

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045279**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.10

(21) Номер заявки
202091513

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(51) Int. Cl. *A61K 39/29* (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/IB2017/058142; 62/607,426

(32) 2017.12.19

(33) IB; US

(43) 2020.09.09

(86) PCT/IB2018/060259

(87) WO 2019/123252 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE)**

(72) Изобретатель:
**Бодан Даниель, Хортон Хелен, Нефс
Жан-Марк Эдмон Фернан Мари (BE),
Рой Соумитра (NL), Де Потер Дорин
(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) WO-A1-2013007772

BOUKHEBZA HOUDA ET AL:
"Comparative analysis of immunization schedules
using a novel adenovirus-based immunotherapeutic
targeting hepatitis B in naive and tolerant mouse
models", VACCINE, vol. 32, no. 26, 2014, pages
3256-3263, XP028654151, ISSN: 0264-410X, DOI:
10.1016/J.VACCINE.2014.03.089 page 3257, column
1

WO-A1-2017176319

WO-A1-2008093976

SCOTT A JONES ET AL: "Hepatitis B virus
reverse transcriptase: diverse functions as classical
and emerging targets for antiviral intervention",
EMERGING MICROBES & INFECTIONS, vol. 2,
no. 9, 1 September 2013 (2013-09-01), pages e56-e56,
XP055473467, DOI: 10.1038/emi.2013.56 figure 2
WO-A1-9503777

(57) Описаны полинуклеотиды, кодирующие ядерный антиген и полимеразный антиген вируса гепатита В (HBV), и связанные с ними комбинации. Также описаны векторы, такие как ДНК-плазмиды или вирусные векторы, экспрессирующие ядерный и полимеразный антигены HBV, и иммуногенные композиции, содержащие векторы экспрессии. Также описаны способы индукции иммунного ответа на HBV или лечения HBV-индуцированного заболевания, особенно у людей с хронической HBV-инфекцией, с помощью иммуногенных композиций.

B1

045279

045279

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет международной заявки на патент PCT/IB2017/058142, поданной 19 декабря 2017 г., и временной заявки на патент США 62/607,426, поданной 19 декабря 2017, раскрытия которых полностью включены в настоящее описание в виде ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленных в электронной версии

Эта заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с названием файла "688097-403 Sequence Listing" и датой создания 10 декабря 2018 года размером 46,6 кБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание в виде ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой небольшой гепатотропный вирус с ДНК размером 3,2 т.п.н., которая кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Вирусом гепатита В инфицированы около двух миллиардов человек, и около 240 миллионов человек страдают от хронической инфекции гепатита В (хронического HBV), которая характеризуется персистирующими вирусными и субвирусными частицами в крови в течение более 6 месяцев (1). Персистирующая HBV инфекция приводит к истощению Т-клеток среди HBV-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток в кровотоке и внутри печени через хроническую стимуляцию HBV-специфических Т-клеточных рецепторов вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате полифункциональность Т-клеток снижается (т.е. снижаются уровни IL-2, фактора некроза опухоли (TNF)- α , IFN- γ и отсутствует пролиферация).

Безопасная и эффективная профилактическая вакцина против HBV инфекции доступна с 1980-х годов и является основой профилактики гепатита В (3). Всемирная организация здравоохранения рекомендует вакцинацию всех детей грудного возраста, а в странах с низкой или промежуточной эндемичностью гепатита В - вакцинацию всех детей и подростков (<18 лет), а также людей определенных групп риска. Благодаря вакцинации уровень заболеваемости во всем мире резко снизился. Тем не менее, профилактические вакцины не приводят к излечению опосредуемой HBV инфекции.

Хронический HBV в настоящее время лечат IFN- α и нуклеозидными или нуклеотидными аналогами, которые не приводят к окончательному излечению из-за персистенции в инфицированных гепатоцитах внутриклеточных вирусных репликативных промежуточных форм, называемых ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК, сссDNA), которая играет фундаментальную роль в качестве матрицы для вирусных РНК и, следовательно, новых вирионов. Считается, что индуцированные вирус-специфические Т-клеточные и В-клеточные ответы могут эффективно устранять гепатоциты, несущие кзкДНК. Современные методы лечения, нацеленные на HBV-полимеразу, подавляют виремию, но оказывают ограниченное действие на кзкДНК, которая находится в ядре, и связанное с этим продуцирование циркулирующего антигена. Наиболее радикальной формой лечения может быть удаление сссDNA HBV из организма, что не происходит естественным образом, ни в результате какого-либо терапевтического вмешательства. Однако потеря поверхностных антигенов HBV (HBsAg) является клинически достоверным эквивалентом излечения, поскольку рецидив заболевания может произойти только в случаях тяжелой иммуносупрессии, которую затем можно предотвратить с помощью профилактического лечения. Таким образом, по меньшей мере с клинической точки зрения потеря HBsAg связана с наиболее полной формой восстановления иммунитета против HBV.

Например, иммуномодуляция пегилированным интерфероном (pegIFN)- α оказалась более эффективной по сравнению с нуклеозидной или нуклеотидной терапией с точки зрения наличия длительного ответа после конечного курса лечения. Имеются сообщения о том, что помимо прямого противовирусного эффекта IFN- α оказывает эпигенетическое подавление кзкДНК в клеточной культуре и в организме гуманизированных мышей, что приводит к снижению продуктивности вирионов и транскриптов (4). Тем не менее, такая терапия все еще чревата побочными эффектами, и общий ответ все еще остается довольно низким, отчасти потому, что IFN- α оказывает только слабое модулирующее действие на HBV-специфические Т-клетки. В частности, показатели эффективности лечения остаются низкими (<10%), а токсичность - высокой. Аналогичным образом, противовирусные препараты HBV прямого действия, а именно ингибиторы HBV-полимеразы, энтекавир и тенофовир, эффективны в качестве монотерапии для индукции супрессии вируса и обладают высоким генетическим барьером к появлению устойчивых к лекарственным средствам мутантов и для последующей профилактики прогрессирования заболеваний печени. Однако лечение хронического гепатита В, определяемое потерей HBsAg или сероконверсией, редко достигается с помощью таких ингибиторов HBV-полимеразы. Следовательно, чтобы предотвратить повторное заболевание печени, теоретически, эти противовирусные препараты необходимо вводить в течение неопределенного срока аналогично противовирусной терапии, направленной против вируса иммунодефицита человека (HIV).

Терапевтическая вакцинация имеет потенциал для устранения HBV у хронически инфицированных пациентов (5). Были изучены многие стратегии, но до настоящего времени терапевтическая вакцинация не была успешной.

Сущность изобретения

Соответственно, существует неудовлетворенная медицинская потребность в лечении вируса гепатита В (HBV), в частности хронического HBV, конечного хорошо переносимого лечения с более высоким показателем выздоровления. Изобретение позволяет удовлетворить эту потребность путем разработки иммуногенных композиций и способов индукции иммунного ответа на инфекцию вирусом гепатита В (HBV). Иммуногенные композиции и способы по изобретению можно использовать для формирования терапевтического иммунитета у субъекта, такого как субъект, страдающий хронической HBV инфекцией.

В общем аспекте изобретение относится к не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген HBV, такой как укороченный ядерный антиген HBV или антиген-полимераза HBV. Антиген HBV в соответствии с вариантом осуществления изобретения представляет собой консенсусный антиген, способный индуцировать иммунный ответ (гуморальный и клеточный) у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV, предпочтительно индуцируя Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV, более предпочтительно, CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

В одном из вариантов осуществления не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, и не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15. Предпочтительно, не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

В одном из вариантов осуществления не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н. Предпочтительно, полимеразный антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Более предпочтительно, не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, наиболее предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, предпочтительно ДНК-плазмиде или вирусному вектору, содержащему не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к не встречающемуся в природе полипептиду, кодируемому не встречающейся в природе молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению.

В еще одном общем аспекте заявка относится к композиции, содержащей по меньшей мере один компонент из числа: не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и не встречающегося в природе полипептида по изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте изобретение относится к иммуногенной комбинации, в частности, к набору, содержащему:

(a) первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н;

(b) вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель,

причем первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты или в двух разных не встречающихся в природе молекулах нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобретению содержит первый полинуклеотид, присутствующий в первом векторе, и второй полинуклеотид, присутствующий во втором векторе. Предпочтительно, первый вектор отличается от второго вектора. Более предпочтительно вектор представляет собой плазмидный вектор или вирусный вектор. Более предпочтительно, каждый из первого вектора и второго вектора представляет собой ДНК-плазмидный вектор.

В одном из вариантов осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобре-

нию содержит:

- а) первый ДНК - плазмидный вектор, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
 - б) второй ДНК-плазмидный вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или 14; и
 - в) фармацевтически приемлемый носитель,
- причем каждый из первого ДНК-плазмидного вектора и второго ДНК-плазмидного вектора дополнительно содержит ген резистентности к антибиотику и точку начала репликации, и
- причем первый ДНК-плазмидный вектор и второй ДНК-плазмидный вектор присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

В конкретном варианте осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобретению содержит:

- а) первый ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

- б) второй ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

- в) фармацевтически приемлемый носитель,
- причем каждый из первого ДНК-плазмидного вектора и второго ДНК-плазмидного вектора дополнительно содержит ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, и точку начала репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и

причем первый ДНК-плазмидный вектор и второй ДНК-плазмидный вектор присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

В других вариантах осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобретению содержит первый полинуклеотид и второй полинуклеотид, присутствующие в одном и том же векторе. Предпочтительно вектор представляет собой плазмидный вектор или вирусный вектор. Более предпочтительно, вектор представляет собой аденовирусный вектор, такой как вектор Ad26 или Ad35.

В одном из вариантов осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобретению содержит:

- а) вектор, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и
- б) фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном варианте осуществления иммуногенная комбинация, в частности, набор, по изобретению содержит вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор, содержащий, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, и фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты изобретения относятся к способам получения полинуклеотидов, векторов, полипептидов и композиций и иммуногенных комбинаций или наборов по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу индукции иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению. Предпочтительно, способ индуцирует у субъекта иммунный ответ, такой как гуморальный антител (выработку антител) и/или Т-клеточный ответ, на по меньшей мере два генотипа HBV. Предпочтительно, способ индуцирует

Т-клеточный ответ у субъекта на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV. Более предпочтительно, способ индуцирует CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает введение субъекту другого иммуногенного агента, предпочтительно другого антигена HBV.

В другом аспекте заявка относится к способу лечения заболевания, вызванного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению. Предпочтительно, субъект имеет хроническую HBV инфекцию, и заболевание, вызванное HBV, выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (НСС). В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает введение субъекту другого терапевтического агента, предпочтительно другого анти-HBV антигена.

Изобретение также относится к композиции, иммуногенной комбинации или набору по изобретению для применения в индукции иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV); и применению композиции, иммуногенной комбинации или набора по изобретению в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV). Применение может дополнительно включать комбинацию с другим иммуногенным агентом, предпочтительно другим антигеном HBV. Предпочтительно, субъект страдает хронической HBV инфекцией.

Кроме того, изобретение относится к композиции, иммуногенной комбинации или набору для применения в лечении HBV-индуцированного заболевания у нуждающегося в этом субъекта; и применению композиции, иммуногенной комбинации или набора в получении лекарственного средства для лечения у нуждающегося в этом субъекта заболевания, вызванного HBV. Применение может дополнительно включать комбинацию с другим терапевтическим агентом, предпочтительно другим анти-HBV антигеном. Предпочтительно, субъект страдает хронической HBV инфекцией, и заболевание, вызванное HBV, выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (НСС).

Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из приведенного ниже раскрытия, включая подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления и прилагаемую формулу изобретения.

Краткое описание чертежей

Для более полного понимания вышеизложенной сути изобретения, а также приведенного ниже подробного описания изобретения предоставлены прилагаемые чертежи. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, приведенными на чертежах.

На чертежах:

на фиг. 1А-1В изображен геном и жизненный цикл вируса гепатита В; на фиг. 1А приведено схематическое представление генома вируса гепатита В (HBV); в нативном вирусе белок полимеразы (Pol) содержит последовательность, кодирующую белки оболочки в другой открытой рамке считывания; белки оболочки (pre-S1, pre-S2 и S) находятся в одной открытой рамке считывания; на фиг. 1В показан жизненный цикл вируса HBV;

на фиг. 2А-2Н показана конструкция и оптимизация экспрессионных кассет и ДНК-плазмид, кодирующих pol и core антигены HBV, описанные в примере 1; фиг. 2А является схематическим представлением стратегии экспрессии, согласно которой кодирующие последовательности core и pol антигенов HBV слиты в рамке считывания; фиг. 2В является схематическим представлением стратегии экспрессии, согласно которой кодирующие последовательности как core, так и pol антигенов экспрессируются из одной плазмиды благодаря участку FA2 "проскальзывания" рибосомы; фиг. 2С представляет собой схематическое представление стратегии экспрессии, согласно которой core и pol антигены экспрессируются из двух отдельных плазмид; на фиг. 2D показан вестерн-блот экспрессии core антигена в клетках HEK293Т, трансфицированных плазмидой экспрессирующей core с пост-транскрипционным регуляторным элементом WPRE и без него; уровень экспрессии тестировали в клеточном лизате (слева) и супернатанте (выше; справа) с использованием α -core антитела; на фиг. 2Е представлен вестерн-блот анализ, показывающий сравнение экспрессии core в клетках HEK293Т, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей core, включая интронную/экзонную последовательность, полученную из предшественника человеческого аполипопротеина А1 ("интрон А1"), нетранслируемый домен R-U5 длинных концевых повторов (LTR) Т-лимфотропного вируса человека первого типа (HTLV-I) ("HTLV R") или последовательность, состоящую из трех энхансерных последовательностей (тройная энхансерная композитная последовательность) LTR HTLV-1, синтетический интрон Р-глобина кролика и энхансер сплайсинга ("тройной"); полоса без меток представляет собой очищенный core белок в качестве маркера размера; уровень экспрессии тестировали как в лизате (слева), так и в супернатанте (выше; справа); самый высокий уровень экспрессии core антигена показала тройная энхансерная композитная последовательность; фиг. 2F представляет собой вестерн-блот анализ секреции core антигена с использованием разных сигнальных пептидов, слитых с N-концом core антигена HBV; наиболее эффективная секреция белка наблюдалась с сигнальным пептидом цистатина S; фиг. 2G является схематическим представлением оптимизированных экспрессионных кассет HBV core/pol-антигена для каждой из трех стратегий экспрессии, проиллюстрированных на

фиг. 2А-2С; CMVpr: человеческий промотор CMV-IE; TRE: тройная энхансерная последовательность; SP: сигнальный пептид цистатина S; FA2: участок проскальзывания рибосомы FMDV; pA: сигнал полиаденилирования bGH; фиг. 2Н представляет собой вестерн-блот анализ экспрессии core и pol антигена HBV векторов pDK, содержащих каждую из экспрессионных кассет, показанных на фиг. 2G; дорожки 1 и 2: pDK-core; дорожки 3 и 4: pDK-pol; дорожки 5 и 6: pDK-coreFA2Pol; дорожки 7 и 8: слияние pDK-core-pol: наиболее согласованный профиль экспрессии клеточных и секретируемых core и pol-антигенов наблюдался, когда антигены кодировались отдельными векторами;

на фиг. 3А-3В дано схематическое представление ДНК-плазмид в соответствии с вариантами осуществления изобретения; на фиг. 3А показана ДНК-плазида, кодирующая core антиген HBV, в соответствии с вариантом осуществления изобретения; на фиг. 3В показана ДНК-плазида, кодирующая полимеразный (pol) антиген HBV в соответствии с вариантом осуществления изобретения; HBV core и pol антигены экспрессируются под контролем промотора CMV с N-концевым сигнальным пептидом цистатина S, который отщепляется от экспрессированного антигена в процессе секреции из клетки; транскрипционные регуляторные элементы плазмиды включают энхансерную последовательность, расположенную между промотором CMV и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV, и последовательность полиаденилирования bGH, расположенную ниже полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген HBV; вторая экспрессионная кассета включена в плазмиду в обратной ориентации и включает ген резистентности к канамицину под контролем промотора Amp^r (bla); точка начала репликации (pUC) также включена в обратной ориентации;

на фиг. 4 показаны ELISPOT ответы у мышей Balb/c, иммунизированных разными ДНК-плазмидами, экспрессирующими core антиген HBV или pol антиген HBV, как описано в примере 2; пулы пептидов, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных из различных групп вакцинированных животных, показаны серыми столбиками; количество чувствительных Т-клеток показано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10⁶ спленоцитов;

на фиг. 5 показаны ELISPOT ответы у мышей Balb/c, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид, экспрессирующих core антиген HBV и pol антиген HBV, согласно исследованию по определению дозы, описанному в примере 3; пулы пептидов, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных из различных групп вакцинированных животных, показаны серыми столбиками; количество чувствительных Т-клеток показано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10⁶ спленоцитов;

на фиг. 6 показаны ELISPOT ответы у мышей Balb/c, иммунизированных ДНК-плазмидами (pDNA), экспрессирующими core антиген HBV и pol антиген HBV, согласно исследованию по изучению иммунной интерференции, описанному в примере 4; Группа 1, только core pDNA; Группа 2, только Pol pDNA; Группа 3, смешанная Core и Pol pDNA; Группа 4, Core и Pol pDNA, введенные отдельно в разные участки; пулы пептидов, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных из разных вакцинированных групп животных, показаны серыми столбиками; количество чувствительных Т-клеток показано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10⁶ спленоцитов;

на фиг. 7А и 7В показана иммуногенность ДНК-вакцины в соответствии с вариантом осуществления изобретения в NHP, как описано в примере 5; На фиг. 7А показан ответ цитокинов IFN- γ после иммунизации ДНК-плазмидами, экспрессирующими Core и Pol антигены HBV; пулы пептидов, используемые для стимуляции PBMC, выделенных из групп вакцинированных животных, показаны серыми столбиками; количество чувствительных Т-клеток указано на оси у, выраженное в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10⁶ PBMC; на фиг. 7В показан иммунный ответ CD4 и CD8 Т-клеток памяти на пулы пептидов Core, Pol-1 и Pol-2, измеренный методом проточной цитометрии; график показывает результаты, полученные в день 76, в виде % ответа CD4 или CD8 Т-клеток (IFN- γ , IL-2 и TNF- α) в 3 пулах после вычитания из каждого пула фона, создаваемого средой, содержащей только DMSO; ответ CD4 показан слева, а ответ CD8 показан справа;

на фиг. 8А и 8В дано схематическое представление экспрессионных кассет в аденовирусных векторах в соответствии с вариантами осуществления изобретения; На фиг. 8А показана экспрессионная кассета для укороченного ядерного антигена HBV, которая содержит промотор CMV, интрон (фрагмент, полученный из человеческого гена AroAI - пары оснований 295-523 с номером доступа в GenBank X01038, несущий второй интрон AroAI), сигнал секреции человеческого иммуноглобулина, за которым следует последовательность, кодирующая укороченный core антиген HBV и сигнал полиаденилирования SV40; на фиг. 8В показана экспрессионная кассета для слитого белка укороченного ядерного антигена HBV, функционально связанного с полимеразным антигеном HBV, которая в остальной части идентична экспрессионной кассете укороченного ядерного антигена HBV, за исключением этого антигена HBV; и

на фиг. 9 показаны ELISPOT ответы у мышей F1 (C57BL/6xBalb/C), иммунизированных аденовирусными векторами HBV, как описано в примере 8; Пулы ядерных или полимеразных пептидов HBV, используемые для стимуляции спленоцитов, выделенных из разных групп вакцинированных животных, показаны черным (core) и серым (pol); ответы Pol1 и pol12 суммировали; ось X показывает дозу аденовектора и экспериментальные группы. Количество чувствительных Т-клеток показано на оси у, выраженное

в виде пятнообразующих клеток (SFC) на 10 спленоцитов.

Подробное описание изобретения

В разделе уровень техники и в описании приведены ссылки или описаны различные публикации, статьи и патенты; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание в виде ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., включено в настоящее описание для раскрытия контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что каждый из обсуждаемых вопросов является частью предшествующего уровня техники, относящегося к любому раскрытому или заявленному изобретению.

Если не указано иное, все технические и научные термины, которые используются в настоящем описании, имеют те же значения, в которых их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае определенные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, процитированные в настоящем описании, включены в виде ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем описании в виде ссылки.

Следует отметить, что используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу серии. Специалистам в данной области будут очевидны, или они смогут определить при помощи обычных общепринятых экспериментов, множество вариантов осуществления изобретения, эквивалентных раскрытым в настоящем описании. Такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

В настоящем описании и в приведенной ниже формуле изобретения, если из контекста не следует иное, слово "содержать" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", включает указанное целое число или этап или группу целых чисел или этапов, без исключения любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. Термин "содержащий", когда используется в настоящем описании, может быть заменен термином "состоящий" или "включающий" или иногда, когда используется в настоящем описании, термином "имеющий".

Используемый в настоящем описании термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в заявленном элементе.

Используемый в настоящем описании термин "по существу состоящий из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов "содержащий", "состоящий", "включающий" и "имеющий", при каждом использовании в настоящем описании в контексте аспекта или варианта осуществления заявки, может быть заменен термином "состоящий из" или "по существу состоящий из" для изменения объема изобретения.

Используемый в настоящем описании термин "и/или" между несколькими перечисляемыми элементами следует понимать как охватывающий как отдельные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены союзом "и/или", первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Все эти варианты входят в объем указанного значения и, следовательно, удовлетворяют требованию термина "и/или", используемого в настоящем описании. Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из указанных вариантов соответствует указанному значению и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, представленные в настоящем описании, во всех случаях следует рассматривать как модифицированные термином "примерно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает значения от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом, диапазон концентраций от 1 до 10 мг/мл включает от значения 0,9 до 11 мг/мл. В контексте настоящего описания, использование числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в таких диапазонах и дробные значения, если из контекста в явном виде не следует иное.

Фразы "процент (%) идентичности последовательности" или "% идентичности" или "идентичный на %" при использовании со ссылкой на аминокислотную последовательность описывают количество совпадений ("попаданий") идентичных аминокислот двух или более выравненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, используя выравнивание двух или более последовательностей процент аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (например, имеют 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотных последовательностей), можно определить, когда последовательности сравнивают и выравнивают для достижения максимального соответствия, измеренного с помощью алгоритма сравнения

последовательностей, известного в данной области техники, или при выравнивании вручную и путем визуальной инспекции. Последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут, таким образом, отличаться заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Специалисту в данной области известны подходящие программы для выравнивания белковых последовательностей. Процент идентичности последовательности белковых последовательностей можно, например, определить с помощью таких программ, как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с помощью алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

Используемые в настоящем описании термины и фразы "в комбинации", "в комбинации с", "совместная доставка" и "вводятся вместе" в контексте предоставления субъекту двух или более видов терапевтического лечения или компонентов относятся к одновременному применению двух или более методов лечения или компонентов, таких как два вектора, например, ДНК-плазмиды, или иммуногенной комбинации и адьюванта. "Одновременное введение" может означать введение двух компонентов по меньшей мере в течение одного дня. Когда два компонента "вводятся вместе" или "вводятся в комбинации с", их можно вводить в отдельных композициях последовательно через короткие промежутки времени, например 24, 20, 16, 12, 8 или 4 часа, или в течение 1 часа, или их можно вводить в одной композиции в одно и то же время. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок введения терапевтических агентов или компонентов субъекту. Например, первый вид терапевтического лечения или первый компонент (например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген HBV) можно вводить до (например, за от 5-ти минут до одного часа до), параллельно или одновременно или после (например, от 5 минут до одного часа после) предоставления второго вида терапевтического лечения или второго компонента (например, второй ДНК-плазмиды, кодирующей антиген HBV). В некоторых вариантах осуществления первый вид терапевтического лечения или первый компонент (например, первая ДНК-плазида, кодирующая HBV-антиген) и второй вид терапевтического лечения или второй компонент (например, вторая ДНК-плазида, кодирующая HBV-антиген) предоставляются в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления первый вид терапевтического лечения или первый компонент (например, первая ДНК-плазида, кодирующая HBV-антиген) и второй вид терапевтического лечения или второй компонент (например, вторая ДНК-плазида, кодирующая HBV-антиген) предоставляются в разных композициях.

Используемый в настоящем описании термин "не встречающаяся в природе" нуклеиновая кислота или полипептид относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, которые не встречаются в природе. "Не встречающаяся в природе" нуклеиновая кислота или полипептид могут быть синтезированы, обработаны, изготовлены и/или иным образом получены в лабораторных и/или производственных условиях. В некоторых случаях не встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид могут содержать встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту или полипептид, которые обработаны, процессированы или модифицированы с тем, чтобы они смогли проявлять свойства, которые не были свойственны природной нуклеиновой кислоте или полипептиду до обработки. Используемый в настоящем описании термин "не встречающаяся в природе" нуклеиновая кислота или полипептид могут представлять собой нуклеиновую кислоту или полипептид, выделенные или отделенные от природного источника, в котором они были обнаружены, при этом у них отсутствуют ковалентные связи с последовательностями, с которыми они были связаны в природном источнике. "Не встречающаяся в природе" нуклеиновая кислота или полипептид могут быть получены рекомбинантным способом или другими способами, такими как химический синтез.

Используемый в настоящем описании термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека, который получит или получил лечение способом по варианту осуществления изобретения. Используемый в настоящем описании термин "млекопитающее" включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов, отличных от человека (NHP), таких как обезьяны или человекообразные обезьяны, людей и т.д., более предпочтительно человека.

Используемый в настоящем описании термин "функционально связанный" относится к связи или смежному расположению, в котором описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать по назначению. Например, регуляторная последовательность, функционально связанная с представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты, способна направлять транскрипцию представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, или сигнальная последовательность, функционально связанная с представляющей интерес аминокислотной последовательностью, способна секретировать или перемещать представляющую интерес аминокислотную последовательность через мембрану.

Для облегчения понимания изобретения описание разделено на параграфы или разделы или направлено на раскрытие различных вариантов осуществления изобретения. Это деление не следует рассматривать как отделение сути параграфа или раздела или вариантов осуществления от сути другого абзаца или раздела или вариантов осуществления. Напротив, специалист в данной области техники поймет,

что описание имеет широкое применение и охватывает все возможные предполагаемые комбинации различных разделов, параграфов и предложений. Обсуждение любого варианта осуществления предназначено только в качестве примера и не предполагает ограничения объема раскрытия, включая формулу изобретения, этими примерами. Например, хотя варианты осуществления HBV-векторов по изобретению (например, ДНК-плазмидных или вирусных векторов), раскрытые в настоящем описании, могут содержать конкретные компоненты, включая, без ограничения, определенные промоторные последовательности, энхансерные или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, последовательность, кодирующую антиген HBV, последовательности сигнала полиаденилирования и т.д., расположенные в определенном порядке, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что раскрытые в настоящем описании концепции в равной степени могут быть применены к другим компонентам, расположенным в другом порядке, которые могут использоваться в HBV векторах по изобретению. Изобретение предполагает применение любого из подходящих для применения компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, которая может использоваться в HBV векторах по изобретению, вне зависимости от того, описана ли эта конкретная комбинация в явном виде.

Вирус гепатита В (HBV).

Используемый в настоящем описании термин "вирус гепатита В" или "HBV" относится к вирусу семейства Гепаднавирусы (Hepadnaviridae). HBV представляет собой небольшой (например, 3,2 т.п.н.) гепатотропный ДНК-вирус, который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. См. фиг. 1А. Семь белков, кодируемых HBV, включают белки малого (S), среднего (M) и большого (L) поверхностного антигена (HBsAg) или белки оболочки (Env), pre-Core белок, ядерный (core) белок, вирусную полимеразу (Pol) и HBx белок. HBV экспрессирует три поверхностных антигена или белки оболочки, L, M и S, среди которых S является самым коротким, а L - самым большим. Дополнительные домены в белках M и L называются Pre-S2 и Pre-S1, соответственно. Ядерный белок является субъединицей вирусного нуклеокапсида. Pol необходим для синтеза вирусной ДНК (обратной транскриптазы, РНКазы H и праймера), который происходит в нуклеокапсидах, локализованных в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. PreCore является ядерным белком с N-концевым сигнальным пептидом и подвергается протеолитическому процессингу на N- и C-концах перед секрецией из инфицированных клеток, так называемый e-антиген гепатита В (HBeAg). Белок HBx необходим для эффективной транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК, сссDNA). HBx не является структурным вирусным белком. Все вирусные белки HBV имеют свою собственную мРНК, за исключением ядерного и полимеразы, которые имеют общую мРНК. За исключением pre-Core белка, ни один из вирусных белков HBV не подвергается пост-трансляционной протеолитической обработке.

Вирион HBV содержит вирусную оболочку, нуклеокапсид и одну копию генома частично двухцепочечной ДНК. Нуклеокапсид содержит 120 димеров ядерного белка и покрыт капсидной мембраной со встроенными в нее белками вирусной оболочки S, M и L или поверхностными антигенными белками. После проникновения в клетку вирус не имеет покрытия, и содержащая капсид релаксированная кольцевая ДНК (ркДНК, rcDNA) с ковалентно связанной вирусной полимеразой мигрирует в ядро. Во время этого процесса фосфорилирование ядерного белка вызывает структурные изменения, обнажая сигнал ядерной локализации, позволяющий капсиду взаимодействовать с так называемыми импортинами. Эти импортины опосредуют связывание ядерного белка с ядерными поровыми комплексами, при котором капсид распаковывается и комплекс полимеразы/ркДНК высвобождается в ядро. Внутри ядра ркДНК становится депротенизированной (происходит удаление полимеразы) и с помощью механизма хозяина, обеспечивающего репарацию ДНК, преобразуется в геном ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК, сссDNA), из которого перекрывающиеся транскрипты кодируют HBeAg, HBsAg, ядерный белок, вирусную полимеразу и белок HBx. Ядерный белок, вирусная полимеразы и прегеномная РНК (пгРНК, pgRNA) объединяются в цитоплазме и самоорганизуются в незрелые капсидные частицы, содержащие пгРНК, которые в дальнейшем превращаются в зрелые капсиды с ркДНК и функционируют как общий промежуточный продукт, который либо покрывается оболочкой, либо секретируется в виде инфекционных вирусных частиц или транспортируется обратно в ядро для пополнения и поддержания стабильного пула кзкДНК. См. фиг. 1В.

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

Антигены HBV.

Используемые в настоящем описании термины "антиген HBV", "антигенный полипептид HBV", "HBV антигенный полипептид", "антигенный белок HBV", "иммуногенный полипептид HBV" и "иммуноген HBV" относятся к полипептиду, способному индукции иммунного ответа, например гуморального и/или клеточно-опосредованного ответа у субъекта на HBV. Антиген HBV может быть полипептидом HBV, его фрагментом или эпитопом или комбинацией нескольких полипептидов HBV, их частей или

производных. Антиген HBV способен вызывать у хозяина защитный иммунный ответ, например, вызывать иммунный ответ на вирусное заболевание или инфекцию и/или продуцировать иммунитет (т.е. вакцинировать) у субъекта на вирусное заболевание или инфекцию, который защищает субъекта от вирусного заболевания или инфекции. Например, антиген HBV может содержать полипептид или его иммуногенный(ые) фрагмент(ы) любого белка HBV, такого как HBcAg, pre-core белок, HBsAg (белки S, M или L), ядерный белок, вирусная полимераза или белок HBx, полученный из любого генотипа HBV, например, генотипа A, B, C, D, E, F, G и/или H, или их комбинации.

(1) Ядерный (core) антиген HBV.

Используемые в настоящем описании, каждый из терминов "ядерный антиген HBV", "HBcAg" и "ядерный антиген" относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, у субъекта на ядерный белок HBV. Каждый из терминов "ядерный", "ядерный полипептид" и "ядерный белок" относится к ядерному белку HBV вируса. Полноразмерный ядерный антиген обычно имеет в длину 183 аминокислоты и включает домен сборки (аминокислоты от 1 до 149) и домен, связывающий нуклеиновую кислоту (аминокислоты от 150 до 183). Домен, связывающий нуклеиновую кислоту, состоящий из 34 остатков, необходим для инкапсулирования прегеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта (импорта в ядро). Он содержит 17 остатков аргинина и является высокоосновным, что соответствует его функции. Ядерный белок HBV является в растворе димерным, причем димеры самоорганизуются в икосаэдрические капсиды. Каждый димер ядерного белка имеет четыре α -спиральных пучка, фланкированных α -спиральным доменом с обеих сторон. Укороченные ядерные белки HBV, лишенные домена, связывающего нуклеиновую кислоту, также способны образовывать капсиды.

В варианте осуществления изобретения антиген HBV представляет собой укороченный ядерный антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин "укороченный ядерный антиген HBV" относится к антигену HBV, который не содержит ядерный белок HBV полной длины, но который способен индуцировать иммунный ответ у субъекта на ядерный белок HBV. Например, ядерный антиген HBV может быть модифицирован путем удаления одной или более аминокислот из высоко положительно заряженного (богатого аргинином) С-концевого домена ядерного антигена, связывающего нуклеиновую кислоту, который обычно содержит семнадцать остатков аргинина (R). Укороченный ядерный антиген HBV по изобретению предпочтительно является укороченным С-концевым ядерным белком HBV, который не содержит сигнал импорта в ядро ядерного белка HBV, и/или укороченным ядерным белком HBV, из которого удален С-концевой сигнал импорта ядерного белка HBV в ядро. В одном из вариантов осуществления укороченный ядерный антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене, связывающем нуклеиновую кислоту, такую как делеция размером от 1 до 34 аминокислотных остатков в С-концевом домене, связывающем нуклеиновую кислоту, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислотных остатка, предпочтительно делецию всех 34 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления укороченный ядерный антиген HBV содержит делецию в С-концевом домене, связывающем нуклеиновую кислоту, предпочтительно делецию всех 34 аминокислотных остатков.

Ядерный антиген HBV по изобретению может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из нескольких генотипов HBV (например, генотипов A, B, C, D, E, F, G и H). Используемый в настоящем описании термин "консенсусная последовательность" означает искусственную последовательность аминокислот, основанную на выравнивании аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, определенных выравниванием (например, с помощью Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Это может быть вычисленный порядок наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, обнаруживаемых в каждом положении при выравнивании последовательностей, с учетом последовательностей антигенов HBV (например, core, pol и т.д.) по меньшей мере 100 природных изолятов HBV. Консенсусная последовательность может быть не встречающейся в природе и может отличаться от нативных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности могут быть сконструированы путем выравнивания нескольких последовательностей антигена HBV, полученных из разных источников, с помощью инструментов множественного выравнивания последовательностей и путем выбора наиболее часто встречающуюся аминокислоту в различных позициях выравнивания. Предпочтительно, консенсусную последовательность антигена HBV получают из генотипов HBV B, C и D. Термин "консенсусный антиген" используется для обозначения антигена, имеющего консенсусную последовательность.

Пример укороченного ядерного антигена HBV по изобретению лишен функции связывания нуклеиновой кислоты и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Предпочтительно укороченный ядерный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере на генотипы HBV B, C и D. Более предпочтительно укороченный ядерный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека-субъекта на по меньшей мере генотипы A, B, C и D HBV.

Предпочтительно ядерный антиген HBV по изобретению представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов B, C и D HBV, более предпочти-

тельно укороченный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Пример укороченного консенсусного ядерного антигена HBV по изобретению состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 14 являются ядерными консенсусными антигенами, полученными из генотипов В, С и D HBV. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 14 содержат С-концевую делецию из 34 аминокислот высоко положительно заряженного (богатого аргинином) домена нативного ядерного антигена, связывающего нуклеиновую кислоту.

В конкретном варианте осуществления изобретения ядерный антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В другом конкретном варианте осуществления ядерный антиген HBV представляет собой укороченный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

(2) Полимеразный антиген HBV.

В контексте настоящего описания каждый из терминов "полимеразный антиген HBV", "HBcAg" и "pol антиген HBV" относится к антигену HBV, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ у субъекта на полимеразу HBV. Каждый из терминов "полимераза", "полипептид полимеразы", "Pol" и "pol" относится к вирусной ДНК-полимеразе HBV. Вирусная ДНК-полимераза HBV имеет четыре домена, включая, в направлении от N-конца к С-концу, домен терминального белка (TP), который действует как праймер для синтеза минус-цепи ДНК; спейсер, несущественный для функций полимеразы; домен обратной транскриптазы (RT) для транскрипции полимеразы; и домен РНКазы Н.

В одном из вариантов осуществления изобретения антиген HBV содержит Pol антиген HBV или любой иммуногенный фрагмент или их комбинацию. Pol антиген HBV может содержать дополнительные модификации, улучшающие иммуногенность антигена, например, путем введения мутаций в активные участки доменов полимеразы и/или РНКазы для уменьшения или по существу устранения определенных ферментативных активностей.

Предпочтительно, Pol антиген HBV по изобретению не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере на два генотипа HBV. Предпочтительно, Pol антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере на генотипы В, С и D HBV. Более предпочтительно, Pol антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека на минимум генотипы А, В, С и D HBV.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Pol антиген HBV представляет собой инактивированный Pol антиген. В одном из вариантов осуществления инактивированный Pol антиген HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном участке полимеразного домена. В другом варианте осуществления инактивированный HBV Pol антиген содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном участке домена РНКазы Н. В предпочтительном варианте осуществления инактивированный pol антиген HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном участке как домена полимеразы, так и домена РНКазы Н. Например, мотив "YXDD" в домене полимеразы pol антигена HBV, который может потребоваться для связывания нуклеотида/иона металла, может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) остатками аспарагина (N), что приведет к устранению или ослаблению координационной функции металла, тем самым ослабляя или по существу устраняя функцию обратной транскриптазы. Альтернативно или в дополнение к мутации мотива "YXDD", мотив "DEDD" в домене РНКазы Н pol антигена HBV, необходимый для координации Mg^{2+} , может быть мутирован, например, путем замены одного или более остатков аспартата (D) остатком аспарагина (N) и/или путем замены остатка глутамата (E) остатком глутамина (Q), тем самым ослабляя или по существу устраняя функцию РНКазы Н. В конкретном варианте осуществления pol антиген HBV модифицируют путем (1) мутации остатков аспартата (D) на остатки аспарагина (N) в мотиве "YXDD" домена полимеразы; и (2) мутации первого остатка аспартата (D) на остаток аспарагина (N) и первого остатка глутамата (E) на остаток глутамина (N) в мотиве "DEDD" домена RNaseH, тем самым ослабляя или по существу устраняя обе функции: обратной транскриптазы и РНКазы Н pol антигена.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения pol антиген HBV представляет собой консенсусный антиген, предпочтительно консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV, более предпочтительно, инактивированный консенсусный антиген, полученный из генотипов В, С и D HBV. Типичный консенсусный pol антиген HBV по изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно, на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 является консенсусным pol антигеном, полученным из генотипов В, С и D HBV, содержащим

четыре мутации, расположенные в активных участках доменов полимеразы и РНКазы Н. В частности, четыре мутации включают мутацию остатков аспарагиновой кислоты (D) на остатки аспарагина (N) в мотиве "YXDD" домена полимеразы; и мутацию первого остатка аспартата (D) на остаток аспарагина (N) и мутацию остатка глутамата (E) на остаток глутамина (Q) в мотиве "DEDD" домена РНКазы Н.

В конкретном варианте осуществления изобретения pol антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В других вариантах осуществления pol антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

(3) Слияние ядерного антигена HBV и полимеразного антигена HBV.

Используемый в настоящем описании термин "слитый белок" или "слитый" относится к одной полипептидной цепи, имеющей по меньшей мере два полипептидных домена, которые в естественном состоянии не присутствуют в одном природном полипептиде.

В одном из вариантов осуществления антиген HBV содержит слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с Pol антигеном HBV, или Pol антиген HBV, функционально связанный с укороченным ядерным антигеном HBV, предпочтительно через линкер.

Используемый в настоящем описании термин "линкер" относится к соединению или фрагменту, который действует в качестве молекулярного мостика, обеспечивающего функциональную связь двух разных молекул, причем одна часть линкера функционально связана с первой молекулой, а другая часть линкера функционально связана со второй молекулой. Например, в слитом белке, содержащем первый полипептид и второй гетерологичный полипептид, линкер служит главным образом в качестве спейсера между первым и вторым полипептидами. В одном из вариантов осуществления линкер состоит из аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, причем аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот. В одном из вариантов осуществления от 1 до 20 аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Предпочтительно линкер состоит из большинства стерически незатрудненных аминокислот, таких как глицин и аланин. Типичными линкерами являются полиглицины, в частности, (Gly)₅, (Gly)₈; поли(Gly-Ala) и полиаланины. Один из примеров подходящих линкеров, показанный в приведенных ниже примерах, представляет собой (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

Предпочтительно, слитый белок по заявке способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на ядерный HBV и Pol HBV по меньшей мере двух генотипов HBV. Предпочтительно, слитый белок способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере на генотипы В, С и D HBV. Более предпочтительно, слитый белок способен индуцировать Т-клеточный ответ у субъекта человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

В одном из вариантов осуществления слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, линкер и Pol антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5, и Pol антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Более предпочтительно, слитый белок в соответствии с вариантом осуществления изобретения содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В варианте осуществления изобретения слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность. Предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19. Более предпочтительно, слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Полинуклеотиды и векторы.

В другом общем аспекте изобретение относится к не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген HBV по изобретению, и вектор, содержащий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. Не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты может содержать любую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген HBV по заявке, которая может быть получена способами, известными в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Предпочтительно, полинуклеотид кодирует по меньшей мере одно из укороченного ядерного антигена HBV и полимеразного антигена HBV по изобретению. Полинуклеотид может быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной рекомбинантными методами (например, клонированием) или полученной синтетическим путем (например, химическим синтезом). ДНК может быть одноцепочечной или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательностей. ДНК может, например, содержать геномную ДНК, кДНК или их комбинации. Полинуклеотид также мо-

жет представлять собой гибрид ДНК/РНК. Полинуклеотиды и векторы по изобретению могут быть использованы для продуцирования рекомбинантного белка, экспрессии белка в клетке-хозяине или продуцирования вирусных частиц. Предпочтительно полинуклеотид представляет собой ДНК.

В варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по изобретению, кодирующих укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, включают, без ограничения, полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15. Примеры не встречающихся в природе молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих укороченный ядерный антиген HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 15.

В варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая, на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула не встречающейся в природе нуклеиновой кислоты кодирует полимеразный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по заявке, кодирующих Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, включают, без ограничения, полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, предпочтительно на 98%, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16. Примеры не встречающихся в природе молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих pol антиген HBV, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 16.

В другом варианте осуществления не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с Pol антигеном HBV, или содержащий Pol антиген HBV, функционально связанный с укороченным ядерным антигеном HBV. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, например, на по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, более предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 14; линкер; и полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5; и Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Примеры полинуклеотидных последовательностей по изобретению, кодирующих слитый белок, включают, без ограничения, полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно на 98%, 99% или

100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, функционально связанную с линкером, кодирующей последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 22, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 22, которая дополнительно функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, функционально связанную с SEQ ID NO: 22, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Изобретение также относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин "вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую для переноса генетического материала в другую клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. Может быть использован любой вектор, известный специалистам в данной области с учетом настоящего раскрытия. Примеры векторов включают, без ограничения, плазмиды, вирусные векторы (бактериофаг, вирусы животных и вирусы растений), космиды и искусственные хромосомы (например, YAC). Предпочтительно, вектор представляет собой ДНК-плазмиду. Вектор может представлять собой ДНК вектор или РНК вектор. Специалист в данной области техники может сконструировать вектор по изобретению стандартными рекомбинантными методами с учетом настоящего раскрытия.

Вектор по изобретению может представлять собой вектор экспрессии. Используемый в настоящем описании термин "вектор экспрессии" относится к генетической конструкции любого типа, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную транскрибироваться. Векторы экспрессии включают, без ограничения, векторы экспрессии рекомбинантного белка, такие как ДНК-плазида или вирусный вектор, и векторы доставки нуклеиновой кислоты субъекту для ее экспрессии в ткани субъекта, такой как ДНК-плазида или вирусный вектор. Специалистам в данной области будет понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, требуемый уровень экспрессии белка и т.д.

Векторы по изобретению могут содержать несколько регуляторных последовательностей. Используемый в настоящем описании термин "регуляторная последовательность" относится к любой последовательности, которая позволяет, способствует или модулирует функциональную активность молекулы нуклеиновой кислоты, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одного из ее производных (т.е. мРНК) в клетку-хозяин или организм. В контексте настоящего описания этот термин охватывает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования и элементы, которые влияют на стабильность мРНК).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, без ограничения, ДНК-плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т.д. Примеры невирусных векторов включают, без ограничения, репликон РНК, репликон мРНК, модифицированный репликон мРНК или самоамплифицирующуюся мРНК, замкнутую линейную дезоксирибонуклеиновую кислоту, например, линейную ковалентно замкнутую ДНК, например, молекулу линейной ковалентно замкнутой двухцепочечной ДНК. Предпочтительно невирусный вектор представляет собой ДНК-плазмиду. "ДНК-плазида", которая используется взаимозаменяемо с "ДНК-плазмидным вектором", "плазмидной ДНК" или "плазмидным ДНК-вектором", относится к двухцепочечной и обычно кольцевой последовательности ДНК, которая способна к автономной репликации в подходящей клетке-хозяине. ДНК-плазмиды, используемые для экспрессии кодируемого полинуклеотида, обычно содержат точку начала репликации, участок множественного клонирования и селективируемый маркер, который, например, может представлять собой ген резистентности к антибиотику. Примеры подходящих ДНК-плазмид, которые можно использовать, включают, без ограничения, коммерчески доступные векторы экспрессии для использования в хорошо известных системах экспрессии (включая как прокариотические, так и эукариотические системы), таких как pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA), которые можно использовать для продуцирования и/или экспрессии белка в *Escherichia coli*; pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для продуцирования и/или экспрессии в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; полная бакуловирусная система экспрессии MAXBAC® (Thermo Fisher Scientific), которую можно использовать для продуцирования и/или экспрессии в клетках насекомых; pcDNATM или pcDNA3TM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для экспрессии конститутивного белка в больших количествах в клетках млекопитающих; и pVAX или pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), которые можно использовать для временной экспрессии представляющего интерес бел-

ка в больших количествах в большинстве клеток млекопитающих. Остов любой имеющейся в продаже ДНК-плазмиды можно модифицировать для оптимизации экспрессии белка в клетке-хозяине, например, путем изменения ориентации определенных элементов (например, точки начала репликации и/или кассеты резистентности к антибиотикам), замены промотора, эндогенного для плазмиды (например, промотора в кассете устойчивости к антибиотикам), и/или замены полинуклеотидной последовательности, кодирующей транскрибируемые белки (например, кодирующей последовательности гена резистентности к антибиотикам), с помощью рутинных методов и легкодоступных исходных материалов. (См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning the Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)).

Предпочтительно, ДНК-плазида представляет собой вектор экспрессии, подходящий для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Векторы экспрессии, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, без ограничения, pcDNA™, pcDNA3™, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 и т.д. Предпочтительно, вектор экспрессии основан на pVAX-1, который может быть далее модифицирован для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. pVAX-1 является обычно используемой плазмидой в ДНК-вакцинах и содержит сильный предранний промотор цитомегаловируса человека (CMV-IE), за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), полученная из бычьего гормона роста (bGH). pVAX-1 дополнительно содержит точку начала репликации pUC и ген резистентности к канамицину, управляемый небольшим прокариотическим промотором, который обеспечивает размножение бактериальной плазмиды.

Вектор по изобретению может представлять собой вирусный вектор. Как правило, вирусные векторы представляют собой генетически сконструированные вирусы, несущие модифицированную вирусную ДНК или РНК, ставшую неинфекционной, но все же содержащую вирусные промоторы и трансгены, что позволяет осуществлять трансляцию трансгена через вирусный промотор. Поскольку вирусным векторам часто не хватает инфекционных последовательностей, им требуются вспомогательные вирусы или пакующие линии для трансфекции в больших объемах. Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают, без ограничения, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, векторы вируса оспы, векторы кишечного вируса, векторы вируса венесуэльского лошадиного энцефалита, векторы вируса лесного семлики, векторы вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы, аренавирусные векторы, аренавирусные векторы с недостаточной репликацией или аренавирусные векторы компетентные к репликации, двухсегментированные или трехсегментированные аренавирусы, инфекционные ареновирусные векторы, нуклеиновые кислоты, которые содержат геномный сегмент ареновируса, в котором одна открытая рамка считывания геномного сегмента удалена или функционально инактивирована (и заменена нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген HBV, как раскрыто в настоящем описании), аренавирус, такой как вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), например, штамм 13 клона или MP штамм, и аренавирус, такой как Хунин вирус, например, штамм Candid #1, и т.д. Вектор также может быть невирусным.

Предпочтительно, вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, например, рекомбинантный аденовирусный вектор. Рекомбинантный аденовирусный вектор, например, может быть получен из человеческого аденовируса (HAdV или AdHu) или из аденовируса обезьян, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV) или из аденовируса макака-резуса (rhAd). Предпочтительно, аденовирусный вектор представляет собой вектор рекомбинантного аденовируса человека, например, рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 или любого из рекомбинантных аденовирусов человека серотипов 5, 4, 35, 7, 48 и т.д. В других вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор rhAd, например rhAd51, rhAd52 или rhAd53. Рекомбинантный вирусный вектор, полезный для применения, может быть получен способами, известными в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, с учетом вырожденности генетического кода, могут быть сконструированы несколько последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют один и тот же полипептид. Полинуклеотид, кодирующий антиген HBV по изобретению необязательно может быть оптимизирован по кодонам для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине (например, клетках бактерий или млекопитающих). Оптимизация по кодонам представляет собой метод, широко применяемый в данной области, и способы получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов хорошо известны специалистам в данной области с учетом настоящего раскрытия.

Вектор по изобретению, например ДНК-плазида или вирусный вектор (в частности, аденовирусный вектор), может содержать любые регуляторные элементы для обеспечения обычной(ых) функции(ий) вектора, включая, без ограничения, репликацию и экспрессию антигена(ов) HBV, кодируемого(ых) полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, без ограничения, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, элемент связывания рибосомы, терминатор транскрипции, селективные маркеры, точку начала репликации и т.д. Вектор может содержать одну или более экспрессионных кассет. "Экспрессионная кассета" является частью вектора, которая направляет клеточный механизм на продуцирование РНК и белка. Экспрессионная кассета обычно содержит три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (UTR), необязательно содержащую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ORF) представляет собой рамку считывания, которая содержит кодирующую после-

довательность представляющего интерес белка (например, антигена HBV) от стартового кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы экспрессионной кассеты могут быть функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес антиген HBV. Используемый в настоящем описании термин "функционально связанный" следует рассматривать в самом широком, разумном контексте, и он относится к связи полинуклеотидных элементов, обеспечивающей их функциональность. Полинуклеотид является "функционально связанным", когда он находится в функциональных отношениях с другим полинуклеотидом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Любые компоненты, подходящие для использования в раскрытой в настоящем описании экспрессионной кассете, можно использовать в любой комбинации и в любом порядке для создания векторов по изобретению.

Вектор может содержать промоторную последовательность, предпочтительно внутри экспрессионной кассеты, для контроля экспрессии представляющего интерес антигена HBV. Термин "промотор" используется в общепринятом смысле и относится к нуклеотидной последовательности, которая инициирует транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор расположен в той же цепи рядом с нуклеотидной последовательностью, которую он транскрибирует. Промоторы могут быть конститутивными, индуцибельными или репрессивными. Промоторы могут быть естественными или синтетическими. Промотор может быть получен из источников, включающих вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может быть гомологичным промотором (т.е. полученным из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (т.е. полученным из другого вектора или генетического источника). Например, если используемый вектор представляет собой ДНК-плазмиду, промотор может быть эндогенным по отношению к плазмиде (гомологичным) или может быть получен из других источников (гетерологичным). Предпочтительно, промотор расположен перед полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, внутри экспрессионной кассеты.

Примеры промоторов, которые можно использовать, включают, без ограничения, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита (BIV), промотор вируса Молони, промотор птичьего вируса лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как предранний промотор CMV (CMV-IE), промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может быть промотором человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или человеческий металлотинейн. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как мышечный или кожно-специфический промотор, природный или синтетический.

Предпочтительно, промотор является сильным эукариотическим промотором, предпочтительно предранним промотором цитомегаловируса (CMV-IE). Нуклеотидная последовательность иллюстративного промотора CMV-IE приведена в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17.

Вектор может содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые стабилизируют экспрессируемый транскрипт, усиливают ядерный экспорт РНК-транскрипта и/или улучшают транскрипционно-трансляционное связывание. Примеры таких последовательностей включают сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования обычно расположен ниже кодирующей последовательности представляющего интерес белка (например, антигена HBV) внутри экспрессионной кассеты вектора. Энхансерные последовательности представляют собой регуляторные последовательности ДНК, которые, будучи связанными факторами транскрипции, усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Энхансерная последовательность предпочтительно расположена перед полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV, но ниже промоторной последовательности внутри экспрессионной кассеты вектора.

Может быть использован любой сигнал полиаденилирования, известный специалистам в данной области с учетом настоящего раскрытия. Например, сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40 (например, SEQ ID NO: 24), сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирование человеческого β -глобина. Предпочтительно сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH) или сигнал полиаденилирования SV40. Нуклеотидная последовательность приведенного в качестве примера сигнала полиаденилирования bGH показана в SEQ ID NO: 11. Нуклеотидная последовательность приведенного в качестве примера сигнала полиаденилирования SV40 показана в SEQ ID NO: 24.

Может быть использована любая энхансерная последовательность, известная специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, энхансерная последовательность может представлять собой человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или вирусный энхансер, такой как один из CMV, HA, RSV или EBV. Примеры конкретных энхансеров включают, без ограничения, пост-транскрипционный регуляторный элемент Woodchuck (WPRE) HBV, последовательность интрон/экзон, происходящую из предшественника аполипопротеина A1 человека (ApoA1), нетранслируемый домен R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса T-

клеточной лейкемии человека типа 1 (HTLV-1), энхансер сплайсинга, синтетический интрон β -глобина кролика или любую их комбинацию. Предпочтительно, энхансерная последовательность представляет собой композитную последовательность, состоящую из трех последовательных элементов нетранслируемого домена R-U5 LTR HTLV-1, интрона β -глобина кролика и энхансера сплайсинга, которая в настоящем описании упоминается как "тройная энхансерная последовательность". Нуклеотидная последовательность приведенной в качестве примера тройной энхансерной последовательности показана в SEQ ID NO: 8. Другой пример энхансерной последовательности представляет собой фрагмент гена AroAI, показанный в SEQ ID NO: 23.

Вектор может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида. Предпочтительно, полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность сигнального пептида, расположена перед полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV. Сигнальные пептиды обычно направляют локализацию белка, облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце HBV антигена при экспрессии из вектора, но отщепляется сигнальной пептидазой, например, при секреции из клетки. Экспрессированный белок, от которого отщеплен сигнальный пептид, часто называют "зрелым белком". Может быть использован любой сигнальный пептид, известный в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом цистатина S; сигналом секреции иммуноглобулина (Ig), таким как сигнальный пептид гамма-тяжелой цепи Ig SPIgG или сигнальный пептид эILON-тяжелой цепи Ig SPIgE.

Предпочтительно последовательность сигнального пептида представляет собой сигнальный пептид цистатина S. Типичные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот сигнального пептида цистатина S показаны в SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно. Типичные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот сигнала секреции иммуноглобулина показаны в SEQ ID NO: 18 и 19, соответственно.

Вектор, такой как ДНК-плазида, также может включать точку начала репликации бактериального происхождения и экспрессионную кассету резистентности к антибиотику для отбора и поддержания плазмиды в бактериальных клетках, например E.coli. Точки начала репликации бактериального происхождения и кассеты устойчивости к антибиотикам могут быть расположены в векторе в той же ориентации, что и экспрессионная кассета, кодирующая антиген HBV, или в противоположной (обратной) ориентации. Точка начала репликации (ORI) представляет собой последовательность, с которой начинается репликация, позволяя плазмиде размножаться и выживать в клетках. Примеры ORI, подходящей для использования по изобретению, включают, без ограничения, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K и 15A, предпочтительно pUC. Типичная нуклеотидная последовательность ORI pUC показана в SEQ ID NO: 10.

Экспрессионные кассеты для отбора и поддержания в бактериальных клетках обычно включают промоторную последовательность, функционально связанную с геном резистентности к антибиотику. Предпочтительно промоторная последовательность, функционально связанная с геном резистентности к антибиотику, отличается от промоторной последовательности, функционально связанной с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок, например антиген HBV. Ген устойчивости к антибиотикам может быть оптимизирован по кодонам, и состав последовательности гена устойчивости к антибиотикам обычно подбирают в зависимости от использования кодонов бактерий, например, E.coli. Можно использовать любой ген устойчивости к антибиотикам, известный специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения, включая, без ограничения, ген резистентности к канамицину (Kan^r), ген устойчивости к ампициллину (Amp^r) и ген устойчивости к тетрациклину (Tet^r), а также гены, придающие устойчивость к хлорамфениколу, блеомицину, спектиномицину, карбенициллину и др.

Предпочтительно ген резистентности к антибиотику в экспрессионной кассете антибиотика в векторе представляет собой ген резистентности к канамицину (Kan^r). Последовательность гена Kan^r показана в SEQ ID NO: 13. Предпочтительно ген Kan^r оптимизирован по кодонам. Типичная оптимизированная по кодонам последовательность нуклеиновой кислоты гена Kan^r показана в SEQ ID NO: 12. Kan^r может быть функционально связан с нативным промотором, или ген Kan^r может быть связан с гетерологичным промотором. В конкретном варианте осуществления ген Kan^r функционально связан с промотором гена устойчивости к ампициллину (Amp^r), известным как промотор bla). Типичная нуклеотидная последовательность B1a промотора показана в SEQ ID NO: 9.

В конкретном варианте осуществления изобретения вектор представляет собой ДНК-плазмиду, содержащую экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из pol антигена HBV, содержащего аминокислотную последовательность которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, и укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; расположенную выше последовательность, функционально связанную с по-

линуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую, в направлении, от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, предпочтительно CMV промоторную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, предпочтительно тройную энхансерную последовательность SEQ ID NO: 8 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнального пептида цистатина S, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и расположенную ниже последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащий сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 11. Такой вектор дополнительно содержит экспрессионную кассету резистентности к антибиотику, включающую полинуклеотид, кодирующий ген резистентности к антибиотику, предпочтительно ген Kan^r, более предпочтительно кодон-оптимизированный ген Kan^r, который на по меньшей мере 90% идентичен SEQ ID NO: 12, например на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичен SEQ ID NO: 12, предпочтительно на 100% идентичен SEQ ID NO: 12, функционально связанный с промотором Amp^r (bla) SEQ ID NO: 9, расположенным выше и функционально связанным с полинуклеотидом, кодирующим ген резистентности к антибиотику; и точку начала репликации, предпочтительно pUC ori с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, чтобы кассета резистентности к антибиотику и точка начала репликации присутствовали в плазмиде в обратной ориентации относительно экспрессионной кассеты антигена HBV. Типичные ДНК-плазмиды, имеющие вышеупомянутые признаки, показаны на фиг. 2А и 2В.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один антиген HBV, выбранный из группы состоящий из pol антигена HBV, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, например, на по меньшей мере 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, и укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14; расположенную выше последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, предпочтительно CMV промоторную последовательность SEQ ID NO: 17, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI SEQ ID NO: 23, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и расположенную ниже последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 с SEQ ID NO: 24.

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

В одном из вариантов изобретения вектор, такой как ДНК-плазмидный вектор или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, вектор содержит кодирующую последовательность укороченного ядерного антигена HBV, которая на по меньшей мере 90% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

В еще одном варианте осуществления изобретения вектор, такой как ДНК-плазмидный вектор или вирусный вектор (предпочтительно аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35), кодирует слитый белок, содержащий Pol антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, вектор содержит кодирующую последовательность слитого белка, которая содержит кодирующую последовательность укороченного ядерного антигена HBV, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 1

или SEQ ID NO: 15, более предпочтительно SEQ ID NO: 15, функционально связанную с последовательностью, кодирующей Pol антиген HBV, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, предпочтительно 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, более предпочтительно SEQ ID NO: 16. Предпочтительно последовательность, кодирующая укороченный ядерный антиген HBV, функционально связана с последовательностью, кодирующей Pol антиген HBV через последовательность, кодирующую линкер, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22, например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 22 предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 22. В конкретных вариантах осуществления изобретения вектор содержит последовательность, кодирующую слитый белок, имеющий SEQ ID NO: 15, функционально связанную с SEQ ID NO: 22, которая дополнительно функционально связана с SEQ ID NO: 16.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии, кодирующие антигены HBV по изобретению, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген HBV, может быть введен или "клонирован" в вектор экспрессии с помощью стандартных методов молекулярной биологии, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т.д., которые хорошо известны специалистам в данной области.

Клетки, полипептиды и антитела.

Изобретение также относится к клеткам, предпочтительно выделенным клеткам, содержащим любой из полинуклеотидов и векторов, раскрытых в настоящем описании. Клетки могут, например, использоваться для продуцирования рекомбинантного белка или для продуцирования вирусных частиц.

Таким образом, варианты осуществления изобретения также относятся к способу получения антигена HBV по изобретению. Способ содержит трансфекцию клетки-хозяина вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, кодирующий антиген HBV по изобретению, функционально связанный с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV, и, возможно, очистку или выделение антигена HBV, экспрессированного в клетке. Антиген HBV может быть выделен или собран из клетки любым способом, известным в данной области, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т.д. Методы, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, хорошо известны специалисту в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Экспрессированные антигены HBV также можно изучать без очистки или выделения экспрессированного белка, например, путем анализа супернатанта клеток, которые трансфицированы вектором экспрессии, кодирующим антиген HBV, и которые выращены в условиях, подходящих для экспрессии антигена HBV.

Таким образом, также предоставлены не встречающиеся в природе или рекомбинантные полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 4. Как описано выше и ниже, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти последовательности, векторы, содержащие эти последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, содержащие полипептид, полинуклеотид или вектор, также представлены в описании.

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

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

В другом варианте изобретения не встречающийся в природе или рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, например на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, не встречающийся в природе или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 14.

Также предоставлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с не встречающимся в природе полипептидом по изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, специфическое к не встречающемуся в природе антигену HBV по изобретению, не связывается специфически с другим антигеном HBV. Например, антитело по изобре-

нию, которое специфически связывается с Pol антигеном HBV, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, не будет специфически связываться с Pol антигеном HBV, не имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" включает поликлональные, моноклональные, химерные, гуманизированные, Fv, Fab и F(ab')₂; бифункциональный гибрид (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), однопочечное антитело (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242: 423, 1988); и антитела с измененными константными областями (например, патент США № 5624821).

Используемый в настоящем описании термин "антитело специфически связывается с" антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном с KD 1×10^{-7} М или менее. Предпочтительно, антитело, которое "специфически связывается с" антигеном, связывается с антигеном с KD 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с помощью способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с помощью технологии интерферометрии биослоя, например с помощью системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше средство связывания антитела к целевому антигену.

Композиции, иммуногенные комбинации и вакцины.

Изобретение также относится к композициям, иммуногенным комбинациям, более конкретно, к наборам и вакцинам, содержащим один или более антигенов HBV, полинуклеотидов и/или векторов, кодирующих один или более антигенов HBV по изобретению. Любые из антигенов HBV, полинуклеотидов (включая РНК и ДНК) и/или векторов по изобретению, раскрытых в настоящем описании, могут быть использованы в композициях, иммуногенных комбинациях или наборах и вакцинах по изобретению.

Изобретение относится к композиции, содержащей выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, или полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, вектор, содержащий выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, и/или выделенный или не встречающийся в природе полипептид, кодируемый выделенной или не встречающейся в природе молекулой нуклеиновой кислоты.

В варианте осуществления изобретения композиция содержит выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

В варианте осуществления изобретения композиция содержит выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующую Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Последовательности, кодирующие укороченный ядерный антиген HBV и Pol антиген HBV могут присутствовать в одной выделенной или не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) или в двух разных выделенных или не встречающихся в природе молекулах нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

В варианте осуществления изобретения композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмидный или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

В варианте осуществления изобретения композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмидный или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, коди-

рующий Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмидный или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и вектор, предпочтительно ДНК-плазмидный или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4. Вектор, содержащий последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, и вектор, содержащий последовательность, кодирующую Pol антиген HBV, могут представлять собой один и тот же вектор или два разных вектора.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит вектор, предпочтительно ДНК-плазмидный или вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор), содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, функционально связанный с Pol антигеном HBV, содержащим аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4, или наоборот. Предпочтительно, чтобы слитый белок дополнительно содержал линкер, который функционально связывает укороченный ядерный антиген HBV с Pol антигеном HBV или наоборот. Предпочтительно, линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит выделенный или не встречающийся в природе укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

В варианте осуществления изобретения композиция содержит выделенный или не встречающийся в природе Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит выделенный или не встречающийся в природе укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и выделенный или не встречающийся в природе Pol антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов изобретения композиция содержит выделенный или не встречающийся в природе слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, функционально связанный с Pol антигеном HBV, содержащим аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4, или наоборот. Предпочтительно, чтобы слитый белок дополнительно содержал линкер, который функционально связывает укороченный ядерный антиген HBV с Pol антигеном HBV или наоборот. Предпочтительно, линкер имеет аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, где n представляет собой целое число от 2 до 5.

Изобретение также относится к иммуногенной комбинации или набору, содержащему полинуклеотиды, экспрессирующие укороченный ядерный антиген HBV и pol антиген HBV в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Любые полинуклеотиды и/или векторы, кодирующие core и pol антигены HBV по изобретению, раскрытые в настоящем описании, могут быть использованы в иммуногенных комбинациях или наборах по изобретению.

Согласно вариантам изобретения вакцинальная комбинация или набор содержит:

(a) первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H;

(b) вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель,

причем первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты или в двух разных не встречающихся в природе молекулах нук-

леиновой кислоты.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, полинуклеотиды в вакцинной комбинации или наборе могут быть связаны или разделены, и при этом HBV антигены, экспрессируемые из таких полинуклеотидов, слиты вместе или продуцируются в виде отдельных белков, независимо от того, экспрессируются ли они из одного или разных полинуклеотидов. В одном из вариантов осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в отдельных векторах, например в ДНК-плазмидах или вирусных векторах, используемых в комбинации либо в одних и тех же, либо в отдельных композициях, так что экспрессированные белки также являются отдельными белками, но используются в комбинации. В другом варианте осуществления HBV антигены, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут быть экспрессированы из одного и того же вектора с образованием слитого core-pol антигена HBV. Необязательно, core и pol антигены могут быть соединены или слиты вместе коротким линкером. Альтернативно, HBV антигены, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут быть экспрессированы независимо из одного вектора с использованием участка проскальзывания рибосомы (также известного как участок цис-гидролазы), расположенного между последовательностями, кодирующими core и pol антигены. Результатом этой стратегии является бицистронный вектор экспрессии, в котором отдельные core и pol антигены образуются из одного мРНК транскрипта. Core и pol антигены, продуцируемые таким бицистронным вектором экспрессии, могут иметь дополнительные N или C-концевые остатки в зависимости от упорядочения кодирующих последовательностей на мРНК транскрипте. Примеры участков проскальзывания рибосом, которые можно использовать для этой цели, включают, без ограничения, участок проскальзывания FA2 из вируса ящура (FMDV). Другая возможность состоит в том, что антигены HBV, кодируемые первым и вторым полинуклеотидами, могут быть экспрессированы независимо из двух отдельных векторов, один из которых кодирует core антиген HBV, а другой - pol антиген HBV.

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

В соответствии с предпочтительными вариантами изобретения, иммуногенная комбинация или набор содержит первый полинуклеотид, присутствующий в первом векторе, и второй полинуклеотид, присутствующий во втором векторе. Первый и второй векторы могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно векторы представляют собой ДНК-плазмиды.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуногенная комбинация или набор содержит: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2; и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 4.

В конкретном варианте осуществления изобретения первый вектор представляет собой первую ДНК-плазмиду, а второй вектор представляет собой вторую ДНК-плазмиду. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит точку начала репликации, предпочтительно pUC ORI SEQ ID NO: 10, и кассету резистентности к антибиотику, предпочтительно содержащую оптимизированный по кодонам ген Kan^r, имеющий полинуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 12, предпочтительно находящуюся под контролем P_{lac} -промотора, например P_{lac} -промотора, показанного в SEQ ID NO: 9. Каждая из первой и второй ДНК плазмид независимо дополнительно содержит по меньшей мере одну из промоторных последовательности, энхансерной последовательности и полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность сигнального пептида, функционально связанную с первой полинуклеотидной последовательностью или второй полинуклеотидной последовательностью. Предпочтительно, каждая из первой и второй ДНК-плазмид содержит расположенную выше последовательность, функционально связанную с первым полинуклеотидом или вторым полинуклеотидом, причем расположенная выше последовательность содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность SEQ ID NO: 8 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Каждая из первой и второй ДНК-плазмид также может содержать сигнал полиаденилирования, расположенный ниже кодирующей последовательности антигена HBV, такой как сигнал полиаденилирования bGH SEQ ID NO: 11.

В одном из конкретных вариантов осуществления изобретения первый вектор представляет собой первый вирусный вектор, а второй вектор представляет собой второй вирусный вектор. Предпочтительно каждый из первого и второго вирусных векторов представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26 или Ad35, содержащий экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий pol антиген HBV или укороченный core антиген HBV по изобретению; расположенную выше последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, предпочтительно

промоторную последовательность CMV с SEQ ID NO: 17, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность фрагмента гена AroAI с SEQ ID NO: 23, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнал секреции иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и расположенную ниже последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 с SEQ ID NO: 24.

В другом предпочтительном варианте осуществления первый и второй полинуклеотиды присутствуют в одном векторе, например ДНК-плазмиде или вирусном векторе. Предпочтительно, единичный вектор представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно вектор Ad26, содержащий экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий роI антиген HBV и укороченный соге антиген HBV по изобретению, предпочтительно кодирующий роI антиген HBV и укороченный соге антиген HBV по изобретению в виде слитого белка; расположенную выше последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим роI и укороченный соге антигены HBV, содержащую, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, предпочтительно промоторную последовательность CMV с SEQ ID NO: 17, энхансерную последовательность, предпочтительно последовательность генного фрагмента AroAI с SEQ ID NO: 23 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность сигнального пептида, предпочтительно сигнала секреции иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и расположенную ниже последовательность, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим антиген HBV, содержащую сигнал полиаденилирования, предпочтительно сигнал полиаденилирования SV40 с SEQ ID NO: 24.

Когда иммуногенная комбинация по изобретению включает первый вектор, такой как ДНК-плазмиду или вирусный вектор, и второй вектор, такой как ДНК-плазмиду или вирусный вектор, количество каждого из первого и второго векторов не является ограниченным особым образом. Например, первая ДНК-плазида и вторая ДНК-плазида могут присутствовать в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, например 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первая и вторая ДНК плазмиды присутствуют в соотношении 1:1 по массе.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут содержать дополнительные полинуклеотиды или векторы, кодирующие дополнительные антигены HBV и/или дополнительные антигены HBV или их иммуногенные фрагменты. Однако в конкретных вариантах осуществления композиции и иммуногенные комбинации по изобретению не содержат определенные антигены.

В конкретном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация или набор по изобретению не содержит HBsAg или полинуклеотидную последовательность, кодирующую HBsAg.

В другом конкретном варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация или набор по изобретению не содержит белок L HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок L HBV.

В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения композиция или иммуногенная комбинация по изобретению не содержит белок оболочки HBV или полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок оболочки HBV.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению также могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным и не должен мешать эффективности активного ингредиента. Фармацевтически приемлемые носители могут включать один или более вспомогательных агентов, таких как связующие, дезинтегранты, набухающие агенты, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, смачивающие агенты, лубриканты, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Фармацевтически приемлемые носители могут включать носители, такие как липидные (нано)частицы. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутримышечного (например, кишечного), интраназального или внутрибрюшинного. Для жидких инъекционных препаратов, например, суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т.п. Для твердых пероральных препаратов, например, порошков, капсул, каплет, гелевых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, лубриканты, связующие, разрыхлители и т.п. Для назальных спреев/ингаляционных смесей водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие средства, стабилизаторы, смачивающие агенты, консерванты, ароматические вещества, ароматизаторы и т.п. в качестве подходящих носителей и добавок.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут быть приготовлены в виде состава с любым веществом, подходящим для введения субъекту, чтобы облегчить введение и повысить эффективность, включая, без ограничения, пероральное (энтеральное) введение и парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции по изобретению также могут быть приготовлены в виде состава для других путей введения, включая трансмукозальное, глазное, рек-

тальное введение, длительную имплантацию, сублингвальное введение под язык, введение через слизистую оболочку ротовой полости, минуя портальное кровообращение, ингаляцию или интраназальное введение.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиции и иммуногенные комбинации по изобретению приготовлены в виде состава для парентеральной инъекции, предпочтительно подкожной, внутрискожной инъекции или внутримышечной инъекции, более предпочтительно внутримышечной инъекции.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, композиции и иммуногенные комбинации по изобретению обычно содержат забуференный раствор в фармацевтически приемлемом носителе, например, водном носителе, такой как забуференный физиологический раствор и т.п., например, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Композиции и иммуногенные комбинации также могут содержать фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, таким как регулирующие рН и буферные агенты. Например, композиция или иммуногенная комбинация по изобретению, включающая плазмидную ДНК, может содержать фосфатно-солевой буфер (PBS) в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Плазмидная ДНК может присутствовать в концентрации, например, от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, такой как 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, или 5 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут быть приготовлены в виде вакцины (также называемой "иммуногенной композицией") способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунных реакций. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе могут быть определены методами, хорошо известными специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

В конкретном варианте осуществления изобретения композиция или иммуногенная комбинация представляет собой ДНК-вакцину. ДНК-вакцины обычно содержат бактериальные плазмиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес антиген под контролем сильного эукариотического промотора. Как только плазмиды доставляются в цитоплазму клетки-хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно. Полученный антиген обычно вызывает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. ДНК-вакцины выгодны по меньшей мере потому, что они обеспечивают повышенную безопасность, термостабильны, легко адаптируются для экспрессии антигенных вариантов и просты в изготовлении. Любая из ДНК-плазмид по изобретению может быть использована для приготовления такой ДНК-вакцины.

В других конкретных вариантах по изобретению композиция или иммуногенная комбинация представляет собой РНК-вакцину. РНК-вакцины обычно содержат по меньшей мере одну одноцепочечную молекулу РНК, кодирующую представляющий интерес антиген, например антиген HBV. Как только РНК доставляется в цитоплазму клетки хозяина, кодируемый антиген продуцируется и процессируется эндогенно, вызывая как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы, подобно ДНК-вакцине. Последовательность РНК может быть оптимизирована по кодамам для повышения эффективности трансляции. Молекула РНК может быть модифицирована любым способом, известным в данной области техники с учетом настоящего раскрытия, для повышения стабильности и/или трансляции, например, путем добавления полиА-хвоста, например, по меньшей мере, 30 остатков аденозина; и/или кэпирование 5-конца модифицированным рибонуклеотидом, например, 7-метилгуанозиновым кэпом, который может быть включен во время синтеза РНК или ферментативно сконструирован после транскрипции РНК. РНК-вакцина также может представлять собой самореплицирующуюся РНК-вакцину, разработанную на основе альфа-вирусного вектора экспрессии. Самореплицирующиеся РНК-вакцины содержат молекулу репликазной РНК, полученную из вируса, принадлежащего к семейству альфа-вирусов, с субгеномным промотором, который контролирует репликацию РНК-антигена HBV, за которой следует искусственный поли-А-хвост, расположенный ниже от репликазы.

В некоторых вариантах осуществления в композицию или иммуногенную комбинацию по изобретению включен адъювант, или адъювант вводится вместе с композицией или иммуногенной комбинацией по изобретению. Использование адъюванта является необязательным и может дополнительно усиливать иммунные ответы, когда композицию используют с целью вакцинации. Адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композиции по изобретению, предпочтительно должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными у людей. Адъювант может представлять собой малую молекулу или антитело, включая, без ограничения, ингибиторы иммунной контрольной точки (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т.д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altog Bioscience), мутантные генетические адъюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL-12 и IL-7-hyFc. Адъюванты также могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; иммуномодуляторов; модуляторов toll-подобного рецептора 7; модуляторов toll-подобного рецептора 8; модуляторов toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора альфа интерферона; ингибиторов гиалуронидазы; модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; модуляторов toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; профилактических вакцин

против гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса гепатита В; анти-смысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно анти-HBV антисмысловых олигонуклеотидов; малых интерферирующих РНК (миРНК), в частности, анти-HBV миРНК; модуляторов эндонуклеаз; ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; ингибиторов антигена вируса гепатита В; анти-антител, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; анти-HBV антител; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов core HBV или белков капсида); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; стимуляторов NOD2; рекомбинантного тимозина альфа-1; ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов P13K; ингибиторов cccDNA; ингибиторов иммунной контрольной точки, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; агонистов костимуляторных рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (более конкретно, Т-клетках), таких как CD27, CD28 и т.д.; ингибиторов ВТК; других лекарственных веществ для лечения HBV; ингибиторов IDO; ингибиторов аргиназы; и ингибиторов KDM5.

Изобретение также относится к способам приготовления композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению. Способ приготовления композиции или иммуногенной комбинации включает смешивание выделенного полинуклеотида, кодирующего антиген HBV, вектор и/или полипептид по изобретению с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Специалист в данной области техники знаком с традиционными методами, используемыми для приготовления таких композиций.

Способы индукции иммунного ответа.

Изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV) у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной композиции по изобретению. В способах по изобретению может быть использована любая из композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению, раскрытых в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин "инфекция" относится к проникновению агента, вызывающего заболевание, в организм хозяина. Возбудитель заболевания считается "инфекционным", когда он способен проникать в организм хозяина и реплицироваться или размножаться в организме хозяина. Примеры инфекционных агентов включают вирусы, например, HBV и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибы, простейшие и т.п. "Инфекция HBV" в частности, относится к проникновению HBV в организм хозяина, например, клетки и ткани организма-хозяина.

Фраза "индукция иммунного ответа" при использовании со ссылкой на способы, раскрытые в настоящем описании, включает инициирование требуемого иммунного ответа или эффекта у нуждающегося в этом субъекта на инфекцию, например инфекцию HBV. "Индукция иммунного ответа" также включает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения, направленного против патогенного агента, например HBV. Используемый в настоящем описании термин "терапевтический иммунитет" или "терапевтический иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфекцию, вызванную патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация, например, иммунитет против инфекции HBV, обеспечиваемый вакцинацией вакциной против HBV. В варианте осуществления "индукция иммунного ответа" означает формирование иммунитета у нуждающегося в этом субъекта, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как инфекция HBV. В некоторых вариантах осуществления "индукция иммунного ответа" относится к возникновению или улучшению клеточного иммунитета, например Т-клеточного ответа на инфекцию HBV. В некоторых вариантах осуществления "индукция иммунного ответа" относится к возникновению или улучшению гуморального иммунного ответа на инфекцию HBV. В некоторых вариантах осуществления "индукция иммунного ответа" относится к возникновению или улучшению клеточного и гуморального иммунного ответа на инфекцию HBV.

Используемый в настоящем описании термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфекцию, вызванную патогенным агентом, против которого он был вакцинирован. Обычно у субъекта, у которого развился "защитный иммунный ответ", развивается только легкая или умеренная клиническая симптоматика или вообще отсутствуют симптомы. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" на определенный агент, не умирает в результате инфекции, вызванной указанным агентом.

Как правило, целью введения композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению является формирование иммунного ответа на HBV после инфекции HBV или развития симптомов, характерных для инфекции HBV, например, для терапевтической вакцинации.

Используемый в настоящем описании термин "иммуногенно эффективное количество" или "иммунологически эффективное количество" означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для индукции требуемого иммунного эффекта или иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Иммуногенно эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для формирования иммунитета у ну-

ждающегося в этом субъекта, например для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как инфекция HBV. Иммуногенно эффективное количество может меняться в зависимости от нескольких факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, вес, состояние здоровья и т.д.; конкретного применения, например обеспечения защитного иммунитета или терапевтического иммунитета; и конкретного заболевания, например вирусной инфекции, против которой желателен иммунитет. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области с учетом настоящего раскрытия.

В конкретных вариантах осуществления изобретения иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или иммуногенной комбинации, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более следующих эффектов: (i) снижение или облегчение тяжести инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (ii) сокращение продолжительности инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iii) предупреждение прогрессирования инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (iv) купирование инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (v) предупреждение развития или возникновения инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vi) предупреждение рецидива инфекции HBV или связанных с ней симптомов; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта с инфекцией HBV; (viii) сокращение продолжительности госпитализации субъекта, инфицированного HBV; (ix) увеличение выживаемости субъекта с инфекцией HBV; (x) устранение инфекции HBV у субъекта; (xi) ингибирование или уменьшение репликации HBV у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Иммуногенно эффективное количество также может представлять собой количество, достаточное для снижения уровней HBsAg в соответствии с развитием клинических проявлений сероконверсии; достижения устойчивого клиренса HBsAg, связанного с уменьшением количества инфицированных гепатоцитов, обеспечиваемого иммунной системой субъекта; индуцирования формирования HBV-антигенспецифичных активированных популяций Т-клеток; и/или достижения постоянной потери HBsAg в течение 12 месяцев. Примеры целевого индекса включают более низкое значение HBsAg, ниже порогового значения 500 копий международных единиц (IU) HBsAg и/или более высокое количество CD8.

В качестве общего руководства, иммуногенно эффективное количество при использовании в контексте ДНК-плазмиды может составлять примерно от 0,1 мг/мл до 10 мг/мл общего количества ДНК-плазмиды, например 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл или 10 мг/мл. Предпочтительно, иммуногенно эффективное количество ДНК-плазмиды составляет менее 8 мг/мл, более предпочтительно менее 6 мг/мл, еще более предпочтительно 3-4 мг/мл. Иммуногенно эффективное количество может быть получено на основе одного вектора или плазмиды или нескольких векторов или плазмид. Иммуногенно эффективное количество можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композициях (например, в виде таблетки, капсулы или инъекционных препаратов, или в виде любой композиции, адаптированной для внутрикожной доставки (например, для внутрикожной доставки с помощью пластыря для внутрикожной доставки), где введение нескольких Капсул или инъекций вместе обеспечивает введение субъекту иммуногенно эффективного количества. Например, когда используются две ДНК-плазмиды, иммуногенно эффективное количество может составлять 3-4 мг/мл, по 1,5-2 мг/мл, обеспечиваемое каждой плазмидой. Также можно вводить иммуногенно эффективное количество субъекту и затем вводить другую дозу иммуногенно эффективного количества тому же субъекту по так называемой схеме первичной стимуляции. Эта общая концепция режима стимуляции хорошо известна специалисту в области вакцин. При необходимости к бустерным введениям могут быть добавлены дополнительные режимы.

Иммуногенную комбинацию, содержащую две ДНК-плазмиды, например первую ДНК-плазмиду, кодирующую соге антиген HBV, и вторую ДНК-плазмиду, кодирующую роI антиген HBV, можно вводить субъекту путем смешивания обеих плазмид и доставки смеси в один анатомический участок. Альтернативно, могут быть выполнены две отдельные иммунизации, каждая из которых доставляет одну экспрессионную плазмиду. В таких вариантах осуществления, независимо от того, вводят ли обе плазмиды за одну иммунизацию в виде смеси или за две отдельные иммунизации, первую ДНК-плазмиду и вторую ДНК-плазмиду можно вводить в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первую и вторую ДНК плазмиды вводят в соотношении 1:1 по массе.

Предпочтительно, субъект, подлежащий лечению согласно способам по изобретению, представляет собой субъекта, инфицированного HBV, в частности, субъекта, имеющего хроническую инфекцию HBV. Острая инфекция HBV характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, которая дополняется последующим широким адаптивным ответом (например, HBV-специфическими Т-клетками, нейтрализующими антителами), который обычно приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. В противном случае, такие ответы ухудшаются или уменьшаются из-за высокой вирусной и антигенной нагрузки, например, белки оболочки HBV продуцируются в избытке и могут высвобождаться в субвирусных частицах в 1000-кратном избытке к инфекци-

онному вирусу.

Хроническая инфекция HBV описана в фазах, характеризующихся вирусной нагрузкой, уровнями ферментов печени (некрвоспалительная активность), нагрузкой HBeAg или HBsAg или наличием антител к этим антигенам. Уровни кзкДНК остаются относительно постоянными и составляют примерно от 10 до 50 копий на клетку, хотя уровень виремии может значительно меняться. Персистенция видов кзкДНК приводит к развитию хронического состояния. Более конкретно, фазы хронической инфекции HBV включают: (i) иммунно-толерантную фазу, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальными или минимально повышенными уровнями ферментов печени; (ii) HBeAg-положительную фазу иммунной активации, в которой наблюдаются более низкие или снижающиеся уровни репликации вируса со значительно повышенными уровнями ферментов печени; (iii) неактивную фазу носительства HBsAg, которая представляет собой состояние низкого уровня репликации с низкими вирусными нагрузками и нормальными уровнями ферментов печени в сыворотке, которые могут следовать за сероконверсией HBeAg; и (iv) HBeAg-отрицательную фазу, при которой репликация вируса происходит периодически (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровней ферментов печени, распространены мутации в рге-соге и/или базальном соге промоторе, так что HBeAg не продуцируется инфицированными клетками.

Используемый в настоящем описании термин "хроническая инфекция HBV" относится к субъекту, у которого обнаруживаемое присутствие HBV наблюдается в течение более 6 месяцев. Субъект, имеющий хроническую инфекцию HBV, может находиться в любой фазе хронической инфекции HBV. Хроническую инфекцию HBV следует понимать в соответствии с ее обычным значением в данной области. Хроническая инфекция HBV может, например, характеризоваться персистенцией HBsAg в течение 6 месяцев или быть более поздней острой инфекцией HBV. Например, хроническая инфекция HBV, упомянутая в настоящем описании, согласуется с определением, опубликованным Центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC), согласно которому хроническую инфекцию HBV можно охарактеризовать с помощью лабораторных критериев, таких как: (i) отрицательный показатель по IgM антител к соге антигену гепатита В (IgM анти-HBc) и положительный показатель на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), антиген е гепатита В (HBeAg) или тест на нуклеиновую кислоту на ДНК вируса гепатита В, или (ii) положительный показатель на HBsAg или тест на нуклеиновую кислоту для ДНК HBV, или положительный показатель на HBeAg, полученный дважды с интервалом не менее 6 месяцев.

Предпочтительно, иммуногенно эффективное количество относится к количеству композиции или иммуногенной комбинации по изобретению, которое является достаточным для лечения хронической инфекции HBV.

В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий хроническую инфекцию HBV, подвергается лечению нуклеозидным аналогом (NUC) и является NUC-супрессивным. Используемый в настоящем описании термин "NUC-супрессивный" относится к субъекту, имеющему неопределяемый уровень вируса HBV и стабильные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примеры лечения нуклеозидными/нуклеотидными аналогами включают ингибиторы HBV-полимеразы, такие как энтакавир и тенофовир. Предпочтительно, субъект, имеющий хроническую инфекцию HBV, не имеет прогрессирующего фиброза или цирроза печени. У такого субъекта показатель METAVIR обычно ниже 3 в отношении фиброза, и результат фибросканирования менее 9 кПа. Система METAVIR представляет собой систему оценки, которая обычно используется для оценки степени воспаления и фиброза, основанная на гистопатологической оценке биопсии печени пациентов с гепатитом В. Система оценки основана на двух стандартизированных числах: одно отражает степень воспаления, а другое отражает степень фиброза.

Считается, что устранение или уменьшение хронического HBV позволит "перехватить" тяжелое заболевание печени на раннем этапе развития, включая вирусный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, способы применения также могут быть использованы в качестве терапии для лечения заболеваний, вызванных HBV. Примеры заболеваний, вызванных HBV, включают, без ограничения, цирроз печени, рак (например, гепатоцеллюлярную карциному) и фиброз, в частности, прогрессирующего фиброз, характеризующийся показателем METAVIR 3 или выше в отношении фиброза. В таких вариантах осуществления иммуногенно эффективное количество представляет собой количество, достаточное для достижения постоянной потери HBsAg в течение 12 месяцев и значительного снижения тяжести клинического заболевания (например, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и т.д.).

Способы согласно вариантам осуществления изобретения дополнительно включают введение нуждающемуся в этом субъекту другого иммуногенного агента (такого как другой антиген HBV или другой антиген) или другого анти-HBV агента (такого как нуклеозидный аналог или другой анти-HBV агент) в комбинации с композицией по изобретению. Например, другой анти-HBV агент или иммуногенный агент может представлять собой малую молекулу или антитело, включая, без ограничения, ингибиторы иммунной контрольной точки (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т.д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адьюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адьювант FLT3L, генетический адьювант IL-12, IL-7-hyFc; CAR-T, которые связываются с env HBV (клетки S-CAR); модуляторы сборки капсида; ингибиторы кзкДНК, ингибиторы полимеразы HBV (например,

энтекавир и тенофовир). Один или более других активных анти-HBV агентов могут представлять собой, например, малую молекулу, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, белок или нуклеиновую кислоту. Один или более других анти-HBV агентов могут быть выбраны, например, из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; иммуномодуляторов; модуляторов toll-подобного рецептора 7; модуляторов toll-подобного рецептора 8; модуляторов toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора альфа интерферона; ингибиторов гиалуронидазы; модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; модуляторов toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; профилактических вакцин против гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса гепатита В; бессмысленных олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно анти-HBV бессмысленные олигонуклеотиды; малых интерферирующих РНК (миРНК), в частности, анти-HBV миРНК; модуляторов эндонуклеаз; ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; ингибиторов антигена вируса гепатита В; анти-антител, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; анти-HBV антител; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов соге или белков капсида HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; стимуляторов NOD2; рекомбинантного тимозина альфа-1; ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов PI3K; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунной контрольной точки, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; агонистов костимуляторных рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (более конкретно, Т-клетках), таких как CD27, CD28 и т.д.; ингибиторов ВТК; других лекарственных веществ для лечения HBV; ингибиторов IDO; ингибиторов аргиназы; и ингибиторов KDM5.

Способы доставки.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению могут быть введены субъекту любым способом, известным в данной области техники с учетом настоящего изобретения, включая, без ограничения, парентеральное введение (например, внутримышечную, подкожную, внутривенную или внутривенную инъекцию), пероральное введение, трансдермальное введение и назальное введение. Предпочтительно композиции и иммуногенные комбинации вводят парентерально (например, путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции) или трансдермально.

В некоторых вариантах осуществления, в которых композиция или иммуногенная комбинация содержит одну или более ДНК плазмид, введение может представлять собой инъекцию через кожу, например, внутримышечную или внутривенную инъекцию, предпочтительно внутримышечную инъекцию. Внутримышечную инъекцию можно объединить с электропорацией, т.е. приложением электрического поля для облегчения доставки ДНК-плазмид к клеткам. Используемый в настоящем описании термин "электропорация" относится к использованию трансмембранного импульса электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране. Во время электропорации *in vivo* к клеткам прикладывают электрические поля соответствующей величины и продолжительности, вызывая переходное состояние повышенной проницаемости клеточной мембраны, что обеспечивает поглощение молекул клеткой, неспособных самостоятельно проходить через клеточные мембраны. Создание таких пор путем электропорации облегчает прохождение биомолекул, таких как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства и т.д., с одной стороны клеточной мембраны на другую. Было показано, что электропорация *in vivo* для доставки ДНК-вакцин значительно увеличивает поглощение плазмиды клетками-хозяевами, а также приводит к легкому и умеренному воспалению в месте инъекции. В результате эффективность трансфекции и иммунный ответ значительно улучшаются (например, до 1000 раз и 100 раз, соответственно) при внутривенной или внутримышечной электропорации по сравнению с обычной инъекцией.

В типичном варианте осуществления электропорацию комбинируют с внутримышечной инъекцией. Однако электропорацию также можно комбинировать с другими формами парентерального введения, например, внутривенной инъекцией, подкожной инъекцией и т.д.

Введение композиции, иммуногенной комбинации или вакцины по изобретению путем электропорации может быть выполнено с помощью устройств электропорации, которые выполнены с возможностью приложения к требуемой ткани млекопитающего импульса энергии, эффективного для образования обратимых пор в клеточных мембранах. Устройство электропорации может включать компонент электропорации, блок электродов или блок обработки. Компонент электропорации может включать один или более из следующих компонентов устройств электропорации: контроллер, генератор сигналов тока, тестер полного сопротивления, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент сообщения о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и переключатель питания. Электропорация может быть осуществлена с помощью устройства электропорации *in vivo*. Примеры устройств электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению, в частности, содержащих ДНК-плазмиды, включают CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA), электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.), систему доставки Tri-Grid™ (Ichor Medical Systems, Inc., Сан-Диего, Калифорния 92121) и описаны в патенте США № 7,646,445, па-

тенте США № 8,209,006, патенте США № 9,452,285, патенте США № 5,273,525, патенте США № 6,110,161, патенте США № 6,261,281, патенте США № 6,958,060 и патенте США № 6,939,862, патенте США № 7,328,064, патенте США № 6,041,252, патенте США № 5,873,849, патенте США № 6,278,895, патенте США № 6,319,901, патенте США № 6,912,417, патенте США № 8,187,249, патенте США № 9,364,664, патенте США № 9,802,035, патенте США № 6,117,660 и публикации международной заявки на патент WO2017172838, все из которых включены в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Другие примеры устройств электропорации *in vivo* описаны в международной заявке на патент озаглавленной "Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В", поданной в тот же день, что и настоящая заявка, с номером патентного поверенного 688097-405WO1, содержание которой включено в настоящее описание во всей их полноте посредством ссылки. Заявка на доставку композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению также предусматривают использование импульсного электрического поля, например, как описано, например, в патенте США № 6,697,669, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В других вариантах осуществления изобретения, в которых композиция или иммуногенная комбинация содержит одну или более ДНК-плазмид, способ введения является трансдермальным. Чрескожное введение может быть объединено с повреждением эпидермиса кожи для облегчения доставки ДНК-плазмид к клеткам. Например, для повреждения кожного эпидермиса можно использовать дерматологический пластырь. После удаления дерматологического пластыря композиция или иммуногенная комбинация могут быть нанесены на поврежденную кожу.

Способы доставки не ограничены вышеописанными вариантами осуществления и могут быть использованы любые средства для внутриклеточной доставки. Другие способы внутриклеточной доставки, предусмотренные способами применения, включают, без ограничения, инкапсуляцию липосом, наночастицы и т.д.

Адьюванты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ индукции иммунного ответа на HBV дополнительно включает введение адьюванта. Термины "адьювант" и "иммуностимулятор" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и определяются как одно или более веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адьювант используется для усиления иммунного ответа на антигены HBV и антигенные полипептиды HBV, указанные в заявке.

В соответствии с вариантами осуществления по изобретению, адьювант может присутствовать в иммуногенной комбинации или композиции по изобретению или вводиться в отдельной композиции. Адьювант может быть, например, малой молекулой или антителом. Примеры адьювантов, подходящих для применения по изобретению, включают, без ограничения, ингибиторы иммунной контрольной точки (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т.д.), агонисты toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные генетические адьюванты IRF3 и IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адьювант FLT3L, генетический адьювант IL-12 и IL-7-hyFc. Примеры адьювантов могут быть выбраны, например, из следующих анти-HBV агентов: ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; иммуномодуляторов; модуляторов toll-подобного рецептора 7; модуляторов toll-подобного рецептора 8; модуляторов toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора альфа интерферона; ингибиторов гиалуронидазы; модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; модуляторов toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; профилактических вакцин против гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса гепатита В; бессмысленных олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно анти-HBV бессмысленные олигонуклеотиды; малых интерферирующих РНК (миРНК), в частности, анти-HBV миРНК; модуляторов эндонуклеаз; ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; ингибиторы антигена вируса гепатита В; анти-антител, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; анти-HBV антител; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов core или белков капсида HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; стимуляторов NOD2; рекомбинантного тимозина альфа-1; ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов PI3K; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунной контрольной точки, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; агонистов костимуляторных рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (более конкретно, Т-клетках), таких как CD27, CD28 и т.д.; ингибиторов ВТК; других лекарственных веществ для лечения HBV; ингибиторов IDO; ингибиторов аргиназы; и ингибиторов KDM5.

Композиции и иммуногенные комбинации по изобретению также можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним другим анти-HBV агентом. Примеры анти-HBV агентов, подходящих для применения по изобретению, включают, без ограничения, малые молекулы, антитела и/или CAR-T терапию, которые связывают *env* HBV (клетки S-CAR), модуляторы сборки капсида, агонисты TLR (например, агонисты TLR7 и/или TLR8), ингибиторы кзкДНК, ингибиторы HBV-полимеразы (например, энтекавир и тенофовир) и/или ингибиторы иммунной контрольной точки и т.д. По меньшей мере один анти-HBV агент может быть выбран, например, из ингибиторов ДНК-полимеразы HBV; иммуномодуляторов; мо-

дуляторов toll-подобного рецептора 7; модуляторов toll-подобного рецептора 8; модуляторов toll-подобного рецептора 3; лигандов рецептора альфа интерферона; ингибиторов гиалуронидазы; модуляторов IL-10; ингибиторов HBsAg; модуляторов toll-подобного рецептора 9; ингибиторов циклофилина; профилактических вакцин против гепатита В; HBV терапевтических вакцин; ингибиторов проникновения вируса гепатита В; антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК, более конкретно анти-HBV антисмысловых олигонуклеотидов; малых интерферирующих РНК (миРНК), в частности, анти-HBV миРНК; модуляторов эндонуклеаз; ингибиторов рибонуклеотидредуктазы; ингибиторы антигена вируса гепатита В; анти-антител, нацеленных на поверхностные антигены вируса гепатита В; анти-HBV антител; антагонистов хемокинов CCR2; агонистов тимозина; цитокинов, таких как IL12; модуляторов сборки капсида, ингибиторов нуклеопротеинов (ингибиторов соге или белков капсида HBV); полимеров нуклеиновых кислот (NAP); стимуляторов индуцируемого ретиноевой кислотой гена 1; стимуляторов NOD2; рекомбинантного тимозина альфа-1; ингибиторов репликации вируса гепатита В; ингибиторов P13K; ингибиторов кзкДНК; ингибиторов иммунной контрольной точки, таких как ингибиторы PD-L1, ингибиторы PD-1, ингибиторы TIM-3, ингибиторы TIGIT, ингибиторы Lag3 и ингибиторы CTLA-4; агонистов костимуляторных рецепторов, которые экспрессируются на иммунных клетках (более конкретно, Т-клетках), таких как CD27, CD28 и т.д.; ингибиторов BTK; других лекарственных веществ для лечения HBV; ингибиторов IDO; ингибиторов аргиназы; и ингибиторов KDM5. Такие анти-HBV агенты можно вводить вместе с композициями и иммуногенными комбинациями по изобретению одновременно или последовательно.

Способы первичной/бустерной иммунизации.

Варианты осуществления изобретения также предусматривают введение субъекту иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации и затем введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации тому же субъекту в так называемом режиме стимуляции. Таким образом, в одном из вариантов осуществления композиция или иммуногенная комбинация по изобретению представляет собой праймерную вакцину, используемую для стимуляции иммунного ответа. В другом варианте осуществления композиция или иммуногенная комбинация по изобретению представляет собой бустерную вакцину, используемую для усиления иммунного ответа. Праймерные и бустерные вакцины по изобретению могут использоваться в способах по изобретению, раскрытых в настоящем описании. Эта общая концепция режима стимуляции хорошо известна специалисту в области вакцин. Любая из композиций и иммуногенных комбинаций по изобретению, раскрытых в настоящем описании, может быть использована в качестве праймирующих и/или бустерных вакцин для праймирования и/или инициации иммунного ответа на HBV.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция или иммуногенная комбинация по изобретению может быть введена для первичной иммунизации. Композицию или иммуногенную комбинацию можно повторно вводить для усиления иммунизации. При необходимости, схеме введения необязательно может быть дополнена дополнительными бустерными введениями комбинации композиции или вакцин. Адьювант может присутствовать в композиции по изобретению, используемой для усиления иммунизации, или может присутствовать в отдельной композиции, вводимой вместе с композицией или иммуногенной комбинацией по изобретению для усиления иммунизации, или может вводиться отдельно в качестве стимулирующей иммунизации. В тех вариантах осуществления, в которых адьювант включен в схему, адьювант предпочтительно используют для усиления иммунизации.

Иллюстративный и неограничивающий пример прайм-бустерной схемы включает введение субъекту однократной дозы иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению для стимуляции иммунного ответа; и затем введение другой дозы иммуногенно эффективного количества композиции или иммуногенной комбинации по изобретению для усиления иммунного ответа, при этом первую стимулирующую иммунизацию осуществляют примерно через две-шесть недель, предпочтительно через четыре недели после первоначальной праймерной иммунизации. Необязательно, примерно через 10-14 недель, предпочтительно через 12 недель, после первого осуществления праймерной иммунизации осуществляют дополнительную бустерную иммунизацию с помощью композиции или иммуногенной комбинации или другого адьюванта.

Наборы.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему иммуногенную комбинацию по изобретению. Набор может содержать первый полинуклеотид и второй полинуклеотид в отдельных композициях, или набор может содержать первый полинуклеотид и второй полинуклеотид в одной композиции. Набор может дополнительно содержать один или более адьювантов или иммуностимуляторов и/или других анти-HBV агентов.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ на HBV при введении в организм животного или человека можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo*, используя различные анализы, которые являются стандартными в данной области. Для общего описания методов, доступных для оценки возникновения и активации иммунного ответа, см., например, Coligan et al. (1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть выполнено путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффек-

торными клетками, в том числе полученными из CD4+ и CD8+ Т-клеток (например, количественного определения IL-10 или IFN-продуцирующих гамма-клеток с помощью ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, анализа пролиферации Т-клеток с помощью классического анализа [³H] тимидина или анализа на основе проточной цитометрии), с помощью анализа антиген-специфических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного субъекта (например, пептид-специфического лизиса в анализе цитотоксичности и т.д.).

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определить по связыванию антител и/или конкуренции за связывание (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, можно измерить с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Иммунные ответы также могут быть измерены с помощью анализа нейтрализующих антител, где нейтрализация вируса определяется как потеря инфекционности в результате взаимодействия/ингибирования/нейтрализации вируса специфическим антителом. Иммунный ответ может быть далее измерен с помощью анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Варианты осуществления

Варианты осуществления. Раздел 1.

Вариант 1 осуществления содержит выделенную или не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; причем предпочтительно укороченный ядерный антиген HBV способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV; более предпочтительно укороченный ядерный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы HBV В, С и D; еще более предпочтительно, укороченный ядерный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у субъекта-человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV; и наиболее предпочтительно, укороченная последовательность, кодирующая ядерный антиген HBV, содержит полинуклеотид, который на по меньшей мере, 90%, например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 2 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1, где укороченный ядерный антиген HBV состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 3 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, дополнительно содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 4 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 3, где сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, причем предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 5 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-4, где полинуклеотидная последовательность, кодирующая укороченный ядерный антиген HBV на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 6 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 5, где полинуклеотидная последовательность, кодирующая укороченный ядерный антиген HBV, содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 7 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 8 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7, где полимеразный антиген HBV способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV, предпочтительно полимеразный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV, и более предпочтительно, полимеразный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

Вариант осуществления 9 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7, где полимеразный антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 10 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-9, дополнительно содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 11 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 10, где сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, причем сигнальная последовательность предпочтительно кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 12 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-11, где первая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 13 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 12, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 14 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-13, дополнительно содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 15 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 14, где вторая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 16 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 15, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 17 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 14-16, кодирующую слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 18 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 17, где слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV через линкер.

Вариант осуществления 19 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 18, где линкер содержит аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, и n представляет собой целое число от 2 до 5, причем линкер предпочтительно кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 20 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 19, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 21 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 17-20, где слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность, причем сигнальная последовательность предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, более предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 22 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-21, дополнительно содержащую промоторную последовательность, необязательно одну или более дополнительные регуляторные последовательности, причем промоторная последовательность предпочтительно содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17, и дополнительную регуляторную последовательность выбирают из группы, состоящей из энхансерных последовательностей SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 23 и сигнальной последовательности полиаденилирования SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 23 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-22, где не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты не кодирует антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 24 содержит вектор, содержащий не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-24.

Вариант осуществления 25 содержит вектор по варианту осуществления 24, в котором не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования, причем, необязательно, не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит вторую полинуклеотидную последовательность.

Вариант осуществления 26 содержит вектор по варианту осуществления 24 или 25, который пред-

ставляет собой ДНК-плазмидный вектор, и ДНК-плазмидный вектор дополнительно содержит точку начала репликации и ген резистентности к антибиотику.

Вариант осуществления 27 содержит вектор по варианту осуществления 26, где ДНК-плазмидный вектор содержит точку начала репликации, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, ген резистентности к антибиотику, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и, необязательно, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 28 содержит вектор по варианту осуществления 24 или 25, который представляет собой аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26 или Ad35.

Вариант осуществления 29 содержит вектор по варианту осуществления 28, который представляет собой вектор Ad26, содержащий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, по любому из вариантов осуществления 1-6.

Вариант осуществления 30 содержит вектор по варианту осуществления 28, который представляет собой вектор Ad26, содержащий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, кодирующую полимеразный антиген HBV, по любому из вариантов осуществления 7-13.

Вариант осуществления 31 содержит вектор по варианту осуществления 28, который представляет собой вектор Ad26, содержащий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок по любому из вариантов осуществления 17-21.

Вариант осуществления 31a содержит вектор по любому из вариантов осуществления 28-31, где аденовирусный вектор содержит промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 32 содержит не встречающийся в природе полипептид, кодируемый не встречающейся в природе молекулой нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-32.

Вариант осуществления 33 содержит клетку-хозяина, содержащую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-23 или вектор по любому из воплощений 24-32.

Вариант осуществления 34 содержит композицию, содержащую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-23, вектор по любому из вариантов осуществления 24-32 или не встречающийся в природе полипептид по варианту осуществления 33, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 35 содержит композицию по варианту осуществления 34, содержащую первый полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 7-13, второй полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 14-16 и фармацевтически приемлемый носитель, где первый и второй полинуклеотиды не содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в одном и том же векторе нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 36 содержит композицию по варианту осуществления 35, где первый и второй полинуклеотиды содержатся в двух отдельных векторах, предпочтительно аденовирусных векторах, более предпочтительно векторах Ad26.

Вариант осуществления 37 содержит набор, содержащий:

(a) первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H;

(b) вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель,

причем первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты или в двух разных не встречающихся в природе молекулах нук-

леиновой кислоты.

Вариант осуществления 38 содержит набор по варианту осуществления 37, в котором полимеразный антиген HBV способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV, предпочтительно полимеразный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV, и более предпочтительно, полимеразный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

Вариант осуществления 39 содержит набор по варианту осуществления 37, в котором полимеразный антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 40 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-39, в котором по меньшей мере одна из первой не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты и второй не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с по меньшей мере одним из полимеразного антигена HBV и укороченного ядерного антигена HBV.

Вариант осуществления 41 содержит набор по варианту осуществления 40, в котором сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, предпочтительно сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 42 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-41, в котором первая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 43 содержит набор по варианту осуществления 42, в котором первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 44 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-43, где вторая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 45 содержит набор по варианту осуществления 44, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 46 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-45, в котором по меньшей мере одна из первой не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты и второй не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промоторную последовательность, необязательно энхансерную последовательность и, дополнительно, необязательно последовательность сигнала полиаденилирования, причем промоторная последовательность предпочтительно имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17, энхансерная последовательность независимо имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 23, и последовательность сигнала полиаденилирования независимо имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 47 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-46, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV, а также антигена HBV, выбранного из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 48 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-47, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одном и том же векторе.

Вариант осуществления 49 содержит набор варианта осуществления 48, в котором вектор кодирует полимеразный антиген HBV и укороченный ядерный антиген HBV в виде двух отдельных белков.

Вариант осуществления 50 включает набор по варианту осуществления 49, в котором вектор кодирует слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 51 содержит набор по варианту осуществления 50, в котором слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV через линкер.

Вариант осуществления 52 содержит набор по варианту осуществления 51, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, и n представляет собой целое число от 2 до 5, предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 53 содержит набор по варианту осуществления 52, в котором слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 54 содержит набор по варианту осуществления 53, в котором слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность, причем предпочтительно сигнальная после-

довательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, более предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 55 содержит набор по варианту осуществления 54, в котором слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 56 содержит набор по любому из вариантов осуществления 48-55, в котором вектор содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, вторую полинуклеотидную последовательность, последовательность, кодирующую линкер, первую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 57 содержит набор по варианту осуществления 56, в котором вектор представляет собой аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26 или Ad35.

Вариант осуществления 58 содержит набор по варианту осуществления 57, в котором аденовирусный вектор содержит промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 59 содержит набор по варианту осуществления 58, не содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV, или антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 60 содержит набор по любому из вариантов осуществления 37-59, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в двух разных векторах.

Вариант осуществления 61 содержит набор по варианту осуществления 60, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует в первом ДНК-плазмидном векторе, а вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует во втором ДНК-плазмидном векторе.

Вариант осуществления 62 содержит набор по варианту осуществления 61, в котором каждый из первого и второго ДНК-плазмидных векторов содержит точку начала репликации, ген резистентности к антибиотикам и, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, регуляторную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность или вторую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 63 содержит набор по варианту осуществления 62, в котором ген резистентности к антибиотикам представляет собой ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 12, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 64 содержит набор по варианту осуществления 63, содержащий:

(а) первый ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

(б) второй ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

(с) фармацевтически приемлемый носитель,

причем каждый из первого ДНК-плазмидного вектора и второго ДНК-плазмидного вектора дополнительно содержит ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность

SEQ ID NO: 12, и точку начала репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и

причем первый ДНК-плазмидный вектор и второй ДНК-плазмидный вектор присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

Вариант осуществления 65 содержит набор по варианту осуществления 60, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует в первом аденовирусном векторе, предпочтительно в векторе Ad26, и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует во втором аденовирусном векторе, предпочтительно векторе Ad26.

Вариант осуществления 66 содержит набор по варианту осуществления 65, в котором каждый из первого и второго аденовирусных векторов содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, регуляторную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность или вторую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 67 содержит набор по варианту осуществления 66, содержащий:

(b) первый Ad26 вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;

(b) второй Ad26 вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель,

причем каждый из первого Ad26 вектора и второго Ad26 вектора присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

Вариант осуществления 68 содержит набор по любому из вариантов осуществления 64-67, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена HBV оболочки (Env) и антигена белка L HBV, и антигена HBV, выбранного из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 69 содержит композицию по любому из вариантов осуществления 34-36 или набор по любому из вариантов осуществления 37-68 для применения для индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV), причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией.

Вариант осуществления 70 содержит комбинацию другого иммуногенного агента, предпочтительно другого антигена HBV, с композицией по любому из вариантов осуществления 34-36 или набором по любому из вариантов осуществления 37-68 для применения для индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV), причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией.

Вариант осуществления 71 содержит композицию по любому из вариантов осуществления 34-36 или набор по любому из вариантов осуществления 37-68 для применения для лечения заболевания, индуцированного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта, причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией, и причем заболевание, индуцированное вирусом гепатита В (HBV), выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Вариант осуществления 72 содержит комбинацию другого иммуногенного агента, предпочтительно другого антигена HBV, с композицией по любому из вариантов осуществления 34-36 или набором по любому из вариантов осуществления 37-68 для применения для лечения заболевания, индуцированного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта, причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией, и причем заболевание, индуцированное вирусом гепатита В (HBV), выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Варианты осуществления. Раздел 2.

Вариант осуществления 1 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична после-

довательности SEQ ID NO: 4, где антиген HBV полимеразы не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н.

Вариант осуществления 2 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 1, где полимеразный антиген HBV способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV, причем предпочтительно полимеразный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV, и более предпочтительно, полимеразный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

Вариант осуществления 3 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1, где полимеразный антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 4 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-3, дополнительно содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 5 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4, где сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 6 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-5, где первая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 7 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 6, где первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 8 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-7, дополнительно содержащую вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 9 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 8, где вторая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 10 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, где вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 11 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 8-10, кодирующую слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 12 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 11, где слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV через линкер.

Вариант осуществления 13 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 12, где линкер содержит аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, и n представляет собой целое число от 2 до 5, причем предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 14 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 13, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 15 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 11-14, где слитый белок дополнительно содержит сигнальную последовательность, причем предпочтительно сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, более предпочтительно сигнальная последовательность кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 16 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-15, дополнительно содержащую промоторную последовательность, необязательно одну или более дополнительные регуляторные последовательности, причем предпочтительно промоторная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17, и дополнительную регуляторную последовательность выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 23, и последовательности сигнала полиаденилирования SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 17 содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-16, где не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой

кислоты не кодирует антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 18 содержит вектор, содержащий не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17.

Вариант осуществления 19 содержит вектор по варианту осуществления 18, в котором не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования, причем, необязательно, не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит вторую полинуклеотидную последовательность.

Вариант осуществления 20 содержит вектор по варианту осуществления 18 или 19, где вектор представляет собой ДНК-плазмидный вектор, причем ДНК-плазмидный вектор дополнительно содержит точку начала репликации и ген резистентности к антибиотику.

Вариант осуществления 21 содержит вектор по варианту осуществления 20, где ДНК-плазмидный вектор содержит точку начала репликации, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, ген резистентности к антибиотику, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и, необязательно, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 22 содержит вектор по варианту осуществления 18 или 19, где вектор представляет собой аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26 или Ad35.

Вариант осуществления 23 содержит вектор по варианту осуществления 22, где аденовирусный вектор содержит промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 24 содержит не встречающийся в природе полипептид, кодируемый не встречающейся в природе молекулой нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-17.

Вариант осуществления 25 содержит клетку-хозяина, содержащую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17 или вектор по любому из вариантов осуществления 18-23.

Вариант осуществления 26 содержит композицию, содержащую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17, вектор по любому из вариантов осуществления 18-23 или не встречающийся в природе полипептид по варианту осуществления 24, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 27 содержит композицию по варианту осуществления 26, содержащую первый полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-7, второй полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 8-10 и фармацевтически приемлемый носитель, где первый и второй полинуклеотиды не содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в одном и том же векторе нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 28 содержит набор, содержащий:

(а) первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы Н;

(б) вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

(с) фармацевтически приемлемый носитель,

причем первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты или в двух разных не встречающихся в природе молекулах нук-

леиновой кислоты.

Вариант осуществления 29 содержит набор по варианту осуществления 28, в котором полимеразный антиген HBV способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего на по меньшей мере два генотипа HBV, причем предпочтительно полимеразный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего на по меньшей мере генотипы В, С и D HBV, и более предпочтительно, полимеразный антиген HBV способен индуцировать CD8 Т-клеточный ответ у человека на по меньшей мере генотипы А, В, С и D HBV.

Вариант осуществления 30 содержит набор по варианту осуществления 29, где полимеразный антиген HBV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 31 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-30, в котором по меньшей мере одна из первой не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты и второй не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность, функционально связанную с по меньшей мере одним из полимеразного антигена HBV и укороченного ядерного антигена HBV.

Вариант осуществления 32 содержит набор по варианту осуществления 31, в котором сигнальная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, причем предпочтительно сигнальная последовательность независимо кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 33 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-32, в котором первая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 34 содержит набор по варианту осуществления 33, в котором первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 35 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-34, в котором вторая полинуклеотидная последовательность на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 36 содержит набор по варианту осуществления 35, в котором вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 37 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-36, в котором по меньшей мере одна из первой не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты и второй не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промоторную последовательность, необязательно энхансерную последовательность и, дополнительно, необязательно последовательность сигнала полиаденилирования, причем предпочтительно промоторная последовательность имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17, энхансерная последовательность независимо имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 23 и последовательность сигнала полиаденилирования независимо имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 38 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-37, в котором набор не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV, и HBV антигена, выбранного из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 39 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-38, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одном и том же векторе.

Вариант осуществления 40 содержит набор по варианту осуществления 39, в котором вектор кодирует полимеразный антиген HBV и укороченный ядерный HBV антиген в виде двух отдельных белков.

Вариант осуществления 41 содержит набор по варианту осуществления 39, в котором вектор кодирует слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

Вариант осуществления 42 содержит набор по варианту осуществления 41, в котором слитый белок содержит укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV через линкер.

Вариант осуществления 43 содержит набор по варианту осуществления 42, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность (AlaGly)_n, и n представляет собой целое число от 2 до 5, причем предпочтительно линкер кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 44 содержит набор по варианту осуществления 43, в котором слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 45 содержит набор по варианту осуществления 44, в котором слитый белок

дополнительно содержит сигнальную последовательность, причем предпочтительно сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19, более предпочтительно сигнальная последовательность представляет собой кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 46 содержит набор по варианту осуществления 45, в котором слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 47 содержит набор по любому из вариантов осуществления 41-46, в котором вектор содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, вторую полинуклеотидную последовательность, последовательность, кодирующую линкер, первую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 48 содержит набор по варианту осуществления 47, в котором вектор представляет собой аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26 или Ad35.

Вариант осуществления 49 содержит набор по варианту осуществления 48, в котором аденовирусный вектор содержит промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 50 содержит набор по варианту осуществления 49, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HBV антиген, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV, или антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 51 содержит набор по любому из вариантов осуществления 28-38, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в двух разных векторах.

Вариант осуществления 52 содержит набор по варианту осуществления 51, в котором первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует в первом ДНК-плазмидном векторе, и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует во втором ДНК-плазмидном векторе.

Вариант осуществления 53 содержит набор по варианту осуществления 52, в котором каждый из первого и второго ДНК-плазмидных векторов содержит точку начала репликации, ген резистентности к антибиотику и, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, регуляторную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность или вторую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 54 содержит набор по варианту осуществления 53, в котором ген резистентности к антибиотику представляет собой ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 12, предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 55 содержит набор по варианту осуществления 54, содержащий:

(а) первый ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

(б) второй ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

(с) фармацевтически приемлемый носитель,

причем каждый из первого ДНК-плазмидного вектора и второго ДНК-плазмидного вектора допол-

нительно содержит ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, и точку начала репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и

причем первый ДНК-плазмидный вектор и второй ДНК-плазмидный вектор присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

Вариант осуществления 56 содержит набор по варианту осуществления 55, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HBV антиген, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV, или антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена оболочки (Env) HBV и антигена белка L HBV.

Вариант осуществления 57 содержит композицию по варианту осуществления 26 или набор по любому из вариантов осуществления 27-55 для применения для индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV), причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией.

Вариант осуществления 58 содержит комбинацию другого иммуногенного агента, предпочтительно другого антигена HBV, с композицией по варианту осуществления 26 или набором по любому из вариантов осуществления 27-55 для применения для индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа на вирус гепатита В (HBV), причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией.

Вариант осуществления 59 содержит композицию по варианту осуществления 26 или 27 или набор по любому из вариантов осуществления 28-56 для применения для лечения заболевания, индуцированного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта, причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией, и причем заболевание, индуцированное вирусом гепатита В (HBV), выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Вариант осуществления 60 содержит комбинацию другого иммуногенного агента, предпочтительно другого антигена HBV, с композицией по варианту осуществления 26 или 27 или набором по любому из вариантов осуществления 28-56 для применения для лечения заболевания, индуцированного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта, причем предпочтительно субъект страдает хронической HBV инфекцией, и причем заболевание, индуцированное вирусом гепатита В (HBV), выбирают из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

Примеры

Приведенные ниже примеры изобретения предназначены для дополнительной иллюстрации природы изобретения. Следует понимать, что приведенные ниже примеры не предназначены для ограничения изобретения и его объема, определенного прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Создание последовательностей Core и Pol антигенов HBV и оптимизация плазмиды.

Предполагается, что Т-клеточный эпитоп на Core белке вируса гепатита В является важным для элиминации инфекции гепатита В, и что белки вируса гепатита В, такие как полимеразы могут служить для увеличения широты ответа. Таким образом, ядерный и полимеразный белки вируса гепатита В были выбраны для создания терапевтической вакцины против вируса гепатита В (HBV).

Получение консенсусных последовательностей ядерного и полимеразного антигенов HBV.

Консенсусные последовательности pol и core антигенов HBV получали на основе генотипов В, С и D HBV. Из разных источников HBV получали разные последовательности, которые выравнивали отдельно для ядерного белка и белка-полимеразы. Исходные выравнивания последовательностей для всех подтипов (от А до Н) впоследствии ограничили генотипами В, С и D HBV. Консенсусные последовательности определяли для каждого выравнивания белка в каждом подтипе отдельно и совместно для всех последовательностей BCD. В изменяющихся положениях выравнивания в консенсусной последовательности использовали наиболее часто встречающуюся аминокислоту.

Оптимизация ядерного антигена HBV.

Консенсусную последовательность ядерного антигена HBV оптимизировали путем делеции нативного вирусного белка. В частности, вводили делецию из тридцати четырех аминокислот, соответствующих С-концевому сегменту с высоким положительным зарядом, необходимым для пре-геномной инкапсуляции РНК.

Оптимизация Pol антигена HBV.

Консенсусную последовательность pol антигена HBV оптимизировали путем замены четырех остатков для удаления ферментативной активности обратной транскриптазы и активности РНКазы Н. В частности, в мотиве "YXDD" домена обратной транскриптазы остатки аспартата (D) заменяли аспарагиновыми остатками (N) для полного устранения координационной функции и, таким образом, связывания нуклеотид/ион металла. Кроме того, в мотиве "DEDD" домена РНКазы Н первый остаток аспартата (D) заменяли остатком аспарагина (N), а первый остаток глутамата (E) заменяли остатком глутамина (A) для устранения координационных связей Mg²⁺. Кроме того, последовательность pol антигена HBV оптимизировали по кодонам для скремблирования внутренних открытых рамок считывания белков оболочки,

включая белок S и варианты белка S с N-концевыми удлинениями pre-S1 и pre-S2. В результате были удалены открытые рамки считывания для белков оболочки (pre-S1, pre-S2 и S-белок) и X-белка. Оптимизация стратегий экспрессии core и pol антигенов HBV Для получения максимальных и одинаковых уровней экспрессии как core, так и pol антигенов из плазмидных векторов протестировали три различные стратегии: (1) слияние core и pol антигенов HBV в рамке считывания через короткую последовательность AGAG, вставленную между кодирующими последовательностями с получением одного Core-Pol слитого белка (фиг. 2A); (2) экспрессия core и pol антигенов из одной плазмиды с использованием участка проскальзывания рибосомы, в частности, участка проскальзывания FA2 ящура (FMDV), с образованием бисцистронного вектора экспрессии, экспрессирующего отдельные белки core и pol из одной мРНК (фиг. 2B); и (3) две отдельные плазмиды, кодирующие core и pol антигены HBV, соответственно (фиг. 2C).

Анализ экспрессии *in vitro*.

Кодирующие последовательности консенсусных core и pol антигенов HBV в соответствии с каждой из трех вышеуказанных стратегий экспрессии клонировали в коммерчески доступную экспрессионную плазмиду pcDNA3.1. Клетки HEK-293T трансфицировали векторами, и экспрессию белка оценивали вестерн-блот анализом с использованием core-специфического антигена HBV.

Оптимизация пост-транскрипционных регуляторных элементов.

Оценивали четыре различных пост-транскрипционных регуляторных элемента в отношении усиления экспрессии белка путем стабилизации первичного транскрипта, облегчения его экспорта в ядро и/или улучшения транскрипционно-трансляционного связывания: (1) пост транскрипционный регуляторный элемент Woodchuck HBV (WPRE) (GenBank: J04514.1); (2) последовательность интрон/экзон, полученную из предшественника человеческого аполипопротеина A1 (GenBank: X01038.1); (3) нетранслируемый домен R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса лейкемии типа 1 человека (HTLV-1) (GenBank: KM023768.1); и (4) композитная последовательность, состоящая из HTLV-1 LTR, синтетического интрона β -глобина кролика (GenBank: V00882.1) и энхансера сплайсинга (тройная композитная последовательность). Энхансерные последовательности вводили в плазмиды между промотором CMV и последовательностями, кодирующими антиген HBV. Результаты вестерн-блот анализа не показали существенного различия в уровнях экспрессии core антигена при экспрессии из плазмиды в присутствии и в отсутствие элемента WPRE (фиг. 2D). Однако, при оценке вестерн-блот анализом экспрессии core антигена в клетках HEK293T, трансфицированных плаزمидами, имеющими другие три посттранскрипционные регуляторные последовательности было обнаружено, что тройная энхансерная последовательность приводила к самой сильной экспрессии core антигена (фиг. 2E).

Выбор сигнального пептида для эффективной секреции белка.

Выполняли оценку трех различных сигнальных пептидов, введенных в рамку на N-конце core антигена HBV: (1) сигнальный пептид тяжелой цепи Ig SPIgG (BAA75024.1); (2) сигнальный пептид эпсилон-тяжелой цепи IgI SPIgE (AAB59424.1); и (3) сигнальный пептид предшественника цистатина S SPCS (NP_0018901.1). Участки расщепления сигнального пептида оптимизировали *in silico* для слияния с core с помощью программы прогнозирования Signal P. Эффективность секреции определяли путем анализа уровней core белка в супернатанте. Вестерн-блот анализ секреции core антигена с использованием трех разных сигнальных пептидов, слитых на N-конце, продемонстрировал, что сигнальный пептид цистатина S приводит к наиболее эффективной секреции белка (фиг. 2F).

Оптимизация вектора ДНК-вакцины.

Оптимизированные экспрессионные кассеты, содержащие тройную композитную энхансерную последовательность перед последовательностью, кодирующей антиген HBV, с N-концевой последовательностью сигнального пептида цистатина S, клонировали в ДНК-вакцинный вектор pVax-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Экспрессионная кассета в pVax-1 содержит человеческий промотор CMV-IE, за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), полученная из бычьего гормона роста (BGH). Бактериальное размножение управляется pUC ori-репликоном и геном резистентности к канамицину (Kan R), управляемым небольшим эукариотическим промотором. Репликация pUC ori, экспрессионная кассета KanR и экспрессионная кассета, управляемые промотором CMV-IE, находятся в одной и той же ориентации внутри плазмидного остова. Однако в векторе pVax-1 наблюдалось заметное снижение экспрессии core антигена по сравнению с уровнем экспрессии, наблюдаемым в векторе pcDNA3.1.

Для улучшения экспрессии белка использовали несколько стратегий: (1) изменение ориентации всей кассеты pUCori-KanR в направлении против часовой стрелки (ядро pVD); и (2) изменение использования кодонов гена KanR вместе с заменой промотора Kan промотором Amp из вектора pcDNA3.1 (pDKcore). Обе стратегии восстанавливают экспрессию core антигена, но экспрессия core антигена была наиболее высокой в векторе pDK, который содержал совместимый по кодонам ген Kan R, промотор AmpR (вместо промотора KanR) и кассету pUCori-KanR в обратной ориентации.

Показанные на фиг. 2G четыре различные оптимизированные экспрессионные кассеты core/pol антигена HBV вводили в остов плазмиды pDK для тестирования каждой из трех стратегий экспрессии, показанных на фиг. 2A-2C. Плазмиды тестировали *in vitro* на экспрессию core и pol антигенов с помощью вестерн-блот анализа с использованием антител к core и pol. Наиболее совместимый профиль экспрессии

клеточных и секретируемых core и pol антигенов получали, когда core и pol антигены кодировались в виде отдельных векторов, а именно отдельными ДНК-векторами pDK-core и pDK-pol (фиг. 2H). Схематическое представление векторов pDK-pol и pDK-core дано на фиг. 3А и 3В, соответственно.

Пример 2. Создание аденовирусных векторов, экспрессирующих укороченный core антиген HBV, слитый с Pol антигеном HBV.

Аденовирусный вектор конструировали в виде слитого белка, экспрессируемого из одной открытой рамки считывания. Также рассматривали дополнительные конфигурации для экспрессии двух белков, например, например используя две отдельные экспрессионные кассеты или используя 2А-подобную последовательность для разделения двух последовательностей.

Конструирование экспрессионных кассет для аденовирусных векторов.

Экспрессионные кассеты (см. фиг. 8А и 8В) состоят из промотора CMV (SEQ ID NO: 17), интрона (SEQ ID NO: 23) (фрагмента, полученного из гена человеческого ApoA1 - пары 295-523 под номером доступа в GenBank X01038, несущие второй интрон ApoA1), за которым следует оптимизированная кодирующая последовательность - либо один core, либо ядерный белок, слитый с полимеразой, которому предшествует кодирующая сигнальная последовательность секретиции человеческого иммуноглобулина (SEQ ID NO: 18), за которой следует сигнал полиаденилирования SV40 (SEQ ID NO: 24).

Сигнал секретиции был включен, поскольку, исходя из прошлого опыта, он способствовал улучшению технологичности некоторых аденовирусных векторов, содержащих секретируемые трансгены, не оказывая при этом влияния на вызываемый Т-клеточный ответ (эксперименты на мышах).

Последние два остатка белка Core (VV) и первые два остатка белка-полимеразы (MP), в случае слияния, дают последовательность соединения (VVMP), которая присутствует в человеческом белке дофаминового рецептора (изоформа D3), наряду с фланкирующими гомологами.

Введение линкера AGAG между ядерной и полимеразной последовательностями устраняет эту гомологию, и Blast не показывает никаких новых совпадений в человеческом протеоме.

Пример 3. Изучение иммуногенности *in vivo* ДНК-вакцины у мышей.

Иммунотерапевтическую ДНК-вакцину, содержащую ДНК-плазмиды, кодирующие ядерный антиген HBV или полимеразный антиген HBV, тестировали на мышах. Цель исследования заключалась в том, чтобы обнаружить Т-клеточные ответы, вызванные вакциной после внутримышечной доставки мышам BALB/c посредством электропорации. Первоначальные исследования иммуногенности были направлены на определение клеточных иммунных реакций, которые могли бы быть вызваны введенными антигенами HBV.

В частности, протестированные плазмиды включали плазмиду pDK-Pol и плазмиду pDK-Core, как показано на фиг. 3А и 3В, соответственно, и как описано выше в примере 1. Плазмиды pDK-Pol кодировала полимеразный антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и плазмиды pDK-Core кодировала Core антиген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Сначала тестировали Т-клеточные ответы, индуцированные каждой плазмидой в отдельности. ДНК-плазмидную (pDNA) вакцину доставляли внутримышечно мышам Balb/c посредством электропорации с помощью коммерчески доступной системы TriGrid для внутримышечной доставки (TDS-IM), адаптированной для применения на мышинной модели в краниальную большеберцовую мышцу (cranialis tibialis). Дополнительное описание способов и устройства для внутримышечной доставки ДНК мышам путем электропорации можно найти в публикации международной заявки на патент WO2017172838 и заявке на патент США, озаглавленной "Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В", поданные в тот же день, что и настоящая заявка, с номером доверенности патентного поверенного 688097-405U1, раскрытия которых включены в настоящее описание во всей полноте в виде ссылки. В частности, матрицу TDS-IM устройства TDS-IM v1.0, имеющую решетку электродов с расстоянием между электродами 2,5 мм и диаметром электрода 0,030 дюйма, вводили чрескожно в выбранную мышцу с длиной проводника 3,2 мм и эффективной глубиной проникновения 3,2 мм, причем главная ось ромбовидной конфигурации электродов была ориентирована параллельно мышечным волокнам. После введения электрода начинали инъекцию для введения ДНК (например, 0,020 мл) в мышцу. После завершения IM инъекции локально прикладывали электрическое поле 250 В/см (приложенное напряжение 59,4-65,6 В с предельным значением приложенного тока менее 4 А, 0,16 А/с) общей длительностью примерно 400 мс на 10% рабочий цикл (т.е. воздействие активного напряжения составляет в общей сложности примерно 40 мс от общей длительности примерно 400 мс) с 6 суммарными импульсами. После завершения процедуры электропорации матрицу TriGrid удаляли, и животным давали время на восстановление. Введение высоких доз (20 мкг) мышам BALB/c проводили, как показано в табл. 1. Шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую core антиген HBV (pDK-core; группа 1), шести мышам вводили плазмидную ДНК, кодирующую pol антиген HBV (pDK-pol; группа 2), и две мыши получили пустой вектор в качестве отрицательного контроля. Животные получали две иммунизации ДНК с интервалом в две недели, и спленциты собирали через одну неделю после последней иммунизации.

Таблица 1

Схема экспериментального исследования по иммунизации мышей

Группа	N	пДНК	Участок односторон. введения (чередование сторон)	Доза	Объем	Дни введ.	Конечная точка (сбор спленоцитов) день
1	6	Core	СТ+EP	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
2	6	Pol	СТ+EP	20 мкг	20 мкл	0, 14	21
3	2	Пустой вектор (отр. контроль)	СТ+EP	20 мкг	20 мкл	0, 14	21

СТ, краниальная большеберцовая (cranialis tibialis) мышца; ЭП, электропорация.

Антигенспецифические ответы анализировали и количественно определяли с помощью IFN- γ иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT). В этом анализе выделенные спленоциты иммунизированных животных инкубировали в течение ночи с пулами пептидов, покрывающими белок Core, белок Pol или небольшую лидерную последовательность пептида и соединения (2 мкг/мл каждого пептида). Эти пулы состояли из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, соответствующими консенсусной последовательности BCD генотипов вакцинных векторов Core и Pol. Большой 94 кДа Pol белок HBV расщепляли посередине на два пептидных пула. Антиген-специфические Т-клетки стимулировали гомологичными пептидными пулами, и IFN- γ -положительные Т-клетки оценивали с помощью анализа ELISPOT. Высвобождение IFN- γ одной антигенспецифической Т-клеткой визуализировали с помощью соответствующих антител с последующим обнаружением, используя хромогенный субстрат, в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC).

Значимые Т-клеточные ответы на Core HBV получали у мышей, иммунизированных ДНК-плазмидой вакциной с рDK-Core (Группа 1) с получением 1000 SFC на 10 клеток (фиг. 4). Pol Т-клеточные ответы на пул пептидов Pol 1 были сильными (~1000 SFC на 10^6 клеток). Слабые анти-Pol клеточные ответы, направленные на Pol 2, вероятно, были вызваны ограниченным разнообразием МНС у мышей, явление, называемое Т-клеточной иммунодоминантностью, определяемое как неравное распознавание разных эпитопов из одного антигена. Для подтверждения результатов, полученных в этом исследовании, выполняли подтверждающее исследование (данные не показаны).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что вакцинация ДНК-плазмидной вакциной, кодирующей антигены HBV, вызывает клеточные иммунные ответы на введенные антигены HBV.

Пример 4. Исследование по определению дозы комбинированных рDK-Core/рDK-Pol плазмид для мышей.

Целью данного исследования по определению дозы комбинированных плазмид было оценить иммунные ответы у мышей на смесь ДНК-плазмидных векторов (пДНК), кодирующих core и pol антигены HBV, вводимые в один участок, с использованием разных доз ДНК. В этом исследовании иммунотерапевтическую ДНК-вакцину, содержащую 1:1 (мас./об.) смесь двух плазмид, плазмид рDK-pol и рDK-core, описанных в примере 1, тестировали на мышах. ДНК-вакцину доставляли мышам Balb/c в один анатомический участок внутримышечно посредством электропорации, как описано выше в примере 3. Вакцинацию комбинированных плазмид, экспрессирующих Core и Pol, в дозах 10 мкг, 1 мкг и 0,1 мкг ДНК каждой плазмиды на участок выполняли, как показано в табл. 2. В каждой группе тестировали по восемь мышей, и двум мышам вводили пустой вектор в качестве отрицательного контроля. Животные получали две иммунизации ДНК с интервалом в три недели, и спленоциты собирали через одну неделю после последней иммунизации.

Экспериментальная схема иммунизации мышей в эксперименте по определению дозы комбинированных плазмид

Группа	N	пДНК	Участок односторон. введения (чередование сторон)	Доза каждой пДНК на участок	Доза общих пДНК на участок	Дни введ.	Конечная точка (сбор спленоцитов) день
1	8	Core и Pol	СТ+EP	10 мкг	20 мкг	0, 21	28
2	8	Core и Pol	СТ+EP	1 мкг	2 мкг	0, 21	28
3	8	Core и Pol	СТ+EP	0,1 мкг	0,2 мкг	0, 21	28
4	2	Пустой вектор (отр. контроль)	СТ+EP	20 мкг	20 мкг	0, 21	28

пДНК, плазмидная ДНК; СТ, краниальная большеберцовая (cranialis tibialis) мышца; ЭП, электропорация.

Антиген-специфические ответы анализировали и количественно определяли с помощью IFN- γ иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT), как описано в примере 1. Значимые Т-клеточные ответы на Core и Pol были получены у мышей BALB/c, иммунизированных комбинированной ДНК-вакциной, состоящей из плазмиды pDK-Core и pDK-Pol (фиг. 5). Между группой 1, иммунизированной 10 мкг каждой плазмиды, и группой 2, иммунизированной только 1 мкг каждой плазмиды, не аблюдали статистических отличий в величине иммунных ответов. Этот результат позволяет предположить, что Т-клеточные ответы достигали максимального уровня при примерно 1 мкг плазмид, экспрессирующих Core и Pol антигены. Однако при 10-кратном уменьшении воздействия ДНК, т.е. при 0,1 мкг каждой плазмиды, наблюдалось существенное уменьшение количества SFC. Pol Т-клеточные ответы на пул пептидов Pol 1 были доминирующими. Слабые анти-Pol клеточные ответы, направленные на Pol 2, вероятно, были обусловлены ограниченным разнообразием МНС у инбредных мышей, явление, называемое иммунодоминантностью Т-клеток, определяемое как неравное распознавание разных эпитопов из одного антигена.

Вышеприведенные результаты показали, что мыши, иммунизированные комбинацией плазмид ДНК, экспрессирующих Core и Pol антигены HBV, демонстрируют значимые Т-клеточные ответы при дозах 1 мкг каждой плазмиды, при этом при дозе 0,1 мкг каждой плазмиды все еще наблюдался иммунный ответ на некотором уровне.

Пример 5. Изучение иммунной интерференции у мышей.

По практическим соображениям, было бы желательно разработать комбинированную ДНК-вакцину, содержащую Core и Pol антигены HBV, в виде комбинированного (смешанного) состава векторов. Однако в поливалентных вакцинах может наблюдаться иммунодоминантность, и иммунные ответы на субдоминантные антигены могут быть подавлены. Следовательно, оценивали иммунную интерференцию, т.е. снижение Core- и/или Pol-специфических клеточных ответов при введении комбинации двух антиген-экспрессирующих плазмид, смешанных вместе, по сравнению с иммунизацией любого из векторов в разных анатомических участках.

Мышей Balb/c вакцинировали ДНК-плазмидами pDK-core и/или pDK-pol внутримышечно посредством электропорации, как описано в примере 3. ДНК-плазмиды (пДНК) вводили в дозе 5 мкг на участок, либо по отдельности, либо объединяя (смешивая) на одном участке или объединяя в разные участки, как показано в табл. 3. Животные получали две иммунизации ДНК с интервалом в три недели, и спленоциты собирали через одну неделю после последней иммунизации.

Таблица 3

Схема иммунизации мышей для экспериментального исследования иммунной интерференции

Группа	№	пДНК	Участок односторон. введения (чередован не сторон)	Доза каждой пДНК на участок	Доза общей пДНК на участок	Дни введ.	Конечная точка (сбор спленоци тов) день
1	6	Core	Двусторонн. СТ	5 мкг	10 мкг	0, 21	28
2	6	Pol	Двусторонн. СТ	5 мкг	10 мкг	0, 21	28
3	6	Смесь Core и Pol	Двусторонн. СТ	10 мкг	20 мкг	0, 21	28
4	6	Core и Pol <i>по отдельнос ти</i>	Core в левую СТ Pol в правую СТ	10 мкг	20 мкг	0, 21	28
5	2	Пустой вектор (отр. контроль)	Bilateral СТ	10 мкг	20 мкг	0, 21	28

СТ, краниальная большеберцовая (cranialis tibialis) мышца.

Антиген-специфические ответы анализировали количественно определяли с помощью IFN- γ иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT), как описано в примере 1. Этот эксперимент подтвердил сильные Core и Pol-специфические ответы у мышей BALB/c (фиг. 6). Никакой значительной иммунной интерференции не наблюдали согласно практически идентичным Т-клеточным ответам, полученным для группы 3, в которой обе плазмиды были смешаны и введены в один и тот же участок, и для группы 4, в которой пДНК, экспрессирующие Core и Pol антигены, электропорировали по отдельности в двух разных участках. Одно животное в группе 1 показали низкий аномальный ответ, направленный на пул Pol 2. Тот же эксперимент повторяли на мышах C57/B16, и получили сопоставимые результаты.

Приведенные выше результаты демонстрируют, что при объединении двух плазмид, экспрессирующих антигены HBV, pDK-Core и pDK-Pol, иммунная интерференция практически отсутствует.

Пример 6. Оценка эффективности ДНК-вакцины у приматов, не являющихся человеком.

Целью данного исследования была оценка эффективности терапевтической ДНК-вакцины против HBV, доставляемой внутримышечно с помощью электропорации, и индукции и измерение HBV-специфического Т-клеточного ответа/активации клеток у обезьян *Сynomolgus* (*Macaca flavicularis*).

Вакцина.

Вакцина, использованная в этом исследовании, представляла собой комбинацию двух отдельных плазмид ДНК, кодирующих ядерный антиген HBV и полимеразный антиген HBV, соответственно. В частности, плазмидами ДНК были плазида pDK-Pol (кодирующая полимеразу полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4) и плазида pDK-Core (кодирующая ядерный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), как показано на фиг. 3А и 3В, соответственно, и описано в примере 1.

ДНК-плазмиды вводили в 1:1 (мас./мас.) смеси обеих плазмид, доставляемых в один анатомический участок. Приматов, отличных от человека (NHP), подвергали электропорации с помощью системы Tri-Grid внутримышечной доставки (TDS-IM), адаптированной для применения на модели NHP. Дополнительное описание способов и устройства для внутримышечной доставки ДНК NHP путем электропорации можно найти в публикации международной заявки на патент WO2017172838 и заявке на патент США, озаглавленной "Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В", поданные в тот же день, что и настоящая заявка, с номером доверенности патентного поверенного 688097-405U1, раскрытия которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. В частности, матрицу TDS-IM устройства TDS-IM v1.0 или TDS-IM v2.0, имеющую решетку электродов с расстоянием между электродами 6,0 мм и диаметром электрода 0,021 или 0,023 дюйма, вводили чрескожно в вы-

бранную мышцу с длиной проводника 3,2 мм и эффективной глубиной проникновения 3,2 мм, причем главная ось ромбовидной конфигурации электродов была ориентирована параллельно мышечным волокнам. Длина проводника составляла 5,0 мм для TDS-IM v1.0 или TDS-IM v2.0, тогда как эффективная глубина проникновения составляла 15,5 мм для TDS-IM v1.0 и 9,0 мм для TDS-IM v2.0. После введения электрода начинали инъекцию для введения ДНК (например, 1,0 мл) в мышцу. После завершения IM инъекции локально прикладывали электрическое поле 250 В/см (приложенное напряжение 142,4-157,6 В с предельными значениями приложенного тока менее 0,6-4 А, 0,16 А/с) общей длительностью примерно 400 мс на 10% рабочий цикл (т.е. воздействие активного напряжения составляет в общей сложности примерно 40 мс от общей длительности примерно 400 мс) с 6 суммарными импульсами. После завершения процедуры электропорации матрицу TriGrid удаляли, и животным давали время на восстановление. Первоначальное исследование иммуногенности было направлено на определение клеточных иммунных реакций, которые могли быть вызваны введенными антигенами HBV.

Приматы, не являющиеся людьми.

Макак *Сynomolgus* (n=30) получали из Китая (Covance Research Products Inc. Inc. США) в возрасте от 2,5 до 5 лет и весом от 3,0 до 5,0 кг на начало исследования. Их помещали в обогащенную среду в соответствии с рекомендациями ветеринарных служб и Национального исследовательского совета, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition, Washington DC: National Academies Press (2011). Животным давали время на акклиматизацию в течение 2 недель перед началом исследования. Перед каждым введением плазмиды электропорацией обезьян обезболивали кетаминном. Кровь собирали через 2 недели после каждой иммунизации во флаконы, содержащие гепарин натрия. РВМС выделяли с помощью градиента фикола и хранили до анализа в резервуарах с жидким азотом.

Внутримышечное/электропорационное введение приматам, не являющимся человеком.

Введение плазмиды осуществляли три раза (группа 1) в дни 0, 36 и 62, как показано в табл. 4. pDK-Core (1,0 мг) и pDK-Pol (1,0 мг) вводили посредством электропорации с помощью системы доставки, установленной на введение на глубину 19 мм (небольшую) в четырехглавую мышцу (*vastus lateralis*) мышцу. Каждую инъекцию вводили поочередно в разные мышцы. Шприц, содержащий плазмиду ДНК, был снабжен ограничителем глубины инъекции, подходящим для введения в четырехглавую мышцу ННР, обеспечивая введение в мышцу на целевую глубину примерно 10 мм, при этом главная ось ромбовидной конфигурации была ориентирована параллельно мышечным волокнам. Сразу после завершения внутримышечной инъекции активировали аппарат для электропорации для электростимуляции мышцы с амплитудой до 250 В на см расстояния между электродами в общей сложности до 40 мс в течение интервала 400 мс. Образцы собирали в дни 0, 14, 50 и 76 и анализировали с помощью ELISPOT и внутриклеточного окрашивания цитокинов.

Таблица 4

Экспериментальная схема вакцинации ННР							
Группа	N	пДНК	Участок	Доза	Доза	Дни вед.	Дни сбора образцов
			односторонний	каждой	общей		
			н. введения (чередование сторон)	пДНК на участок	пДНК на участок		
1	5	pDK-Core & pDK-Pol	СТ+EP	1,0 мг	2,0 мг	0, 36 и 62	0, 14, 50 и 76

ELISPOT Анализ.

Антигенспецифические ответы анализировали и количественно определяли с помощью IFN- γ иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT) с использованием набора Primate IFN- γ ELISpot (R & D Systems, США, номер по каталогу EL961). В этом анализе выделенные РВМС иммунизированных животных инкубировали в лунках трех повторах в течение ночи с пулами пептидов (2 мкг/мл), покрывающими белок Core и белок Pol. Эти пулы состоят из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, соответствующими консенсусной последовательности ABCD генотипа вакцинных векторов Core и Pol. Пептиды синтезировали с чистотой 90% (JPT, Германия). Большой 94 кДа белок Pol HBV расщепляли посередине на два пептидных пула. Высвобождение IFN- γ одной антигенспецифической Т-клеткой визуализировали с помощью соответствующих антител с последующим обнаружением с использованием хромогенного субстрата в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC). Результаты показаны на фиг. 7А.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) использовали для изучения индуцированных вакциной Т-клеточных ответов. Замороженные PBMC оттаивали и оставляли на ночь в среде RPMI с 10% FBS перед стимуляцией с помощью пула пептидов Core, Pol-1 или Pol-2 в соответствующей вакцине (2 мкг/мкл), ДМСО или коктейля активации лейкоцитов в течение 6 часов в среде RPMI с 10% FBS, содержащей ингибитор транспорта белка Golgiplug (1 мкг/мкл). Стимулированные клетки окрашивали красителем, фиксирующим жизнеспособные клетки, eFluor 780 (65-0865-14, eBioscience) и обрабатывали в течение 20 минут раствором для фиксации/проницаемости (554714, BD Biosciences) перед окрашиванием в течение 30 минут смесью для внутриклеточного окрашивания, как показано в таблице 5 ниже. Окрашенные клетки получали с помощью проточного цитометра Fortessa с соответствующими одноцветными компенсационными контролями. Величины ответа представляли в виде процента CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ , TNF- α или IL-2 после стимуляции. Результаты показаны на фиг. 7B.

Таблица 5

Панель антител, используемая для анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов

557705	CD3	Alexa fluor 488	SP34
563823	CD8	BUV786	RPA-T8
564107	CD4	BUV395	L200
554701	IFN γ	PE	B27
554514	TNF	APC	MAb11
564164	IL-2	BV421	MQ1-17H12

Результаты.

Данные ELISPOT (фиг. 7A) показали сильные ответы Core и Pol-2 после двух иммунизации. Третья иммунизация значительно увеличивала величину IFN- β . Пул пептидов Pol-1 вызывал промежуточный ответ, который также улучшался после третьей иммунизации, хотя и не так значительно, как при использовании Core и Pol-2. Данные для дня 76 включают только результаты четырех NHP, поскольку от пятой обезьяны не удалось получить образец крови. Высокий разброс в каждой группе обусловлен тем, что NHP получены из разных аутбредных популяций, и генетическое разнообразие может быть причиной различающихся иммунных ответов.

Данные анализа ICS (фиг. 7B) показали, что ответ цитокинов, вызванный стимуляцией пептидом HBV, обусловлен CD8 и специфичен для пулов пептидов Core и Pol-2, как ранее наблюдалось в ELISPOT. Ответы в анализе ICS и в анализе ELISPOT наблюдали у одних и тех же особей. Хотя некоторые отдельные ответы ICS не показывали положительный результат, как видно из данных ELISPOT, это может объясняться более высокой чувствительностью анализа ELISPOT.

Вывод.

Приведенные выше результаты демонстрируют, что NHP, иммунизированных комбинацией вакцины pDK-Core и pDK-Pol путем внутримышечной инъекции посредством электропорации, демонстрируют значимые Т-клеточные ответы в дозах 1,0 мг каждой плазмиды с обнаружением специфических для пептидов ответов после двух иммунизаций и еще больших ответов после трех иммунизаций. В день 76 результаты анализа ELISPOT показали, что пептидные пулы Core, Pol-1 и Pol-2 индуцировали положительные ответы IFN-Т-клеток в каждом протестированном NHP (4/5 NHP). ICS анализ PBMC из иммунизированных NHP показал, что специфический ответ на HBV-пептид обусловлен CD8, причем самые высокие ответы наблюдали для пулов Core и Pol-2.

Пример 7. Оценка эффективности ДНК-вакцины у людей.

Эффективность терапевтической ДНК-вакцины на HBV, доставляемой внутримышечно посредством электропорации, оценивали у людей.

Человеческие Субъекты.

Испытуемыми были взрослые пациенты с хронической HBV-инфекцией, которые были HBsAg-положительными. Испытуемых лечили ингибитором HBV-полимеразы (энтекавир или тенофовир).

Вакцина.

Испытуемым вводили комбинацию двух отдельных плазмид ДНК, кодирующих ядерный антиген HBV и полимеразный антиген HBV, соответственно. В частности, плазмидами ДНК были плазида pDK-Pol (кодирующая полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4) и плазида pDK-Core (кодирующая ядерный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), как показано на фиг. 3A и 3B, соответственно, и описано в примере 1. ДНК-плазмиды вводили в 1:1 смеси обеих плазмид различных дозах, в частности, дозах 0,25 мг, 1 мг и 6 мг общей плазмиды в соответствии с рандомизированным, плацебо-контролируемое исследование с эскалацией доз.

Внутримышечное/электропорационное введение людям ДНК-плазмиды вводили людям с помощью электропорации в 2-3 внутримышечных иммунизациях с использованием системы TriGrid для внутри-

мышечной доставки (TDS-IM), адаптированной для применения у людей. Некоторым пациентам в качестве контроля вводили плацебо (т.е. плазмиды, в которых отсутствовали кодирующие последовательности антигенов HBV). Система TriGrid™ для внутримышечной доставки (TDS-IM), адаптированная для применения у человека, используется для доставки плазмидной ДНК путем электропорации. Дополнительное описание способов и устройства для внутримышечной доставки ДНК человеку посредством электропорации можно найти в публикации международной заявки на патент WO2017172838 и заявке на патент США, озаглавленной "Способ и устройство для доставки вакцин против вируса гепатита В", поданные в тот же день, что и настоящая заявка, с номером доверенности патентного поверенного 688097-405U1, раскрытия которых включено в настоящее описание во всей их полноте в виде ссылки. Например, матрицу TDS-IM устройства TDS-IM v2.0, имеющую решетку электродов с расстоянием между электродами 6,0 мм и диаметром электрода 0,023 дюйма, вводили чрескожно в выбранную мышцу с главной осью ромбовидной конфигурации электродов, ориентированной параллельно мышечным волокнам. Длина проводника составляла 5,0 мм, тогда как эффективная глубина проникновения составляла 19 мм. После введения электрода начинали инъекцию для введения ДНК (например, 1,0 мл) в мышцу. После завершения IM инъекции локально прикладывали электрическое поле 250 В/см (приложенное напряжение 142,4-157,6 В с предельными значениями приложенного тока менее 0,6-4 А, 0,16 А/с) общей длительностью примерно 400 мс на 10% рабочий цикл (т.е. воздействие активного напряжения составляет в общей сложности примерно 40 мс от общей длительности примерно 400 мс) с 6 суммарными импульсами. После завершения процедуры электропорации матрицу TriGrid™ удаляли, и давали время на восстановление испытуемого.

В различные моменты времени после иммунизации у пациентов брали образцы крови. Развитие уровней HBsAg после иммунизации, особенно уровней, соответствующих эволюции до клинической сероконверсии, оценивали у пациентов через 3-6 месяцев после иммунизации. Постоянная потеря HBsAg и уменьшение клинического заболевания (например, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы) оценивали у пациентов через 6-12 месяцев после иммунизации.

Пример 8. Исследование *in vivo* иммуногенности аденовирусных векторов у мышей.

Иммунотерапевтическую вакцину, содержащую аденовирусные векторы, кодирующие ядерный антиген HBV или полимеразный антиген HBV, тестировали на мышах. Целью исследования было выявление Т-клеточных ответов, вызванных вакциной после внутримышечной доставки мышам F1 (C57BL/6×Balb/C). Первоначальные исследования на иммуногенность были направлены на определение клеточных иммунных ответов, которые могли бы быть вызваны введенными антигенами HBV. В частности, протестированные аденовекторы содержали экспрессионные кассеты, показанные на фиг. 8А и 8В.

Исследование *in vivo* иммуногенности.

Для оценки иммуногенности аденовирусной вакцины *in vivo* аденовирусные векторы HBV вводили внутримышечно мышам F1. Эти исследования иммуногенности были направлены на определение клеточных иммунных ответов, вызываемых ядерным и полимеразным антигенами HBV. Введение мышам F1 проводили, как показано в таблице 6. Животные получали одну иммунизацию аденовирусным вектором HBV. Спленоциты собрали через девять недель.

Таблица 6

Экспериментальная схема иммунизации мышей аденовирусными векторами

Группа	N	Примирование День 0	R	доза (vp)	Конечная точка день
1	4	Core Pol слитый+Core	IM	10 ⁸	63
2	4	Core Pol слитый+Core	IM	10 ⁹	63
3	4	Core Pol слитый+Core	IM	10 ¹⁰	63
7	4	Core Pol слитый	IM	10 ⁸	63
8	4	Core Pol слитый	IM	10 ⁹	63
9	4	Core Pol слитый	IM	10 ¹⁰	63

IM: внутримышечно; vp: вирусные частицы.

Оценка иммуногенности аденовирусных векторов HBV.

Антигенспецифические ответы анализировали и количественно определяли с помощью IFN-γ иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT). В этом анализе выделенные спленоциты иммунизированных животных инкубировали с пептидными пулами, покрывающими Core и Pol белки (2 мкг/мл каждого пептида). Пулы состояли из 15-мерных пептидов, которые перекрываются 11 остатками, соответствующими консенсусным последовательностям ABCD генотипа Core и Pol аденовирусных векторов. Большой 94 кДа Pol белок HBV расщепляли посередине на два пептидных пула. В ELISPOT высвобождение IFN-γ одной антиген-специфической Т-клеткой визуализировали с помощью соответствующих антител и последующего обнаружения с помощью хромогенного субстрата в виде окрашенного пятна на микропланшете, называемого пятнообразующей клеткой (SFC).

Результаты показаны на фиг. 9. Из результатов видно, что аденовирусные векторы HBV, особенно комбинация слитого Core и Pol аденовектора с Core аденовектором, вызывали Core- и Pol-специфические

T-клеточные ответы. Эти данные указывают на то, что аденовирусные векторы, кодирующие Core и Pol антигены HBV, вызывают устойчивые T-клеточные ответы на core и pol у мышей F1.

Понятно, что примеры и варианты осуществления, представленные в настоящем описании, предназначены только для иллюстративных целей, и что могут быть сделаны изменения в описанных выше вариантах осуществления без отклонения от сути изобретения. Следовательно, предполагается, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и предназначено для охвата модификаций, находящихся в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Литература.

1. Cohen et al. "Is chronic hepatitis B being undertreated in the United States?" *J. Viral Hepat.* (2011) 18(6), 377-83.

2. Obeng-Adjei et al. "DNA vaccine cocktail expressing genotype A and C HBV surface and consensus core antigens generates robust cytotoxic and antibody responses and mice and Rhesus macaques" *Cancer Gene Therapy* (2013) 20, 652-662.

3. World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204 [Internet] 2015 March. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.

4. Belloni et al. "IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome" *J. Clin. Invest.* (2012) 122(2), 529-537.

5. Michel et al. "Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges." *J. Hepatol.* (2011) 54(6), 1286-1296.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

(a) первую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий полимеразный антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H;

(b) вторую не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель,

причем первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты или в двух разных не встречающихся в природе молекулах нуклеиновой кислоты,

и причем полимеразный антиген HBV способен индуцировать T-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере против B, C и D генотипов HBV.

2. Иммуногенная композиция по п.1, в которой:

а) полимеразный антиген HBV способен индуцировать ответ CD8 T-клеток у человека против по меньшей мере генотипов A, B, C и D HBV;

б) первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты входят в состав невирусного вектора, выбранного из группы, состоящей из плазмид дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), искусственных хромосом бактерий, искусственных хромосом дрожжей, бактериофагов, репликонов рибонуклеиновой кислоты (РНК), репликонов матричной РНК (мРНК), модифицированных репликонов мРНК или самоамплифицирующихся мРНК и закрытых линейных дезоксирибонуклеиновых кислот;

в) первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты входят в состав вирусного вектора, выбранного из группы, состоящей из аденовирусных векторов, векторов аденоассоциированного вируса, векторов вируса оспы, векторов энтеросолюбильных вирусов, векторов вируса везикулярного лошадиного энцефалита, векторов вируса леса Семлики, векторов вируса табачной мозаики, лентивирусных векторов, вирусных векторов аренавируса, репликационно-дефицитные вирусных векторов аренавируса или репликационно-компетентных вирусных векторов аренавируса, двухсегментных или трехсегментных аренавирусов, инфекционных аренавирусных вирусных векторов, нуклеиновых кислот, которые содержат геномный сегмент аренавируса, где одна открытая рамка считывания геномного сегмента удалена или функционально инактивирована и заменена нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген HBV, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса Junin; и/или

г) первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты, и указанная одна и та же не встречающаяся в природе нуклеиновая кислота пред-

ставляет собой бицистронный вектор экспрессии, в котором индивидуальное ядро HBV и полимеразные антигены HBV экспрессируются из одного транскрипта мРНК, при этом указанный бицистронный экспрессионный вектор дополнительно содержит сайт проскальзывания рибосомы или последовательность, кодирующую сайт цис-гидролазы.

3. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, в которых первый полинуклеотид кодирует полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 4, и второй полинуклеотид кодирует ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.

4. Иммуногенная композиция по п.3, в которой первый полинуклеотид кодирует полимеразный антиген HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, в которой по меньшей мере одна из первой не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты и второй не встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность, функционально связанную по меньшей мере с одним из полимеразного антигена HBV и укороченного ядерного антигена HBV.

6. Иммуногенная композиция по п.5, в которой сигнальная пептидная последовательность независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19.

7. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, в которой первая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

8. Иммуногенная композиция по п.7, в которой первая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

9. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, в которой вторая полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

10. Иммуногенная композиция по п.9, в которой вторая полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

11. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, в которой первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одном и том же векторе.

12. Иммуногенная композиция по п.11, в которой вектор кодирует слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

13. Иммуногенная композиция по п.12, в которой слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

14. Иммуногенная композиция по п.12 или п.13, в которой вектор содержит, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, вторую полинуклеотидную последовательность, последовательность, кодирующую линкер, первую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

15. Иммуногенная композиция по п.14, в которой вектор представляет собой аденовирусный вектор.

16. Иммуногенная композиция по п.15, в которой аденовирусный вектор содержит промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, последовательность, кодирующую линкер, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-10, в которой первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в двух разных векторах.

18. Иммуногенная композиция по п.17, в которой первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует в первом ДНК-плазмидном векторе, и вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует во втором ДНК-плазмидном векторе.

19. Иммуногенная композиция по п.18, в которой каждый из первого и второго ДНК-плазмидных векторов содержит точку начала репликации, ген резистентности к антибиотику и, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, промоторную последовательность, регуляторную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность или вторую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования.

20. Иммуногенная композиция по п.19, в которой ген резистентности к антибиотику представляет собой ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12.

21. Иммуногенная композиция по п.20, содержащая:

(а) первый ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

(б) второй ДНК-плазмидный вектор, содержащий, в направлении от 3'-конца к 5'-концу, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

(с) фармацевтически приемлемый носитель,

причем каждый из первого ДНК-плазмидного вектора и второго ДНК-плазмидного вектора дополнительно содержит ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, и точку начала репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и

причем первый ДНК-плазмидный вектор и второй ДНК-плазмидный вектор присутствуют в одной и той же композиции или в двух разных композициях.

22. Набор для индукции иммунного ответа против HBV, содержащий иммуногенно эффективное количество иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов.

23. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.1-21 для индукции иммунного ответа на вирус гепатита В у нуждающегося в этом субъекта.

24. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.1-21 для лечения заболевания, индуцированного вирусом гепатита В (HBV), у нуждающегося в этом субъекта.

25. Применение по п.23 или 24, где субъект имеет хроническую инфекцию HBV.

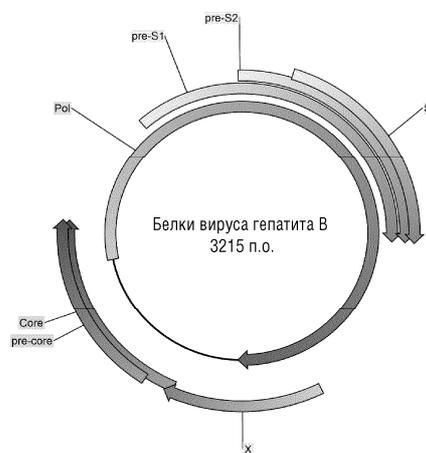
26. Не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полимеразный антиген вируса гепатита В (HBV), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, причем полимеразный антиген HBV не обладает активностью обратной транскриптазы и активностью РНКазы H, причем полимеразный антиген HBV способен индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против по меньшей мере генотипов А, В, С и D HBV.

27. Не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты по п.26, кодирующая слитый белок, содержащий укороченный ядерный антиген HBV, функционально связанный с полимеразным антигеном HBV.

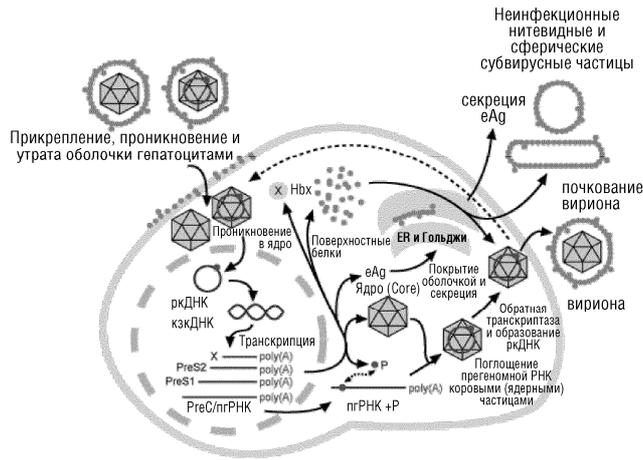
28. Не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты по п.26 или 27, в которой:

а) полимеразный антиген HBV способен индуцировать у человека CD8 Т-клеточный ответ против по меньшей мере генотипов HBV А, В, С и D; и/или

б) не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты, дополнительно содержащая вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую укороченный ядерный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14.



Фиг. 1А



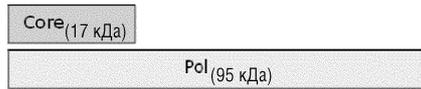
Фиг. 1В



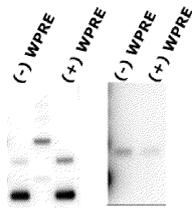
Фиг. 2А



Фиг. 2В

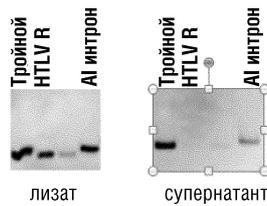


Фиг. 2С



лизат супернатант

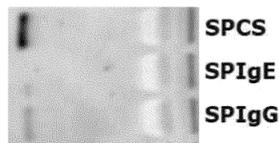
Фиг. 2D



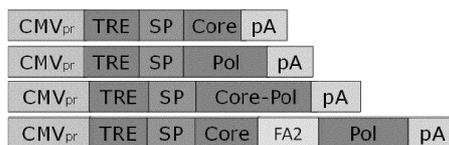
лизат

супернатант

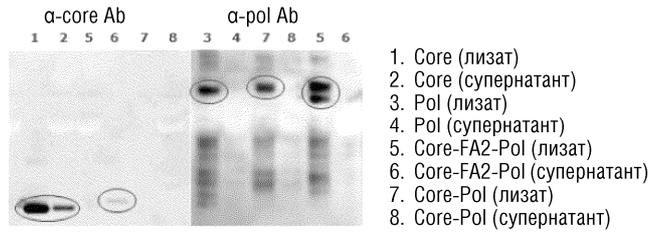
Фиг. 2E



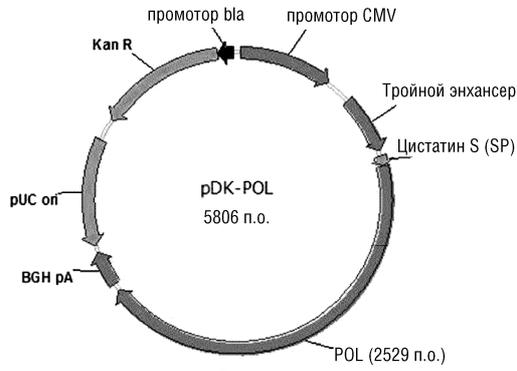
Фиг. 2F



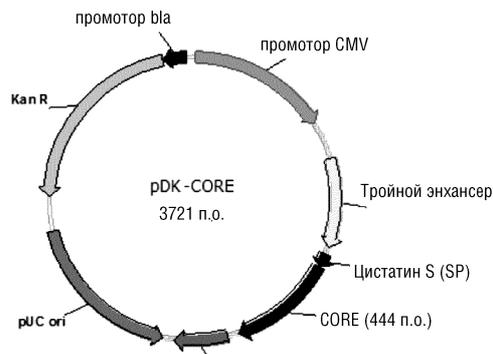
Фиг. 2G



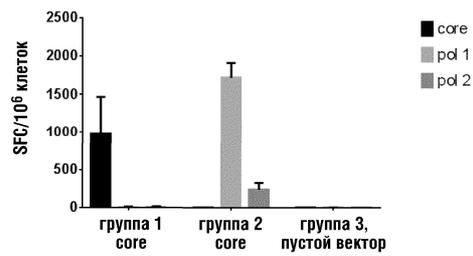
Фиг. 2Н



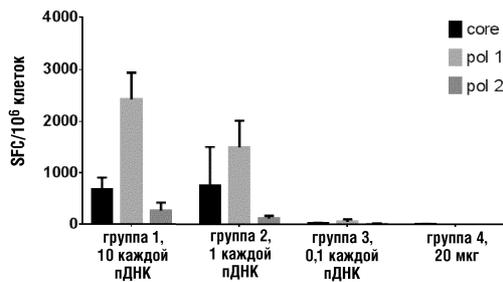
Фиг. 3А



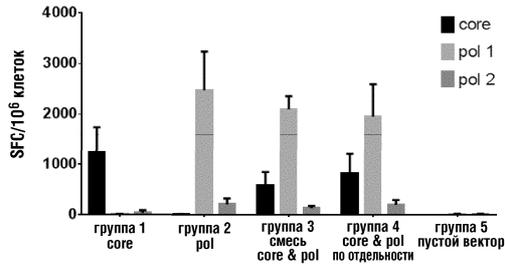
Фиг. 3В



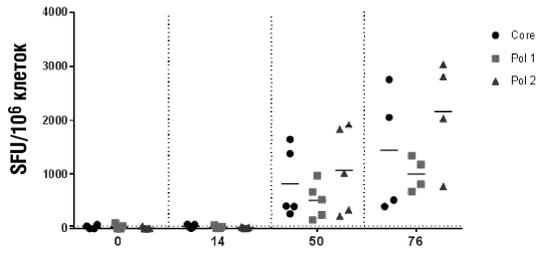
Фиг. 4



Фиг. 5

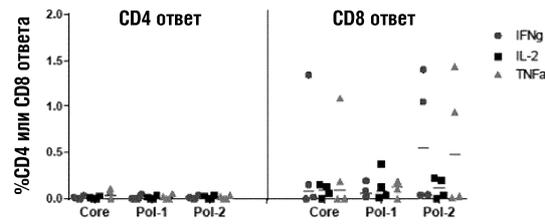


Фиг. 6



Фиг. 7А

День



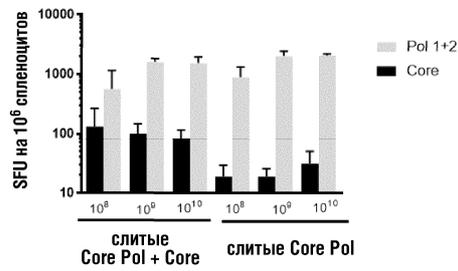
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9

