методом ELISA.

Вариант осуществления 6 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-3, где индуцированный иммунный ответ включает индуцированный клеточный иммунный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.

Вариант осуществления 7 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 6, где индуцированный клеточный иммунный ответ определяют методом ICS или методом ELISPOT.

Вариант осуществления 8 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-7, где индуцированный иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет субъекту-человеку против заболевания, связанного с по меньшей мере одним из первого и второго антигенных белков.

Вариант осуществления 9 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-8, где IVT репРНК представляет собой репРНК на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE).

Вариант осуществления 10 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-9, где аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 26 (Ad26) или вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 35 (Ad35).

Вариант осуществления 11 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-10, где бустерную композицию вводят через 1-52 недели после введения примирующей композиции.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-11, где бустерную композицию вводят по меньшей мере через 1 неделю после введения примирующей композиции.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-12, где первый или второй антигенный белок происходит из патогена или опухоли.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-12, где первый или второй антигенный белок происходит из вируса.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 14, где первый или второй антигенный белок происходит из пневмовируса, филовируса, ВИЧ, вируса денге, вируса зика, вируса гриппа или вируса гепатит В.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-15, где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-16, где первый или второй антигенный белок происходит из F белка до слияния из респираторно-синцитиального вируса (RSV-preF), и где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 17, где первый и второй антигенные белки, каждый независимо, включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, их иммуногенные полипептиды и их комбинации.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 18, где IVT репРНК включает полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и его иммуногенные полипептиды.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 21, где IVT репРНК включает полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 20, где аденовирусный вектор включает полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и его иммуногенные полипептиды.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-21, где IVT репРНК вводят в виде композиции липидных наночастиц в количестве 0,1-1000 мкг IVT репРНК на дозу.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 1-22, где аденовирусный вектор вводят в количестве  $10^9$ - $10^{12}$  вирусных частиц на дозу.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ индукции иммунного ответа против по меньшей мере одного субтипа пневмовируса у субъекта-человека, включающий:

а. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок по меньшей мере одного субтипа пневмовируса или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

б. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок по меньшей мере одного субтипа пневмовируса или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа против по меньшей мере одного субтипа пневмовируса у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примиряющей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

Вариант осуществления 25 представляет собой комбинацию для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающую:

а. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

б. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где одну из композиций вводят субъекту-человеку для примирения иммунного ответа, а другую композицию вводят субъекту-человеку для усиления иммунного ответа,

где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту.

Вариант осуществления 26 представляет собой применение комбинации для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающего:

а. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где одну из композиций вводят субъекту-человеку для примирования иммунного ответа, а другую композицию вводят субъекту-человеку для усиления иммунного ответа,

где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примиряющую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой примиряющую композицию, а композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой бустерную композицию.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из патогена или опухоли.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из вируса.

Вариант осуществления 31 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где первый или второй антигенный белок происходит из RSV-preF белка, и где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

Вариант осуществления 32 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где первый и второй антигенные белки, каждый независимо, включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, их иммуногенные полипептиды и их комбинации.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где IVT репРНК включает полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и его иммуногенные полипептиды.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где аденовирусный вектор включает полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и его иммуногенные полипептиды.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где IVT репРНК представляет собой репРНК на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE).

Вариант осуществления 36 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 24, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 25 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 26, где аденовирусный вектор представляет собой Ad26 вектор или Ad35 вектор.

Вариант осуществления 37 представляет собой способ индукции иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий:

a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей полинуклеотид, кодирующий неструктурные белки вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), и другой полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество Ad26 вектора или Ad35 вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа у субъекта-человека, где пер-

вый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и первая композиция является примирующей композицией, а вторая композиция является бустерной композицией.

Вариант осуществления 38 представляет собой комбинацию для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающую:

a. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей полинуклеотид, кодирующий неструктурные белки вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), и другой полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и

b. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество Ad26 вектора или Ad35 вектора, включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и первая композиция является примирующей композицией, а вторая композиция является бустерной композицией.

Вариант осуществления 39 представляет собой применение комбинации в соответствии с Вариантом осуществления 38 для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа у субъекта-человека.

Вариант осуществления 40 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 37, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 38 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 39, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из патогена или опухоли.

Вариант осуществления 41 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 38, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 39 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 40, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из вируса.

Вариант осуществления 42 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 37, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 38 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 39, где первый или второй антигенный белок происходит из RSV-preF белка, и где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

Вариант осуществления 43 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 37, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 38 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 39, где первый и второй антигенные белки, каждый независимо, включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, их иммуногенные полипептиды и их комбинации.

Вариант осуществления 44 представляет собой способ в соответствии с Вариантом осуществления 37, комбинацию в соответствии с Вариантом осуществления 38 или применение в соответствии с Вариантом осуществления 39, где первая композиция включает иммунологически эффективное количество IVT репРНК, имеющей последовательность SEQ ID NO: 3, а вторая композиция включает иммунологически эффективное количество Ad26 вектора, включающего полинуклеотид, кодирующий антигенный белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 45 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 37-44, комбинацию в соответствии с любым из Вариантов осуществления 38-44 или применение в соответствии с любым из Вариантов осуществления 39-44, где вторую композицию вводят субъекту-человеку через 2-12 недель, предпочтительно через 4-8 недель, после введения первой композиции.

Вариант осуществления 46 представляет собой способ в соответствии с любым из Вариантов осуществления 38 или 41-45, комбинацию в соответствии с любым из Вариантов осуществления 39 или 41-45 или применение в соответствии с любым из Вариантов осуществления 40-45, где первую композицию формулируют в виде композиции липо-наночастиц.

### Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации, а не для ограничения заявленного изобретения.

#### Пример 1.

Исследование на животных осуществляли с целью изучения потенциала гомологичных прайм-буст иммунизации вакцинами на основе репРНК, кодирующими модельный антиген. Модельный антиген, который использовали, представлял собой F-белок до слияния из респираторно-синцитиального вируса (RSV-preF). В исследовании испытывали диапазон доз гомологичных вакцинаций с интервалом между иммунизациями 4 недели.

Манипуляции с животными.

Исследования соответствовали всем применимым разделам окончательных положений Закона о благополучии животных (9 CFR, части 1, 2 и 3) и Руководства по уходу и использованию лабораторных

животных - National Academy Press, Washington D.C. Восьмое издание (Руководство).

Закупали в общей сложности 30 (6-недельных) самок Balb/c мышей у Jackson laboratories.

Материалы для вакцин.

IVT репРНК вакцинный вектор, который использовали, схематически представлен на фиг. 1. IVT репРНК вектор состоял из двух открытых рамок считывания (ORF), где первая кодировала неструктурные белки (NSPs) вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), а вторая кодировала RSV-preF белок. IVT репРНК вектор получали с использованием способами *in vitro* транскрипции (IVT) и очистки. Вкратце, линейную матричную ДНК для *in vitro* транскрипции T7 получали путем расщепления репликон-несущей ДНК плазмиды 5' промотора T7 и 3' поли-А хвоста. Расщепленный продукт очищали с использованием набора Zymo DNA Clean & Concentrator®-25. IVT репРНК получали с использованием набора для транскрипции T7 Ambion MEGAscript™ (Thermo) с последующей стадией очистки методом ВЭЖХ с использованием колонки GE CaptoCore 700 Hi Screen для удаления компонентов буфера, свободных NTP и белков. После очистки IVT репРНК экпировали с использованием посттранскрипционной ферментативной реакции экпирования, используя набор для экпирования от Cellscript, после этого РНК концентрировали в концентраторе-центрифуге и осуществляли буферный обмен до конечной концентрации 1-5 мкг/мл. Композицию репРНК в липидных наночастицах (LNP) получали способом разведения в этаноле. Холестерин получали от Sigma-Aldrich, а 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанол амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG) получали от Avanti Polar Lipids. Липидные компоненты (в этаноле) при 48:40:10:2 молярных процентов холестерин:DOTAP:DSPC:DSPE-PEG смешивали с репРНК в 10 мМ цитратного буфера с использованием 8:1 молярного соотношения N:P (азот на DOTAP к фосфату на РНК). После эмульгирования в течение 1 часа частицы диализовали против PBS. Перед *in vivo* инъекциями частицы дополнительно разбавляли до требуемой концентрации РНК в PBS.

IVT репРНК экспрессировала VEE вирусные репликазы и антигенный RSV-preF белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Последовательность матричной ДНК, используемая для получения IVT репРНК, имела нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вакцинация и план эксперимента.

Balb/c мышей вакцинировали в соответствии со схемой гомологичной прайм-буст иммунизации с использованием репРНК (разделение на группы и план эксперимента см. в табл. 1 и на фиг. 2). Перед иммунизацией каждую мышью анестезировали 1-4% изофлураном в кислороде с использованием наркозного аппарата для грызунов, и животные получали внутримышечные (в/м) инъекции сформулированной в липидных наночастицах(LNP) репРНК (50 мкл). Примирующие и бустерные дозы вводили с 4-недельным интервалом (фиг. 2).

Цельную кровь без антикоагулянта обрабатывали для получения сыворотки.

Каждую сыворотку анализировали в RSV preF-специфическом ELISA.

Таблица 1

Разделение животных на группы в эксперименте гомологичной репРНК иммунизации для исследования гуморальных ответов

ГРУППЫ ЖИВОТНЫХ (Balb/c)	ВАКЦИНА	НОСИТЕЛЬ	ИММУНИЗАЦИИ (НЕДЕЛИ)	ДОЗА (МКГ)	КОЛИЧЕСТВО ЖИВОТНЫХ/ГРУППА
1-4	РЕПРНК-RSV-pref	LNP	0, 4	5, 1, 0,4, 0,02	6
5	НЕТ	LNP	0, 4	0	6

ELISA анализ анти-RSV-F IgG.

RSV-F-специфические гуморальные ответы определяли через 28 и 42 дней после иммунизации с использованием модифицированного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), как описано ранее в Krarup et al. (A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. Nat. Commun. 6:8143).

Вкратце, MaxiSorp полистирольные 96-луночные планшеты (NUNC) покрывали человеческим анти-RSV F моноклональным антителом (Synagis) в течение ночи при 4°C при концентрации 1 мкг/мл в PBS. На следующий день планшеты промывали промывочным буфером PBST (PBS, 0,05% Tween) и блокировали в PBS раствором 1% бычьего сывороточного альбумина с последующей инкубацией со стабилизированным F-белком до слипания (0,25 мкг/мл в PBST), который захватывался иммобилизованными анти-RSV F антителами.

Образцы сыворотки разбавляли в PBST раствором 1% бычьего сывороточного альбумина и инкубировали с конъюгатом козлийное-антимышиное-IgG-HRP от Bio-Rad (1/5000 разведение в PBST) и образцы затем инкубировали в лунках для обеспечения возможности детекции RSV-F специфического мышинового IgG. OPD субстрат использовали для детекции. Все инкубации осуществляли при комнатной

температуре в течение 1 часа. После каждой стадии планшеты промывали три раза PBST. Результаты анализа ELISA показаны на фиг. 3. Примирующие иммунизации с дозами 0,4 мкг или выше приводили к гуморальным иммунным ответам, имеющим определяемые титры IgG, а гомологичная бустер-иммунизация приводила только к очень незначительному повышению титров IgG (перекрестная доза).

#### Пример 2.

Для исследования клеточных ответов после гомологичной репРНК бустер-иммунизации осуществляли испытание на животных, в котором спленоциты анализировали методом ELISPOT с использованием RSV-F специфического пептида.

#### Манипуляции с животными.

Исследования соответствовали всем применимым разделам окончательных положений Закона о благополучии животных (9 CFR, части 1, 2 и 3) и Руководства по уходу и использованию лабораторных животных - National Academy Press, Washington D.C. Восьмое издание (Руководство).

Самок Balb/c мышей (6-недельных) закупили у Jackson laboratories.

#### Материалы для вакцин.

IVT репРНК получали и формулировали, как описано в Примере 1.

#### Вакцинация и план эксперимента.

Balb/c мышей вакцинировали в соответствии со схемой гомологичной прайм-буст иммунизации с использованием репРНК (разделение на группы и план эксперимента см. в табл. 2 и на фиг. 4). Перед иммунизацией каждую мышшь анестезировали 1-4% изофлураном в кислороде с использованием наркозного аппарата для грызунов, и животные получали внутримышечные (в/м) инъекции сформулированной в липидных наночастицах(LNP) репРНК (50 мкл). Примирующие и бустерные дозы вводили с 4-недельным интервалом (фиг. 4).

Через 6 недель всех мышшь умерщвляли для получения спленоцитов для исследования в IFN-g ELISPOT анализе с использованием анализа RSV-F специфического CTL пептида KYKNAVTEL.

Таблица 2

Разделение животных на группы для гомологичной репРНК иммунизации (в/м) для исследования клеточных ответов

Группа	Примирующая иммунизация	Бустер-иммунизация 1 (4нед.)	Доза репРНК (мкг)	Количество мышшь /группа	Вакцинация недели
1	PBS	-		4	0,6†
2	репРНК	-	1	10	0,6†
3	репРНК	репРНК	1	10	0,4, 6†

#### ELISPOT Анализ IFN-g.

RSV-F-специфические клеточные иммунные ответы с использованием спленоцитов определяли в точке времени, показанной на фиг. 4, интерферон-гамма иммуноферментным спот-анализом (ELISPOT) с использованием IFN $\gamma$  ELISPOT набора для мышшиных клеток от BD. Вкратце, 500000 спленоцитов на лунку стимулировали в течение ночи CTL-активирующим RSV-F пептидом (KYKNAVTEL) при конечной концентрации 1 мкг/мл. Затем пятна проявляли, следуя инструкциям изготовителя, прилагаемым к набору. Результаты ELISPOT анализа показаны на фиг. 5, и они показывают, что клеточные ответы только незначительно усиливались (без статистической значимости) после бустер-иммунизации.

#### Пример 3.

Из-за отсутствия бустерного потенциала IVT репРНК вакцины в гомологичном прайм-буст режиме испытание на животных осуществляли с целью исследования потенциала гетерологичных прайм-буст иммунизации с вакцинами на основе репРНК в комбинации с вакцинами на аденовирусной основе, которые обе кодируют модельный антиген. В частности, в исследовании испытывали две гетерологичные вакцинации, включающие репРНК и Ad26-RSV-F с интервалом между иммунизациями 4 недели, для определения, может ли гетерологичная прайм-буст вакцинация улучшать гуморальный или клеточный иммунные ответы по сравнению с гомологичной репРНК вакцинацией Примеров 1 и 2.

#### Манипуляции с животными.

Исследования соответствовали всем применимым разделам окончательных положений Закона о благополучии животных (9 CFR, части 1, 2 и 3) и Руководства по уходу и использованию лабораторных животных - National Academy Press, Washington D.C. Восьмое издание (Руководство).

В общей сложности 36 самок Balb/c мышшь (6-недельных) закупили у Jackson laboratories.

#### Материалы для вакцин.

IVT репРНК получали и формулировали, как описано в Примере 1.

Рекомбинантный аденовирусный вектор, который представлял собой вакцинный вектор на основе очищенного E1/E3-делетированного дефицитного по репликации рекомбинантного аденовируса типа 26 (Ad26), содержащий RSV-F ген, встроенный в положении E1, был изготовлен Janssen R&D. Вектор сохраняли в PER.C6™ клетках, очищали от бляшек, масштабировали и затем очищали с использованием

двухстадийной процедуры CsCl-связывания, а затем формулировали в рецептурном буфере на основе TRIS и хранили при температуре ниже  $-65^{\circ}\text{C}$ .

Рекомбинантный аденовирусный вектор экспрессировал RSV-F, происходящий из штамма RSV-A2. Экспрессированный RSV-F белок имел аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Материалы для вакцин хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в морозильнике с контролируемой температурой.

Вакцинация и план эксперимента.

Valb/c мышей вакцинировали, используя схему гетерологичной прайм-буст иммунизации, с использованием репПНК и Адено-вектора (разделение на группы и план эксперимента см. в табл. 3 и на фиг. 6). Перед иммунизацией каждую мышь анестезировали, и животные получали внутримышечные (в/м) инъекции Адено-вектора или сформулированной в липидных наночастицах (LNP) репПНК (как описано в Примере 1) в верхнюю часть бедра. Примирующие и бустерные дозы вводили с 4-недельным интервалом (Фиг. 6).

Исследование на животных осуществляли для определения, может ли гетерологичная прайм-буст вакцинация с использованием репПНК и Ad26-RSV-F улучшать гуморальный или клеточный иммунные ответы (разделение мышей на группы см. в табл. 3, а план эксперимента см. на фиг. 6) в отличие от гомологичной репПНК вакцинации, как продемонстрировано Примерами 1 и 2. Все иммунизации осуществляли внутримышечно. Три контрольные группы мышей получали только примирующие иммунизации (в/м) с использованием либо PBS, LNP-сформулированной репПНК (1 мкг), либо Ad26-RSV-F ( $1 \times 10^9$  vp). Потенциал гетерологичных прайм-буст иммунизации испытывали в двух дополнительных группах мышей. Одной группе из 8 мышей вводили LNP-сформулированную репПНК (1 мкг) в качестве примирующей иммунизации и через 4 недели вводили бустер-иммунизацию Ad26-RSV-F ( $1 \times 10^9$  vp). Другой группе из 8 мышей вводили Ad26-RSV-F ( $1 \times 10^9$  VP) в качестве примирующей иммунизации с последующей бустер-иммунизацией через 4 недели с LNP-сформулированной репПНК (1 мкг).

Таблица 3

Разделение животных на группы в эксперименте для исследования гетерологичной иммунизации

Группы	ПРИМИРУЮЩАЯ ИММУНИЗАЦИЯ	БУСТЕР-ИММУНИЗАЦИЯ 1 (4 нед.)	ДОЗА АДЕНОВО (VP)	ДОЗА РЕПРН К (МКГ)	КОЛИЧЕСТВО МЫШЕЙ /ГРУППА	ВАКЦИНАЦИЯ НЕДЕЛИ
1	PBS	PBS	-	-	4	0, 6+
2	РЕПРНК	-	-	1	8	0, 6+
3	АДЕНОВИРУС	-	$10^9$	-	8	0, 6+
4	РЕПРНК	АДЕНОВИРУС	$10^9$	1	8	0, 4, 6+
5	АДЕНОВИРУС	РЕПРНК	$10^9$	1	8	0, 4, 6+

ELISA анализ анти-RSV-F IgG.

RSV-F-специфические гуморальные ответы определяли через 42 дня после иммунизации методом ELISA для определения анти-RSV-F IgG, как описано в Примере 1. Результаты анализа ELISA показаны на фиг. 7. Гетерологичные прайм-буст иммунизации с использованием репПНК и аденовирусного вектора приводили к гуморальным иммунным ответам, имеющим повышенные титры IgG, по сравнению с гомологичными иммунизациями с использованием репПНК или аденовирусного вектора.

ELISPOT Анализ IFN- $\gamma$ .

RSV-F-специфические клеточные (спленоциты) иммунные ответы определяли через 42 дня после иммунизации при помощи интерферон-гамма ELISPOT анализа, как описано в Примере 2. Результаты ELISPOT анализа показаны на фиг. 8. Гетерологичные прайм-буст иммунизации с использованием репПНК и аденовирусного вектора приводили к повышенным клеточным иммунным ответам по сравнению с только примирующими иммунизациями с использованием репПНК или аденовирусного вектора.

Таким образом, исследование продемонстрировало, что усиление гуморального и клеточного иммунного ответа было индуцировано иммунизацией гетерологичными вакцинами на основе репПНК и аденовирусных векторов по сравнению с гомологичными иммунизациями с использованием только репПНК или только аденовирусного вектора.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что возможны изменения описанных выше вариантов осуществления без отступления от их широкого изобретательского замысла. Поэтому должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции иммунного ответа у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий:
  - a. введение субъекту-человеку первой композиции, включающей иммунологически эффективное количество *in vitro* транскрибированной (IVT) самореплицирующейся РНК (репРНК), включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, где IVT репРНК сформулированы в невирионные частицы, и
  - b. введение субъекту второй композиции, включающей иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, представляющего собой вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 26 (Ad26) или вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 35 (Ad35), включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,для достижения таким образом индуцированного иммунного ответа у субъекта-человека, где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.
2. Способ по п.1, где композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.
3. Способ по п.1, где композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой бустерную композицию.
4. Способ по любому из пп.1-3, где индуцированный иммунный ответ включает индуцированный иммунный ответ антител против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.
5. Способ по любому из пп.1-3, где индуцированный иммунный ответ включает индуцированный клеточный иммунный ответ против по меньшей мере одной антигенной детерминанты, являющейся общей для первого и второго антигенных белков, у субъекта-человека.
6. Способ по любому из пп.1-5, где индуцированный иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет субъекту-человеку против заболевания, связанного с по меньшей мере одним из первого и второго антигенных белков.
7. Способ по любому из пп.1-6, где IVT репРНК представляет собой репРНК на основе вируса венецуэльского энцефалита лошадей (VEE).
8. Способ по любому из пп.1-7, где бустерную композицию вводят через 1-52 недели после введения примирующей композиции.
9. Способ по любому из пп.1-8, где бустерную композицию вводят по меньшей мере через 1 неделю после введения примирующей композиции.
10. Способ по любому из пп.1-9, где первый и второй антигенные белки происходят из патогена или опухоли.
11. Способ по любому из пп.1-10, где первый или второй антигенный белок происходит из вируса.
12. Способ по любому из пп.1-11, где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.
13. Комбинация для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающая:
  - a. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, где IVT репРНК сформулированы в невирионные частицы, и
  - b. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, представляющего собой вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 26 (Ad26) или вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 35 (Ad35), включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.
14. Применение комбинации для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа у субъекта-человека, включающей:
  - a. первую композицию, включающую иммунологически эффективное количество IVT репРНК, включающей первый полинуклеотид, кодирующий первый антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, где IVT репРНК сформулированы в невирионные частицы, и



в. вторую композицию, включающую иммунологически эффективное количество аденовирусного вектора, представляющего собой вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 26 (Ad26) или вектор на основе рекомбинантного человеческого аденовируса серотипа 35 (Ad35), включающего второй полинуклеотид, кодирующий второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид, вместе с фармацевтически приемлемым носителем,

где первый и второй антигенные белки имеют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту, и одна из композиций является примирующей композицией, а другая композиция является бустерной композицией.

15. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой бустерную композицию.

16. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где композиция, включающая аденовирусный вектор, представляет собой примирующую композицию, а композиция, включающая IVT репРНК, представляет собой бустерную композицию.

17. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из патогена или опухоли.

18. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где первый или второй антигенный белок или его иммуногенный полипептид происходит из вируса.

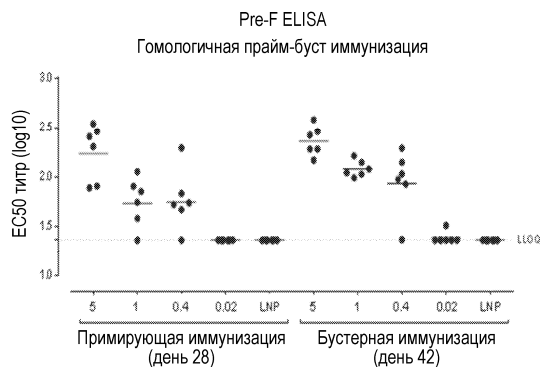
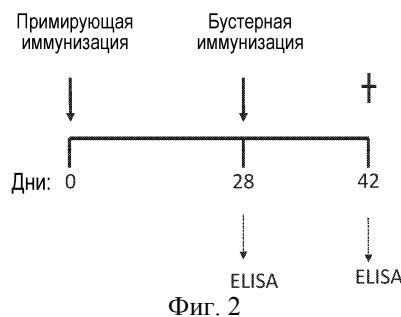
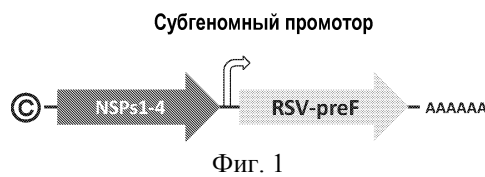
19. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где первый и второй антигенные белки являются идентичными или по существу идентичными.

20. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где IVT репРНК представляет собой репРНК на основе VEE-вируса.

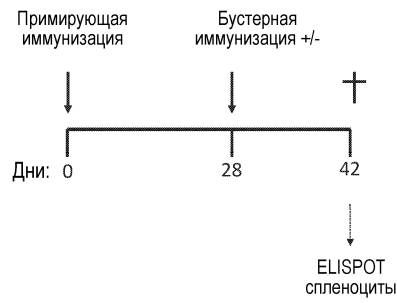
21. Способ по любому из пп.1-12, где невирусные частицы представляют собой липидные наночастицы (LNP).

22. Комбинация по п.13 или применение по п.14, где невирусные частицы представляют собой липидные наночастицы (LNP).

#### репРНК конструкция на основе Vee

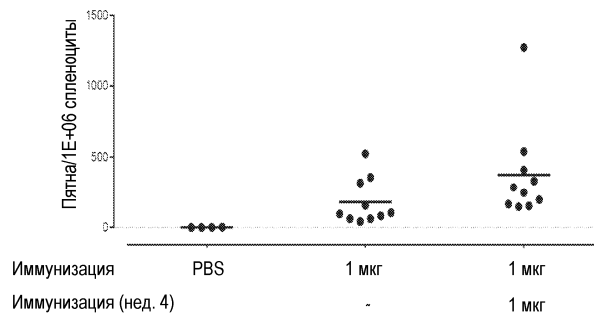


043316

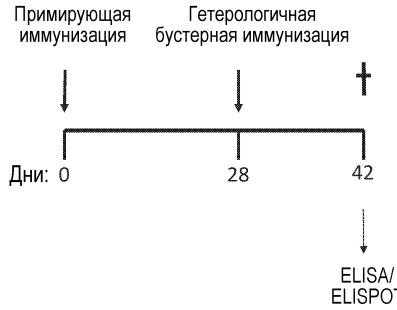


Фиг. 4

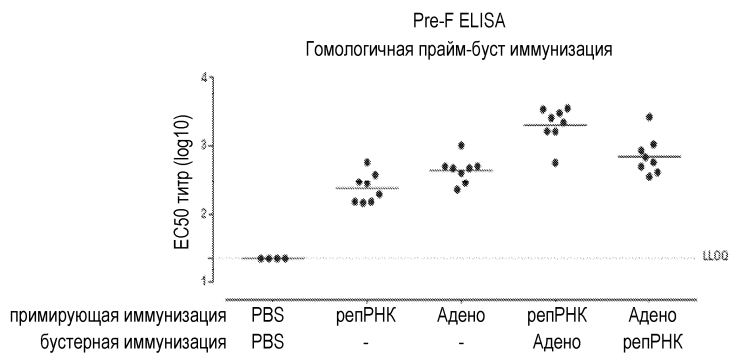
**ELISPOT количество (IFN+)**  
Гомологичная прайм-буст иммунизация



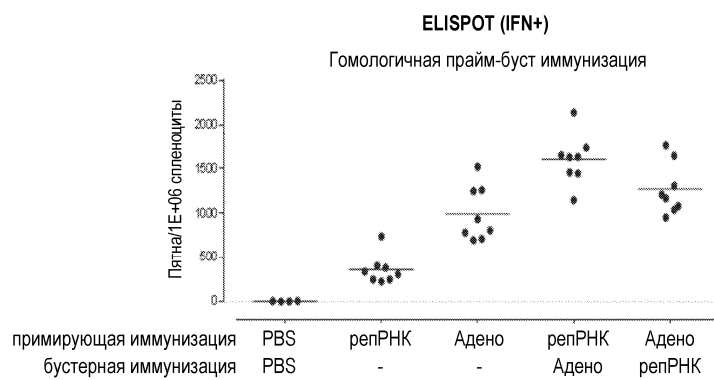
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

