

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390138** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.04.14**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2021.06.29**

---

**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ  
ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

---

(31) **62/705,463; 20187409.6**

(32) **2020.06.29; 2020.07.23**

(33) **US; EP**

(86) **PCT/EP2021/067776**

(87) **WO 2022/002894 2022.01.06**

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

(72) Изобретатель:

**Каллендре Бенуа К.С. (NL), Де Папе  
Элс (BE), Комо Кристи Энн, Цан  
Роланд Кристиан, Хейнен Эстер  
Матильде Эжен Вилхелмус (NL)**

(74) Представитель:

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

---

(57) Описаны способы безопасной индукции защитного иммунного ответа против респираторно-синцициального вируса (RSV) и способы предотвращения инфицирования и/или репликации RSV у субъектов-людей. Способы включают введение субъектам (а) эффективного количества аденовирусного вектора, кодирующего рекомбинантный F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", и (b) эффективного количества F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

---

**A1**

**202390138**

**202390138**

**A1**

## КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

5

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к защитным и иммуногенным комбинациям (а) нуклеиновой кислоты, кодирующей белковый антиген респираторно-синцициального вируса (RSV), и (b) белкового антигена RSV, и их применению для профилактического лечения RSV-инфекции.

### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Респираторно-синцициальный вирус (RSV) считается наиболее важной причиной серьезных острых респираторных заболеваний у младенцев и детей в возрасте до 5 лет. Ежегодно RSV обуславливает около 3,4 миллиона случаев госпитализации по всему миру. Каждый год в Соединенных Штатах Америки RSV-инфекция является причиной случаев госпитализации в количестве от 57000 до 175000, обращений в количестве 500000 в отделение неотложной помощи и приблизительно 500 смертельных исходов у детей в возрасте до 5 лет. В США 60% младенцев инфицируются при первом контакте с RSV, и практически все дети заражаются вирусом к 2–3 годам. Иммуитет к RSV является временным, и повторное инфицирование происходит на протяжении всей жизни (Hall et al., *J Infect Dis.* 1991;163:693-698). У детей в возрасте до 1 года RSV представляет собой наиболее важную причину развития бронхиолита, и уровень госпитализации при RSV-инфекции наиболее высок среди детей в возрасте до 6 месяцев (Центры контроля и профилактики заболеваний (CDC); респираторно-синцициальная вирусная инфекция (RSV) – заражение и частота случаев. Почти все связанные с RSV смертельные исходы (99%) у детей в возрасте до 5 лет наблюдаются в развивающихся странах (Nair et al., *Lancet.* 2010;375:1545-1555). Тем не менее, в развитых странах нагрузка, обусловленная заболеванием, вследствие RSV, является значительной, при этом RSV-инфекция, перенесенная в детстве, связана с развитием бронхолегочной обструкции, гиперреактивности дыхательных путей и астмы.

Наряду с поражением детей, RSV является важной причиной развития респираторных инфекций у пожилых людей, лиц с ослабленным иммунитетом и у лиц,

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

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

Несмотря на высокую нагрузку, обусловленную заболеванием, и активный интерес к разработке вакцины против RSV, разрешенная для применения вакцина против RSV отсутствует. В конце 1960-х годов была начата серия исследований по оценке инактивированной формалином вакцины против RSV (FI-RSV), содержащей квасцы в качестве адъюванта, и результаты данных исследований оказали большое влияние на область науки, изучающей вакцину против RSV. Четыре исследования проводили параллельно с участием детей из разных возрастных групп, где вакцину FI-RSV доставляли посредством внутримышечной инъекции (Chin et al., *Am J Epidemiol.* 1969;89;449-463; Fulginiti et al., *Am J Epidemiol.* 1969;89;435-448; Kapikian et al., *Am J Epidemiol.* 1969;89;405-421; Kim et al., *Am J Epidemiol.* 1969;89;422-434). Восемьдесят процентов реципиентов FI-RSV, инфицированных RSV, потребовалась госпитализация, и двое детей умерли в течение следующего зимнего периода (Chin et al., *Am J*

*Epidemiol.* 1969;89;449-463). Только 5% детей из контрольной группы, инфицированной RSV, потребовалась госпитализация. Механизмы развития наблюдаемого усиленного респираторного заболевания (ERD) среди реципиентов FI-RSV при повторном инфицировании были исследованы и, как полагают, являются результатом

5 аберрантного иммунного ответа в контексте бронхов малого диаметра, присутствующих в данной возрастной группе. Данные, полученные в результате анализа образцов, полученных от пациентов, и животных моделей, позволяют предположить, что вызванное FI-RSV ERD характеризуется низкими титрами нейтрализующих антител, наличием антител, отличных от нейтрализующих,

10 характеризующихся низкой авидностью, способствующих отложению иммунных комплексов в дыхательных путях, снижением примирования цитотоксических CD8+ T-клеток, имеющего доказанную важность для элиминации вируса, и усилением перекоса ответов в сторону CD4+ T-хелперов 2 типа (Th2) с признаками эозинофилии (Beeler et al., *Microb Pathog.* 2013;55;9-15; Connors et al., *J Virol.* 1992;66;7444-7451; De Swart et al., *J Virol.* 2002;76;11561-11569; Graham et al., *J Immunol.* 1993;151;2032-2040; Kim et al., *Pediatr Res.* 1976;10;75-78; Murphy et al., *J Clin Microbiol.* 1986;24;197-202; Murphy et al., *J Clin Microbiol.* 1988;26;1595-1597; Polack et al., *J Exp Med.* 2002;196;859-865).

Считается, что химическое взаимодействие формалина и белковых антигенов RSV может представлять собой один из механизмов, посредством которого вакцина FI-RSV

20 способствовала развитию ERD при последующей RSV-инфекции (Moghaddam et al., *Nat Med.* 2006;12;905-907). По данным причинам формалин больше не применяют в разработке вакцины против RSV.

Наряду с вакциной FI-RSV, несколько живых аттенуированных и субъединичных вакцин против RSV исследовали на животных моделях и в ходе

25 исследований с участием людей, но многие из них были запрещены по причине отсутствия возможности достичь надлежащего баланса безопасности и иммуногенности/эффективности. Разработка живых аттенуированных вакцин особенно усложнялась из-за трудностей, связанных с чрезмерной и недостаточной аттенуацией у младенцев (Belshe et al., *J Infect Dis.* 2004;190;2096-2103; Karron et al., *J Infect Dis.* 2005;191;1093-1104; Luongo et al., *Vaccine.* 2009;27;5667-5676). Что касается

30 субъединичных вакцин, белок слияния (F) и белок гликопротеина (G) RSV, оба из которых являются мембранными белками, представляют собой единственные белки RSV, которые индуцируют выработку нейтрализующих антител (Shay et al., *JAMA.* 1999;282;1440-1446). В отличие от G-белка RSV, F-белок является консервативным

среди штаммов RSV. Разнообразные вакцины на основе F-субъединицы RSV были разработаны на основе известной превосходной иммуногенности, обеспечения защитного иммунитета и высокой степени консервативности F-белка среди штаммов RSV (Graham, *Immunol Rev.* 2011:239;149-166). Доказательство концепции,

5 обеспеченное с помощью доступного в настоящее время способа профилактики с применением нейтрализующих моноклональных антител к F-белку, поддерживает идею о том, что вакцина, индуцирующая высокие уровни нейтрализующих антител длительного действия, может предупреждать развитие заболевания, вызванного RSV (Feltz et al., *Pediatr Res.* 2011:70;186-191; Groothuis et al., *J Infect Dis.* 1998:177;467-469; 10 Groothuis et al., *N Engl J Med.* 1993:329;1524-1530). В ходе нескольких исследований было сделано предположение, что снижение защиты против RSV у пожилых людей может быть обусловлено связанным с возрастом снижением выработки интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), снижением соотношения CD8 $^{+}$  и CD4 $^{+}$  Т-клеток и уменьшением количества циркулирующих 15 специфических в отношении RSV CD8 $^{+}$  Т-клеток памяти (De Bree et al., *J Infect Dis.* 2005:191;1710-1718; Lee et al., *Mech Ageing Dev.* 2005:126;1223-1229; Looney et al., *J Infect Dis.* 2002:185;682-685). Высокие уровни сывороточного нейтрализующего антитела связаны с развитием менее тяжелых инфекций у пожилых людей (Walsh и Falsey, *J Infect Dis.* 2004:190;373-378). Также было продемонстрировано, что после 20 RSV-инфекции у взрослых титры сывороточных антител быстро повышаются, но затем медленно возвращаются к уровням до инфекции через 16-20 месяцев (Falsey et al., *J Med Virol.* 2006:78;1493-1497). Принимая во внимание наблюдаемое ранее развитие ERD в ходе исследований вакцины FI-RSV в 1960-х годах, будущие вакцины должны способствовать развитию сильного антигенспецифического ответа с участием CD8 $^{+}$  Т-клеток и избегать развития перекоса ответа в сторону CD4 $^{+}$  Т-клеток типа Th2 25 (Graham, *Immunol Rev.* 2011:239;149-166).

F-белок RSV обеспечивает слияние мембран вируса и клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Структуры обеих конформаций были определены для F- 30 белка RSV (McLellan et al., *Science* 2013:342, 592-598; McLellan et al., *Nat Struct Mol Biol* 2010:17, 248-250; McLellan et al., *Science* 340, 2013:1113-1117; Swanson et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011:108, 9619-9624), а также для белков слияния из родственных парамиксовирусов, что обеспечивает понимание механизма данного сложного аппарата по осуществлению

слияния. Как и многие другие белки слияния класса I, F RSV подвергается протеолитическому процессингу во время созревания в секреторном пути инфицированных клеток. F RSV синтезируется в виде одноцепочечного неактивного предшественника (также называемого F0), который содержит три субъединицы: F1, F2 и гликопептид из 27 аминокислот, называемый рер27. Этот предшественник должен быть расщеплен фуриноподобной протеазой с высвобождением рер27 и образованием зрелого, способного к слиянию белка (фиг. 1, процессированный зрелый F RSV). С-концевая субъединица F1 содержит трансмембранный домен, два гептадных повтора и N-концевой слитый пептид. Остатки в субъединице F2 способствуют фузогенности F-белка и, возможно, видовой специфичности RSV. В зрелом процессированном белке субъединицы F1 и F2 ковалентно связаны двумя дисульфидными связями. Затем три протомера F1–F2 связываются посредством слабых межмолекулярных взаимодействий с образованием тримерного белка в конформации "до слияния" на поверхности вириона.

Большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови человека направлены против конформации до слияния, однако из-за ее нестабильности конформация до слияния характеризуется склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов. Описаны вакцины, содержащие F-белки RSV, стабилизированные в конформации "до слияния", а также векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белки RSV. Однако сообщение о безопасности или эффективности таких белков у людей отсутствует. В настоящее время все еще существует острая потребность в безопасной и эффективной вакцине против RSV.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящей заявке описаны композиции и способы с повышенной иммуногенной эффективностью. Более конкретно, в заявке описаны эффективные иммуногенные комбинации для одновременного введения, которые вызывают как мощные В-, так и Т-клеточные ответы, с повышением таким образом иммуногенности и, в конечном счете, обеспечением защиты от респираторно-синцитиальной вирусной (RSV) инфекции.

В одном общем аспекте в настоящей заявке описан способ индукции защитного иммунного ответа против респираторно-синцитиальной вирусной (RSV) инфекции у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту иммуногенной комбинации (а) эффективного количества первого иммуногенного

компонента, содержащего аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", причем предпочтительно эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц

5 аденовирусного вектора на дозу, и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего растворимый F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", причем предпочтительно эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг F-белка RSV на дозу.

10 В определенных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты вводят совместно.

В определенных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты составлены в различные композиции, которые смешивают перед совместным введением. Однако первый и второй иммуногенные компоненты также

15 могут быть совместно составлены в одну композицию.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления иммуногенные компоненты вводят внутримышечно, т. е. путем внутримышечной инъекции.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор является неспособным к репликации и характеризуется делецией в по меньшей мере одном из

20 аденовирусного раннего участка 1 (участок E1) и раннего участка 3 (участок E3) или делецией как в участке E1, так и в участке E3 аденовирусного генома.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad26, характеризующийся делецией участка E1 и участка E3.

В определенных вариантах осуществления первый иммуногенный компонент представляет собой или предусматривает неспособный к репликации аденовирус серотипа 26 (Ad26), содержащий трансген дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), который кодирует мембранносвязанный F-белок, стабилизированный в конформации pre-F, полученный из штамма A2 RSV, и второй иммуногенный компонент

30 представляет собой или предусматривает рекомбинантный, растворимый, F-белок, стабилизированный в конформации pre-F, полученный из штамма A2 RSV.

Согласно настоящему изобретению рекомбинантный F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, и растворимый F-белок RSV были стабилизированы в конформации "до слияния". Таким образом, F-белок RSV, кодируемый аденовирусным

вектором, и растворимый F-белок RSV содержат одну или несколько стабилизирующих мутаций по сравнению с F-белком RSV дикого типа, в частности F-белком RSV, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

Дополнительно или в качестве альтернативы, нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4.

F-белок RSV второго иммуногенного компонента содержит эктодомен рекомбинантного F-белка RSV, кодируемого аденовирусным вектором, с получением растворимого F-белка RSV. Таким образом, трансмембранный и цитоплазматический домены удаляли и необязательно заменяли гетерологичным доменом тримеризации, таким как, например, фолдоновый домен, связанный с С-концом домена F1 либо непосредственно, либо с помощью линкера. В определенных предпочтительных вариантах осуществления F-белок RSV второго иммуногенного компонента представляет собой растворимый белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Дополнительно или в качестве альтернативы, F-белок RSV второго иммуногенного компонента представляет собой растворимый белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 8.

В предпочтительном варианте осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет приблизительно 150 мкг F-белка RSV на дозу.

Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать введение субъекту (с) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, и (d) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу после первоначального введения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект-человек является восприимчивым к RSV-инфекции. В определенных вариантах осуществления



субъект-человек, восприимчивый к RSV-инфекции, включает без ограничения пожилого субъекта-человека, например субъекта-человека в возрасте  $\geq 50$  лет, предпочтительно в возрасте  $\geq 60$  лет,  $\geq 65$  лет; молодого субъекта-человека, например субъекта-человека в возрасте  $\leq 5$  лет,  $\leq 1$  года; и/или госпитализированного субъекта-человека или субъекта-человека, который получал лечение противовирусным соединением, однако у которого наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ. В определенных вариантах осуществления субъект-человек, восприимчивый к RSV-инфекциям, включает субъекта, имеющего риск, в том числе без ограничения субъекта-человека, имеющего хроническое сердечное заболевание, хроническое заболевание легких и/или иммунодефицит.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет по меньшей мере 60 лет.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет по меньшей мере 65 лет.

В определенных вариантах осуществления введение иммуногенной комбинации приводит к предупреждению опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR). В определенных вариантах осуществления введение иммуногенной комбинации приводит к снижению степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), по сравнению с субъектами, которым не вводили комбинированную вакцину.

Дополнительно или в качестве альтернативы, защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта при воздействии RSV.

Дополнительно или в качестве альтернативы, защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или уменьшением степени проявления клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта после воздействия RSV.

Дополнительно или в качестве альтернативы, защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления способ характеризуется приемлемым профилем безопасности.

Настоящая заявка, в частности, относится к способам безопасного предупреждения инфицирования и/или репликации RSV у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающим профилактическое введение внутримышечно субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации, и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг на дозу F-белка RSV, имеющего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и где (a) и (b) вводят совместно.

Настоящая заявка также относится к способам предупреждения или уменьшения степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающим профилактическое введение внутримышечно субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации, и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг на дозу F-белка RSV, имеющего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и где (a) и (b) вводят совместно.

В этих вариантах осуществления аденовирусный вектор может представлять собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad26, характеризующийся делецией участка E1 и участка E3.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет приблизительно 150 мкг F-белка RSV на дозу.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту (с) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, и (d) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг F-белка RSV на дозу после первоначального введения.

В настоящем изобретении, кроме того, представлена комбинация, такая как, например, набор, содержащий (a) первый иммуногенный компонент, содержащий аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, где эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, и (b) второй иммуногенный компонент, содержащий F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, где эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг F-белка RSV на дозу. Комбинацию можно применять для индуцирования защитного иммунного ответа против RSV-инфекции у субъекта-человека, нуждающегося в этом.

В другом общем аспекте в настоящей заявке описаны продукты, содержащие комбинацию (a) первого иммуногенного компонента, содержащего аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, и (b) второго иммуногенного компонента, содержащего F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, для одновременного, отдельного или последовательного применения для индукции защитного иммунного ответа против инфекции RSV у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем предпочтительно первый и вторые иммуногенные компоненты вводят совместно, более предпочтительно первый иммуногенный компонент вводят в эффективном количестве, составляющем от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, а второй иммуногенный компонент вводят в эффективном количестве, составляющем от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинация приводит к предупреждению или уменьшению степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR).

## 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Вышеизложенное краткое описание, а также следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами.

10 Следует понимать, однако, что настоящая заявка не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На фиг. 1 показано схематическое представление предшественника F0 F-белка RSV, процессированного зрелого F-белка RSV и preF-белка RSV. Показаны два домена (F1 и F2), трансмембранный домен (TM), фолдоновый домен (FD), сайты расщепления фурином, сайты N-гликана и межцепочечные дисульфидные связи белков. Также  
15 идентифицированы мутации из 5 аминокислот в preF-белке RSV.

На фиг. 2 показаны графики титров нейтрализующих антител к вирусу A2 RSV (VNT) на 28-й день и на 42-й день у интактных мышей после первой и второй иммунизации (0-й день и 28-й день, соответственно) pre-F-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF.

20 На фиг. 3 показаны титры антител, связывающих pre-F и post-F, после "прайм-буст" иммунизации pre-F-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у интактных мышей.

На фиг. 4 показаны клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT, после "прайм-буст" иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у интактных мышей.

25 На фиг. 5 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD4<sup>+</sup> Т-клеток после "прайм-буст" иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у интактных мышей.

На фиг. 6 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD8<sup>+</sup> Т-клеток после "прайм-буст" иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у интактных  
30 мышей.

На фиг. 7 показана нейтрализация вируса после "прайм-буст" иммунизации посредством Ad26.RSV.preF или комбинации Ad26.RSV.preF с preF-белком RSV у интактных мышей.

На фиг. 8 показаны титры антител, связывающих pre-F и post-F, после "прайм-буст" иммунизации посредством Ad26.RSV.preF или комбинации Ad26.RSV.preF с preF-белком RSV у интактных мышей.

5 На фиг. 9 показаны клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT, после "прайм-буст" иммунизации посредством Ad26.RSV.preF или комбинации Ad26.RSV.preF с preF-белком RSV у интактных мышей.

На фиг. 10 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD4<sup>+</sup> Т-клеток после "прайм-буст" иммунизации посредством Ad26.RSV.preF или комбинации Ad26.RSV.preF с preF-белком RSV у интактных мышей.

10 На фиг. 11 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD8<sup>+</sup> Т-клеток после "прайм-буст" иммунизации посредством Ad26.RSV.preF или комбинации Ad26.RSV.preF с preF-белком RSV у интактных мышей.

На фиг. 12 показана нейтрализация вируса после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV.

На фиг. 13 показаны титры антител, связывающих pre-F и post-F, после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV.

20 На фиг. 14 показаны клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT, после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV.

На фиг. 15 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV.

25 На фиг. 16 показана нейтрализация вируса после "прайм-буст" иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию.

На фиг. 17 показаны титры антител, связывающих pre-F и post-F, после "прайм-буст" иммунизации pre-F-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию.

На фиг. 18 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток после "прайм-буст" иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV.

На фиг. 19 показана нейтрализация вируса после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у предварительно подвергшихся воздействию приматов, отличных от человека (NHP).

5 На фиг. 20 показаны клеточные иммунные ответы после однократной иммунизации preF-белком RSV и/или Ad26.RSV.preF у предварительно подвергшихся воздействию NHP.

10 На фиг. 21 показаны результаты первичного анализа эффективности. Процент участников с опосредованным RSV LRTD, подтвержденным RT PCR, в соответствии с каждым из 3 определений случая и эффективности вакцины при их первом появлении; выборка пациентов, выполнивших требования протокола для оценки эффективности.

Определение случая 1:  $\geq 3$  симптомов LRTI + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.

Определение случая 2:  $\geq 2$  симптомов LRTI + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.

15 Определение случая 3:  $\geq 2$  симптомов LRTI или  $\geq 1$  симптома LRTI в сочетании с  $\geq 1$  системным симптомом + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.

20 Эффективность вакцины рассчитывали на основе точной регрессии Пуассона с частотой явлений, определяемой как число случаев за время наблюдения (смещение) в качестве зависимой переменной, а также группой вакцинации и возрастом, а также с повышенным риском тяжелого RSV ARI (обе как стратифицированные) как независимые переменные. Доверительный интервал корректировали для учета нескольких конечных точек. Включены все данные в отношении субъектов до 15 мая 2020 г.

25 На фиг. 22 показаны результаты анализов в отношении чувствительности первичного анализа – CD1 ( $\geq 3$  симптомов LRTI + подтверждение RSV с помощью RT-PCR).

30 На фиг. 23 показана AUC общего показателя респираторных и системных симптомов RiiQ, показателя Определения Случая и показателя влияния ежедневной активности, соответствующего RSV ARI, подтвержденным RT-PCR; выборка пациентов, выполнивших требования протокола.

На фиг. 24 показан способ Каплана-Мейера в отношении числа дней, которые потребовались участнику, чтобы вернуться к своему обычному состоянию здоровья; выборка пациентов, выполнивших требования протокола для оценки эффективности, только для участников с подтвержденной посредством RT-PCR RSV ARI.

На фиг. 25 показаны нейтрализующие антитела против A2 RSV (A), титры pre-F в соответствии с ELISA (B) и ответы pre-F в соответствии с ELISpot (C) с течением времени после однократной вакцинации при помощи Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV ( $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг) (зеленый) и плацебо (серый) (выбранные группы из исследования VAC18193RSV1004, когорта 2). ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ; ELISpot = иммуноферментный спот-анализ; HD = высокая доза ( $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг); IgG = иммуноглобулин G; IC50 = 50% ингибирующая концентрация; NAb = нейтрализующие антитела; SFU/ $10^6$  PBMC = пятнообразующие единицы на миллион моноклеарных клеток периферической крови; pre F = конформация "до слияния"; в. ч.=вирусные частицы.

На фиг. 26 показаны результаты ELISA pre-F с течением времени с ревакцинацией и без нее (исследование VAC18193RSV1004, когорта 3). Легенда схем вакцинации:

смесь/смесь: смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и в день 365; смесь/плацебо: смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и плацебо в день 365; CI = доверительный интервал; Nbas = количество участников на исходном уровне; Pbo=плацебо; pre-F ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ "до слияния"; pre-F IgG = иммуноглобулин G "до слияния"; в. ч. = вирусные частицы.

На фиг. 27 показаны результаты VNA A2 с течением времени с ревакцинацией и без нее (исследование VAC18193RSV1004, когорта 3). Легенда схем вакцинации:

смесь/смесь: смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и день 365; смесь/плацебо: смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и плацебо в день 365; CI = доверительный интервал; IC50 = 50% ингибирующая концентрация; Nbas = количество участников на исходном уровне; Pbo = плацебо; VNA A2 = анализ нейтрализации вируса для A2 RSV; в. ч. = вирусные частицы.

На фиг. 28 показаны результаты ELISpot с течением времени с ревакцинацией и без нее (исследование VAC18193RSV1004, когорта 3). Только для участников с данными за 393 день. Легенда схем вакцинации: смесь/смесь: смесь

Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и день 365; смесь/плацебо: смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг в день 1 и плацебо в день 365; ELISpot = иммуноферментный спот-анализ; IFN = интерферон; Nbas = количество участников на исходном уровне; Q = квартиль; SFU/ $10^6$  PBMC = пятнообразующие

единицы на миллион моноклеарных клеток периферической крови; в. Ч. = вирусные частицы.

На фиг. 29 показаны результаты ELISA Pre-F с течением времени с ревакцинацией и без нее (исследование VAC18193RSV2001, когорты ревакцинации А).

5 На фиг. 30 показаны результаты VNA\_A2 с течением времени с ревакцинацией и без нее (исследование VAC18193RSV2001, когорты ревакцинации А).

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

15 существующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

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

20 случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании.

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

25 Если не указано иное, то любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно предусматривает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл предусматривает все значения в диапазоне от 0,9 мг/мл до

30 1,1 мг/мл. Таким же образом диапазон концентраций от 1% до 10% (вес/об.) предусматривает диапазон от 0,9% (вес/об.) до 11% (вес/об.). Как используется в данном документе, применение числового диапазона однозначно предусматривает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого



диапазона, в том числе целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

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

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

10 В данном контексте подразумевается, что термины "предусматривает", "предусматривающий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит", "содержащий" или любые другие их вариации означают, что они охватывают указанное целое число или группу целых чисел, но не исключают любые другие целые числа или группу целых чисел, и при этом подразумевается, что они являются неисключающими

15 или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, содержащие перечень элементов, не обязательно ограничиваются только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса, способа, изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, то "или" относится к

20 включающему или, а не исключающему или. Например, условию А или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или в наличии) и как А, так и В истинны (или в наличии).

25 Термины "приблизительно", "примерно", "как правило", "по сути" и подобные им, используемые в настоящем документе в отношении размера или свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как указывающие на то, что описываемый размер/свойство не представляет собой строго установленное ограничение или параметр и не исключает небольшие отклонения от него, которые функционально являются идентичными или сходными, как это будет понятно

30 специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовые параметры, будут включать вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в области техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при производстве и т. п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

Хотя респираторно-синцитиальный вирус (RSV) поражает людей на протяжении всей жизни, у большинства людей не вырабатывается длительный защитный иммунный ответ. Кроме того, у пожилых людей ослабевающий иммунный ответ способствует повышенной восприимчивости к тяжелому заболеванию после инфицирования RSV, вызывая значительную заболеваемость и смертность. В литературе существуют указания на то, что как нейтрализующее антитело, так и опосредованная Т-клетками защита играют роль в предупреждении RSV-инфекции. Поэтому считается, что эффективная вакцина против RSV, в частности эффективная вакцина для пожилых людей, должна вызывать как мощные уровни нейтрализующих антител, так и индуцировать устойчивый Т-клеточный ответ.

Недавно были описаны стабилизированные F-белки RSV в конформации "до слияния" с уникальным набором аминокислотных мутаций по сравнению с F-белком RSV дикого типа из штамма A2 RSV (Genbank ACO83301.1) (см., например, WO2014/174018, WO2017/174564 и WO2017/174568, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Демонстрируя специфическое связывание со специфическими антителами "до слияния" *in vitro*, было показано, что антиген, представляющий собой F-белок RSV, существует в конформации "до слияния" и что конформация "до слияния" была стабильной. Из доклинических данных видно, что введение F-белков RSV в конформации "до слияния" индуцировало выработку нейтрализующих вирус антител как у мышей, так и у хлопковых хомяков. preF-Белок RSV без адъюванта вызывает очень низкий Т-клеточный ответ у мышей. У хлопковых хомяков "прайм-буст" иммунизация индуцировала защиту после интраназального заражения штаммом A2 RSV через 3 недели после бустерной иммунизации. У хлопковых хомяков, иммунизированных F-белками RSV в конформации "до слияния", проявлялся более низкий титр вируса в легких и носу через 5 дней после заражения по сравнению с хлопковыми хомяками, иммунизированными F-белком RSV в конформации "после слияния" ((Kragup et al. *Nat Comm* 6, номер статьи: 8143, 2015).

Кроме того, человеческие рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие ДНК, кодирующую F-белок RSV, в конформации "после слияния" индуцируют выработку нейтрализующих вирус антител и Т-клеточные ответы у мышей после однократной иммунизации. Примирующая иммунизация или гетерологичная "прайм-буст" иммунизация аденовирусным вектором серотипов 26 и 35, кодирующим F-белок RSV в конформации "после слияния", индуцировала защиту от

интраназального заражения A2 RSV или B15/97 у хлопковых хомяков (Widjoatmodjo et al., *Vaccine* 33(41):5406-5414, 2015). Человеческие рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие ДНК, кодирующую F-белки RSV в конформации "до слияния", описаны в WO2014/174018 и WO2017/174564, содержание каждой из которых

5 полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, было продемонстрировано, что Ad26.RSV.preF имеет приемлемый профиль безопасности и вызывает устойчивые гуморальные и клеточные иммунные ответы после однократной иммунизации у пожилых людей (Williams et al., *J Infect Dis* 2020 Apr 22; doi: 10.1093/infdis/jiaa193).

10 В настоящей заявке описаны композиции и способы с повышенной иммуногенной эффективностью. Более конкретно, в заявке описаны эффективные иммуногенные комбинации для одновременного введения, которые вызывают как мощные В-, так и Т-клеточные ответы, с повышением таким образом иммуногенности и, в конечном счете, обеспечением защиты от респираторно-синцитиальной вирусной

15 (RSV) инфекции.

Таким образом, в настоящей заявке представлены способы индукции защитного иммунного ответа против респираторно-синцитиальной вирусной (RSV) инфекции у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту (a) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего

20 аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

Иммуногенные компоненты предпочтительно вводят одновременно, и

25 иммуногенная комбинация вызывает мощные как В-, так и Т-клеточные ответы, с повышением таким образом иммуногенности, безопасности и, в конечном счете, защиты от RSV.

В определенных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты составлены в различные композиции, которые смешивают перед

30 совместным введением. Однако первый и второй иммуногенные компоненты также могут быть совместно составлены в одну композицию.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления иммуногенные компоненты вводят внутримышечно, т. е. путем внутримышечной инъекции.

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

Согласно настоящему изобретению рекомбинантный F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, и растворимый F-белок RSV были стабилизированы в конформации "до слияния". В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-белки RSV, стабилизированные в конформации "до слияния", происходят из штамма А RSV. В определенных вариантах осуществления F-белки RSV получены из штамма А2 RSV (Genbank ACO83301.1), причем F-белки RSV, которые были стабилизированы в конформации "до слияния" и которые могут быть применимы в соответствии с данной заявкой, представляют собой F-белки RSV, имеющие по меньшей мере одну мутацию, по сравнению с F-белком RSV дикого типа, в частности по сравнению с F-белком RSV, имеющим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления F-белки RSV, которые стабилизированы в конформации "до слияния", которые являются применимыми по настоящему изобретению, содержат по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из K66E, N67I, I76V, S215P и D486N. В предпочтительном варианте осуществления F-белки RSV, которые стабилизированы в конформации "до слияния" по настоящему изобретению, содержат мутации K66E, N67I, I76V, S215P и D486N. Следует понимать, что для нумерации положений аминокислот сделана ссылка на SEQ ID NO: 1.

F-белки RSV, которые стабилизированы в конформации "до слияния", содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфичным к конформации "до слияния", например CR9501. CR9501 содержит связывающие участки антител, упоминаемые как 58C5 в WO2011/020079 и WO2012/006596, которые специфически связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния.

В предпочтительном варианте осуществления F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

Дополнительно или в качестве альтернативы, нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4. Специалисту в данной области понятно, что многочисленные различные молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же белок в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут, используя стандартные методики, производить замены нуклеотидов, которые не влияют на последовательность белка, кодируемого описанными в настоящем документе полинуклеотидами, чтобы отразить использование кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором должны экспрессироваться белки. Следовательно, если не указано иное, то выражение "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать интроны. В настоящем документе последовательности приведены в направлении от 5' к 3', как принято в уровне техники.

Аденовирус (или аденовирусный вектор) согласно настоящему изобретению принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно относится к роду Mastadenovirus. Это может быть аденовирус человека, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, в том числе без ограничения аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус 3 крупного рогатого скота, BAdV3), собачий аденовирус (например, CAdV2), свиной аденовирус (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус мартышек и аденовирус человекообразных обезьян, как, например, аденовирус шимпанзе или аденовирус горилл). Аденовирус предпочтительно представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu) или аденовирус обезьян, как, например, аденовирус шимпанзе или горилл (ChAd, AdCh или SAdV), или аденовирус макаки-резус (RhAd). В настоящем изобретении подразумевают аденовирус человека, если он упоминается как Ad без указания вида, т. е. краткое обозначение "Ad26" означает то же, что и HAdV26, который представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Также используемое в настоящем документе

обозначение "rAd" означает рекомбинантный аденовирус, например "rAd26" относится к рекомбинантному аденовирусу человека серотипа 26.

Исследования наиболее высокого уровня были проведены с использованием аденовирусов человека, при этом аденовирусы человека являются предпочтительными в соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению лежит аденовирус человека. В предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус человека серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т. д. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Преимущества этих серотипов включают низкую серопревалентность и/или низкие титры предсуществующих нейтрализующих антител в человеческой популяции, а также опыт применения на субъектах-людях в клинических испытаниях.

Обычно аденовирусы обезьян также характеризуются низкой серопревалентностью и/или низкими титрами предсуществующих нейтрализующих антител в популяции человека, при этом было опубликовано значительное количество работ по использованию векторов на основе аденовируса шимпанзе (например, US6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina et al, 2001, J Virol 75: 11603-13; Cohen et al, 2002, J Gen Virol 83: 151-55; Kobinger et al, 2006, Virology 346: 394-401; Tatsis et al., 2007, Molecular Therapy 15: 608-17; также см. обзор Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62; и обзорную публикацию Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39). Следовательно, в других вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению лежит аденовирус обезьян, например аденовирус шимпанзе. В определенных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус обезьян типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P. В определенных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус шимпанзе, как, например ChAdOx 1 (см., например, WO 2012/172277) или ChAdOx 2 (см., например, WO 2018/215766). В определенных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус шимпанзе, как, например BZ28 (см., например, WO 2019/086466). В определенных вариантах осуществления в основе

рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус гориллы, как, например BLY6 (см., например, WO 2019/086456) или BZ1 (см., например, WO 2019/086466).

Предпочтительно, аденовирусный вектор представляет собой дефектный в отношении репликации рекомбинантный вирусный вектор, такой как rAd26, rAd35, rAd48, rAd5HVR48 и т. д.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аденовирусные векторы содержат капсидные белки из редких серотипов, например в том числе Ad26. В типичном варианте осуществления вектор представляет собой вирус rAd26. "Капсидный белок аденовируса" относится к белку в капсиде аденовируса (например, векторы на основе Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), который участвует в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Капсидные белки аденовирусов, как правило, включают белки фибер, пентон и/или гексон. Как используется в данном документе, "капсидный белок" конкретного аденовируса, как, например, "капсидный белок Ad26", может представлять собой, например, химерный капсидный белок, который содержит по меньшей мере часть капсидного белка Ad26. В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой целый капсидный белок из Ad26. В определенных вариантах осуществления гексон, пентон и фибер относятся к Ad26.

Специалисту средней квалификации в данной области будет понятно, что элементы, полученные из нескольких серотипов, можно объединять в одном рекомбинантном аденовирусном векторе. Таким образом можно получить химерный аденовирус, в котором сочетаются требуемые свойства различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в химерном аденовирусе по настоящему изобретению может сочетаться отсутствие предсуществующего иммунитета от первого серотипа с такими характеристиками, как, например, термостабильность, сборка, зякоривание, выход при получении, перенаправленная или улучшенная инфекционность, стабильность ДНК в клетке-мишени и т. п. См., например, WO 2006/040330 в отношении химерного аденовируса Ad5HVR48, который включает остов Ad5 с частичными капсидами от Ad48, а также, например, WO 2019/086461 в отношении химерных аденовирусов Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, которые включают остов вируса Ad26, имеющий частичные капсидные белки Ptr1, Ptr12 и Ptr13, соответственно)

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор, применимый в настоящем изобретении, получен главным образом или

полностью из Ad26 (т. е. вектор представляет собой гAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус является дефектным в отношении репликации, например, ввиду того, что он предусматривает делецию в участке E1 генома. Для аденовирусов, получаемых из аденовируса, не принадлежащего к группе C, такого как Ad26 или Ad35, обычной практикой является замена кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса посредством E4-orf6 аденовируса характерной для человеческой подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т. п. (см., например, Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467). Однако такие аденовирусы не смогут реплицироваться в недополняющих клетках, которые не экспрессируют гены E1 из Ad5.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Получение векторов на основе гAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63. Примеры последовательностей генома Ad26 находятся в GenBank под номером доступа EF153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Примеры векторов, применимых в настоящем изобретении, включают, например, векторы, описанные в WO2012/082918, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как правило, вектор, применимый в настоящем изобретении, получают с применением нуклеиновой кислоты, содержащей целый геном рекомбинантного аденовируса (например, плазмиды, космиды или бакуловирусного вектора). Таким образом, в настоящем изобретении также представлены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК, полученных путем клонирования или изготовленных синтетическим путем. ДНК может быть двухнитевой или однонитевой.

Аденовирусные векторы, применимые в настоящем изобретении, как правило, являются дефектными в отношении репликации. В этих вариантах осуществления вирус делают дефектным в отношении репликации путем делеции или инактивации участков, критически важных для репликации вируса, таких как участок E1. Участки могут быть по сути подвергнуты делеции или инактивированы, например, путем вставки гена, представляющего интерес, такого как ген, кодирующий F-белок RSV (как



правило связанный с промотором), внутри участка. В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению могут предусматривать делеции в других участках, таких как участки E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, соединенных с промотором, в одной или нескольких из этих областей. В случае

5 аденовирусов с мутацией в E2 и/или E4 с получением рекомбинантных аденовирусов обычно применяют линии клеток, дополняющие E2 и/или E4. Мутации в участке E3 аденовируса не обязательно должны дополняться линией клеток, поскольку E3 не требуется для репликации.

Пакующую линию клеток, как правило, применяют для получения достаточных

10 количеств аденовирусных векторов для применения в настоящем изобретении.

Пакующая клетка представляет собой клетку, которая содержит те гены, которые были подвергнуты делеции или инактивации в дефектном в отношении репликации векторе, что тем самым позволяет вирусу реплицироваться в клетке. Подходящие пакующие

линии клеток для аденовирусов с делецией в участке E1 включают, например, PER.C6,

15 911, 293 и A549-E1.

В соответствии с настоящим изобретением вектор представляет собой аденовирусный вектор и более предпочтительно вектор на основе rAd26, наиболее предпочтительно вектор на основе rAd26 с по меньшей мере делецией в участке E1 аденовирусного генома, например такой как описанный в Abbink, J Virol, 2007. 81(9): p.

20 4654-63, которая включена в данный документ посредством ссылки. Как правило, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок RSV, клонируют в участки E1 и/или E3 аденовирусного генома.

F-белок RSV второго иммуногенного компонента, как правило, содержит эктодомен рекомбинантного F-белка RSV, кодируемого аденовирусным вектором, с

25 целью получения растворимого F-белка RSV. Гликопротеин слияния (F) RSV обычно синтезируют в виде предшественника F0, который содержит сигнальный пептид, домены F2 и F1 F-белка и пептид p27. F0 процессируется фурином или родственными клеточными протеазами хозяина в домены F2 и F1, причем сигнальный пептид и p27 удаляются. Домен F1 содержит трансмембранный (TM) и цитоплазматический (CP)

30 домены. Домены F2 и F1 соединены дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F2-F1 организованы на вирионах в виде тримерных шипов (фигура 1). После процессинга процессированный зрелый F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, содержит домен F2 и домены F1 под SEQ ID NO: 4, которые связаны одним или

несколькими дисульфидными мостиками. Белок больше не будет описывать сигнальный пептид и пептид p27.

preF-Белок RSV второго иммуногенного компонента представляет собой растворимую рекомбинантную конструкцию F RSV, разработанную так, чтобы быть стабильной в конформации "до слияния". В preF-белке RSV отсутствуют трансмембранный и цитоплазматический домены. Домен тримеризации фибритина бактериофага T4 "фолдон" (Fd) добавляли на С-конце с повышением стабильности тримерного белка. Таким образом, трансмембранный и цитоплазматический домены удаляли и необязательно заменяли гетерологичным доменом тримеризации, таким как, например, фолдоновый домен, связанный с С-концом домена F1 либо непосредственно, либо с помощью линкера.

В определенных вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 2 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV либо непосредственно, либо посредством линкера. В определенных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SAIG (SEQ ID NO: 3).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления F-белок RSV второго иммуногенного компонента представляет собой растворимый белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 7.

Дополнительно или в качестве альтернативы, F-белок RSV второго иммуногенного компонента представляет собой растворимый белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления первый иммуногенный компонент представляет собой или содержит неспособный к репликации аденовирус серотипа 26 (Ad26), содержащий трансген дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), который кодирует мембранносвязанный F-белок, стабилизированный в конформации pre-F, полученный из штамма A2 RSV, предпочтительно pre-F-белок под SEQ ID NO: 5, и второй иммуногенный компонент представляет собой или содержит рекомбинантный, растворимый, F-белок, стабилизированный в конформации pre-F, полученный из штамма A2 RSV, предпочтительно pre-F-белок под SEQ ID NO: 6 или 7.

Описанные в данном документе иммуногенные компоненты могут быть составлены в виде вакцин. Используемый в данном документе термин "вакцина" относится к композиции, содержащей активный компонент, который является

эффективным в отношении индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета против определенного патогена или заболевания, что приведет по меньшей мере к снижению, и вплоть до полного отсутствия, тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, связанных с инфекцией, вызванной патогеном, или заболеванием. Вакцины могут индуцировать иммунный ответ против RSV, предпочтительно как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против F-белка из RSV. В соответствии с вариантами осуществления вакцину(ы) можно применять для предупреждения серьезного заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижения частоты возникновения осложнений, таких как пневмония, бронхит и бронхиолит вследствие инфицирования и репликации RSV у субъекта. В определенных вариантах осуществления вакцина(ы) может быть комбинированной вакциной(ами), которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют защитный иммунный ответ, например против других белков RSV и/или против других возбудителей инфекции, таких как, например, грипп. Введение дополнительных активных компонентов можно осуществлять, например, путем отдельного введения или путем введения комбинированных продуктов вакцин в соответствии с настоящей заявкой и дополнительных активных компонентов.

В данном контексте термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект способен контролировать инфицирование патогенным возбудителем, в отношении которого была проведена вакцинация. Как правило у субъекта, у которого развился "защитный иммунный ответ", развиваются только клинические симптомы от легкой до умеренной степени или вообще отсутствуют симптомы, что свидетельствует о предупреждении или уменьшении возникновения опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR). Предпочтительно, формирование "защитного иммунитета" или "защитного иммунного ответа" оценивают по предупреждению возникновения опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного при помощи PCR. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" в отношении определенного возбудителя или "защитный иммунитет" к нему, не погибает в результате инфицирования данным возбудителем.

Используемый в данном документе термин "индуцировать" и его варианты относятся к любому измеряемому повышению клеточной активности. Индуцирование защитного иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию

или созревание популяции иммунных клеток, увеличение выработки цитокина и/или другой индикатор усиления иммунной функции. В определенных вариантах осуществления индуцирование иммунного ответа может включать усиление пролиферации В-клеток, продуцирующих антигенспецифические антитела, усиление пролиферации антигенспецифических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или увеличение уровня экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

Способность индуцировать защитный иммунный ответ против F-белка RSV можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием ряда анализов, которые являются стандартными в уровне техники. Общее описание имеющихся методик для оценки начала проявления и активации иммунного ответа, см., например, в Coligan et al. (1992 и 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета можно выполнять способами, хорошо известными из уровня техники, например, путем измерения профилей цитокина, секретируемого активированными эффекторными клетками, в том числе клетками, происходящими из CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (например, путем количественного определения клеток, продуцирующих IL-4 или IFN гамма, с помощью ELISPOT), путем измерения пролиферации PBMC, путем измерения активности NK-клеток, путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, с помощью анализов пролиферации Т-клеток на основе классического поглощения [3H]-тимидина), путем анализа в отношении наличия антигенспецифических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного субъекта (например, определение пептидспецифического лизиса в анализе цитотоксичности и т. д.). Кроме того, уровень клеток, секретирующих антитела IgG и IgA, с маркерами хоминга для локальных участков, которые могут указывать на миграцию в ткани кишечника, легкого и носа, может быть измерен в крови в разные моменты времени после иммунизации как показатель местного иммунитета, и уровень антител IgG и IgA может быть измерен в выделениях из носа; можно охарактеризовать функцию Fc антител и измерение уровня взаимодействия антител с клетками, такими как PMN, макрофаги и NK-клетки, или с системой комплемента; анализ результата секвенирования РНК одиночной клетки может быть применен для анализа репертуаров В-клеток и Т-клеток.

Способность индуцировать защитный иммунный ответ против F-белка RSV может быть определена путем тестирования биологического образца (например, назального смыва, крови, плазмы крови, сыворотки крови, PBMC, мочи, слюны,

фекалий, спинномозговой жидкости, жидкости, полученной при проведении бронхоальвеолярного лаважа, или лимфы) от субъекта в отношении наличия антител, например антител IgG или IgM, направленных на F-белок(белки) RSV, вводимых в композиции, например нейтрализующего вирус антитела к A2 RSV (VNA A2), VNA Memphis 37b A RSV, B RSV, антител к pre-F, антител к post-F (см., например, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, могут быть измерены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), других анализов на основе ELISA (например, MSD-Meso Scale Discovery), дот-блоттинга, гелей для SDS-PAGE, ELISPOT, измерения уровня взаимодействия Fc с компонентом, PMN, макрофагами и NK-клетками, при усилении посредством компонента и без него, или анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). Иллюстративные способы описаны в примере 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления индуцированный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых через 8-35 дней после введения иммуногенных компонентов, например 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней после введения иммуногенных компонентов. Более предпочтительно, нейтрализующие антитела к RSV выявляют через период, составляющий от приблизительно 6 месяцев до 5 лет, после введения иммуногенных компонентов, как, например, через 6 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или 5 лет после введения иммуногенных компонентов.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления защитный иммунный ответ характеризуется предупреждением опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR). В определенных вариантах осуществления введение иммуногенной комбинации приводит к снижению степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), по сравнению с субъектами, которым не вводили комбинированную вакцину.

Иллюстративные способы описаны в примерах.

Дополнительно или в качестве альтернативы, защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или уменьшением степени проявления клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта после воздействия RSV. Клинические симптомы RSV включают, например, заложенность носа, боль в горле, головную боль; кашель, одышку, бронхо-легочную обструкцию, кашель с мокротой, лихорадку или чувство лихорадки, боли в теле, утомляемость (усталость), боль в шее и потерю аппетита.

Используемый в данном документе термин "приемлемый профиль безопасности" относится к характеру побочных эффектов, который находится в клинически приемлемых пределах, как это определено регулирующими органами.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Выбор конкретной эффективной дозы может быть определен (например, посредством клинических испытаний) специалистами в данной области на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, которое подлежит лечению или предупреждению, связанные с ним симптомы, массу тела пациента, состояние иммунитета пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза для применения в составе также будет зависеть от способа введения, пути введения, целевого участка, физиологического состояния пациента, других вводимых лекарственных препаратов и степени тяжести заболевания. Например, эффективное количество иммуногенных компонентов также зависит от того, вводят ли также адъювант, причем в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы.

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество иммуногенного компонента предусматривает количество иммуногенного компонента, достаточное для индукции защитного иммунного ответа против F-белка RSV с приемлемым профилем безопасности. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента предусматривает от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". В конкретных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от

приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, предпочтительно приблизительно 150 мкг на дозу, F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, как, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В предпочтительных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента предусматривает приблизительно от  $5 \times 10^{10}$  до  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, как, например, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1,3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1,6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу.

Предпочтительно, рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор создан на основе серотипа 26, такого как рекомбинантный Ad26.

Согласно вариантам осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента предусматривает от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, как, например, приблизительно 30 мкг на дозу, приблизительно 40 мкг на дозу, приблизительно 50 мкг на дозу, приблизительно 60 мкг на дозу, приблизительно 70 мкг на дозу, приблизительно 80 мкг на дозу, приблизительно 90 мкг на дозу, приблизительно 100 мкг на дозу, приблизительно 110 мкг на дозу, приблизительно 120 мкг на дозу, приблизительно 130 мкг на дозу,

приблизительно 140 мкг на дозу, приблизительно 150 мкг на дозу, приблизительно 160 мкг на дозу, приблизительно 170 мкг на дозу, приблизительно 180 мкг на дозу, приблизительно 190 мкг на дозу, приблизительно 200 мкг на дозу, приблизительно 225 мкг на дозу или приблизительно 250 мкг на дозу, F-белка RSV, который

5 стабилизирован в конформации "до слияния". Предпочтительно, рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 или 7.

Используемый в данном документе термин "совместно вводимые" в контексте введения двух или более иммуногенных компонентов или средств терапии субъекту

10 относится к применению двух или более иммуногенных компонентов или средств терапии в комбинации и двух или более иммуногенных компонентов или средств терапии, вводимых субъекту в течение 24 часов. В предпочтительных вариантах осуществления "совместно вводимые" иммуногенные компоненты предварительно смешивают и вводят субъекту вместе в одно и то же время. В других вариантах

15 осуществления "совместно вводимые" иммуногенные компоненты вводят субъекту в виде отдельных композиций в течение 24 часов, как, например, в течение 12 часов, 10 часов, 8 часов, 6 часов, 4 часов, 2 часов, 1 часа или менее.

В определенных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты составлены, например, с фармацевтически приемлемым буфером,

20 носителем, вспомогательным веществом и/или адъювантом в различных композициях. В других вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты составляют совместно, например, с фармацевтически приемлемым буфером, носителем, вспомогательным веществом и/или адъювантом, в одной композиции для введения, например, в смеси. Смешивание может происходить непосредственно перед

25 применением, когда два компонента производят и составляют, или в любое время в этом промежутке. В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты составлены вместе в одну композицию для введения в месте доставки незадолго до введения, например, при смешивании у постели больного, например с помощью многокамерного шприца.

30 В определенных вариантах осуществления первый и второй иммуногенные компоненты не содержат адъювант.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект-человек может быть любого возраста, например в возрасте от приблизительно 1 месяца до 100 или более лет, например от приблизительно 2 месяцев до приблизительно 100 лет.



Когда иммуногенную комбинацию вводят младенцу, композицию можно вводить один или несколько раз. Первое введение может быть осуществлено во время или сразу после рождения (например, в день или на следующий день после рождения), или в течение 1 недели после рождения, или в течение приблизительно 2 недель после рождения. В качестве альтернативы, первое введение может быть осуществлено через 5 приблизительно 4 недели после рождения, через приблизительно 6 недель после рождения, через приблизительно 2 месяца после рождения, через приблизительно 3 месяца после рождения, через приблизительно 4 месяца после рождения или позже, как, например, через приблизительно 6 месяцев после рождения, через приблизительно 10 9 месяцев после рождения или через приблизительно 12 месяцев после рождения.

В определенных вариантах осуществления субъект-человек, восприимчивый к RSV-инфекции, включает без ограничения пожилого субъекта-человека, например субъекта-человека в возрасте  $\geq 50$  лет,  $\geq 60$  лет,  $\geq 65$  лет; или молодого субъекта-человека, например субъекта-человека в возрасте  $\leq 5$  лет,  $\leq 1$  года; и/или 15 госпитализированного субъекта-человека или субъекта-человека, который получал лечение противовирусным соединением, однако у которого наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ. В определенных вариантах осуществления субъект-человек, восприимчивый к RSV-инфекциям, включает без ограничения субъекта-человека в возрасте от 18 до 59 лет, страдающего хроническим 20 заболеванием сердца, хроническим заболеванием легких, астмой и/или иммунодефицитом.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет по меньшей мере 60 лет.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет по меньшей мере 65 лет. 25

Согласно конкретным вариантам осуществления первый иммуногенный компонент содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белковый антиген из RSV. Подходящими являются как дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), так и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Нуклеиновая кислота может быть включена в вектор 30 на основе ДНК или РНК, например реплицируемый вектор (например, вирусный репликон, самоамплифицирующаяся нуклеиновая кислота), или в вирус (например, живой аттенуированный вирус), или в вирусный вектор (например, способный к репликации или дефектный в отношении репликации вирусный вектор). Подходящие вирусные векторы включают без ограничения аденовирус, модифицированный вирус

осповакцины Анкара (MVA), парамиксовирус, вирус болезни Ньюкасла, альфавирус, ретровирус, лентивирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус везикулярного стоматита и флавивирус. Необязательно, вирусный вектор является дефектным в отношении репликации. В соответствии с настоящей заявкой вектор может

5 представлять собой любой вектор, который можно легко подвергнуть процедурам с использованием рекомбинантной ДНК и который может вызывать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Выбор вектора будет, как правило, зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор необходимо ввести.

10 В соответствии с конкретными вариантами осуществления первый иммуногенный компонент содержит аденовирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

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

В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену из участка E1, например из участка E1a и/или участка E1b, аденовирусного генома, который необходим  
25 для репликации вируса. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор является дефектным по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно важным. В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену из участка E1 и по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно  
30 важным. В аденовирусном векторе может иметь место "множественный дефицит", что означает, что аденовирусный вектор является дефектным по одному или нескольким существенно важным функциональным генам из каждого из двух или более участков аденовирусного генома. Например, вышеупомянутые аденовирусные векторы, дефектные по E1 или дефектные по E1, E3, могут дополнительно являться дефектными

по меньшей мере по одному существенно важному гену из участка E4 и/или по меньшей мере по одному существенно важному гену из участка E2 (например, участка E2A и/или участка E2B).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные аденовирусные векторы по настоящему изобретению содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ (SEQ ID NO: 9). Эти варианты осуществления являются преимущественными, поскольку такие векторы демонстрируют улучшенную репликацию в производственных процессах, что приводит к партиям аденовирусов с улучшенной гомогенностью по сравнению с векторами, имеющими исходные 5'-концевые последовательности (как правило, САТСАТСА (SEQ ID NO: 10)) (см. также заявку на выдачу патента № РСТ/ЕР2013/054846 и патент США 13/794318, озаглавленный "Партии рекомбинантного аденовируса с измененными терминальными концами" ('Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends'), поданные 12 марта 2012 года от имени Crucell Holland B.V.), включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может кодировать фрагмент F-белка из RSV в конформации "до слияния". Фрагмент может быть результатом делеций одного или обоих из amino-конца и карбокси-конца. Степень делеции может определить специалист в данной области, например, для достижения лучшего выхода рекомбинантного аденовируса. Будет выбран такой фрагмент, который включает иммунологически активный фрагмент F-белка, т. е. часть, которая будет вызывать иммунный ответ у субъекта. Его можно легко определить с применением способов *in silico*, *in vitro* и/или *in vivo*, все из которых хорошо известны специалисту в данной области.

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

В соответствии с конкретными вариантами осуществления второй иммуногенный компонент содержит F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". F-Белки RSV в конформации "до слияния" могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК, включающей экспрессию

молекул в клетках-хозяевах, например клетках яичника китайского хомяка (CHO), линиях опухолевых клеток, клетках ВНК, линиях клеток человека, таких как клетки HEK293, клетки PER.C6®, или дрожжах, грибах, клетках насекомых и т. п., или в трансгенных животных или растениях. В определенных вариантах осуществления

5 клетки происходят из многоклеточного организма; в определенных вариантах осуществления они характеризуются происхождением от позвоночных или беспозвоночных. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающего. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки человека. Как правило, получение рекомбинантных белков

10 в клетке-хозяине, например F-белков RSV в конформации "до слияния" по настоящему изобретению, предусматривает введение молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок в экспрессируемом формате, в клетку-хозяина, культивирование клеток в условиях, способствующих экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты и обеспечивающих экспрессию белка в клетке. Молекула

15 нуклеиновой кислоты, кодирующая белок в экспрессируемом формате, может быть представлена в форме кассеты экспрессии и, как правило, требует наличие последовательностей, способных вызывать экспрессию нуклеиновой кислоты, таких как энхансер(ы), промотор, сигнал полиаденилирования и т. п. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах

20 можно применять различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разработать искусственным путем.

Среды для культивирования клеток доступны от различных поставщиков, и для

25 клетки-хозяина может быть выбрана стандартным образом подходящая среда для экспрессии белка, представляющего интерес, в данном случае F-белка RSV в конформации "до слияния". Подходящая среда может содержать сыворотку крови или может не содержать ее.

"Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты" (также называемая в данном документе "трансгеном") представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая

30 естественным образом не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Трансген, как правило, функционально соединен с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно, например, осуществить, поместив нуклеиновую кислоту, кодирующую

трансен(ы), под контроль промотора. Могут быть добавлены дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена(ов) можно применять многие промоторы, и они известны специалистам в данной области, например, они могут предусматривать вирусные промоторы, промоторы млекопитающих, синтетические промоторы и т. п. Неограничивающим примером промотора, подходящего для получения экспрессии в эукариотических клетках, является CMV-промотор (US 5385839), например непосредственно ранний промотор CMV, например содержащий нт от -735 до +95 из энхансера/промотора гена немедленно-раннего ответа CMV. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА бычьего гормона роста (US 5122458), может присутствовать позади трансгена(ов). В качестве альтернативы, в уровне техники и из коммерческих источников доступно несколько широко используемых векторов экспрессии, например серии векторов pcDNA и pEF от INVITROGEN®, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от STRATAGENETM и т. д., которые можно применять для рекомбинантной экспрессии белка, представляющего интерес, или для получения подходящих промоторов и/или последовательностей терминатора транскрипции, последовательностей полиА и т. п.

Клеточная культура может представлять собой любой тип клеточной культуры, в том числе адгезивную клеточную культуру, например клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального флакона или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Для крупномасштабного культивирования большинства суспензионных культур применяют периодический процесс или периодический процесс с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. В настоящее время непрерывные процессы, основанные на принципах перфузии, становятся более распространенными, и они также являются подходящими. Подходящие среды для культивирования также хорошо известны специалисту в данной области и могут, как правило, быть получены из коммерческих источников в больших количествах или изготовлены по заказу в соответствии со стандартными протоколами. Культивирование можно проводить, например, в чашках, роллерных бутылках или в биореакторах с использованием систем периодического действия, периодического действия с подпиткой, систем непрерывного действия и т. п. Подходящие условия для культивирования клеток известны (см., например, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), и R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

Дополнительно или в качестве альтернативы, в настоящей заявке представлены способы безопасного предупреждения инфицирования и/или репликации RSV у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающим профилактическое введение внутримышечно субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации, и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 250 мкг на дозу F-белка RSV, имеющего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и где (a) и (b) вводят совместно.

Настоящая заявка также относится к способам предупреждения или уменьшения степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающим профилактическое введение внутримышечно субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации, и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу F-белка RSV, имеющего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и где (a) и (b) вводят совместно.

В этих вариантах осуществления аденовирусный вектор может представлять собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad26, характеризующийся делецией участка E1 и участка E3.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

В определенных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет приблизительно 150 мкг F-белка RSV на дозу.

Способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать введение субъекту (с) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, и (d) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу после первоначального введения.

Интервал между введениями может варьироваться. Типичная схема может предусматривать первую иммунизацию с помощью описанной в настоящем документе комбинации с последующим вторым введением через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 месяцев. Другой режим может предусматривать введение одной или 2 доз ежегодно до начала сезона RSV.

Специалистам в данной области легко понять, что схемы примирующих и бустерных введений могут быть скорректированы на основании измеренных иммунных ответов после введений. Например, бустерные композиции, как правило, вводят через недели или месяцы после введения примирующей композиции, например, через приблизительно 1 неделю, или 2-3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 32 недели, или 36 недель, или 40 недель, или 44 недели, или 48 недель, или 52 недели, или 56 недель, или 60 недель, или 64 недели, или 68 недель, или 72 недели, или 76 недель или от одного до двух, трех, четырех или пяти лет после введения примирующих композиций.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления первый и/или второй иммуногенные компоненты составляют в виде фармацевтических композиций. В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или вспомогательное вещество в применяемых дозах и концентрациях не будет вызывать каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым они вводятся. Такие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Предпочтительный состав фармацевтической композиции зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции могут

включать фармацевтически приемлемые, нетоксические носители или разбавители, которые определяют как среды-носители, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животному или человеку. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не оказывал влияния на биологическую активность комбинации. Примеры таких разбавителей представляют собой дистиллированную воду, физиологический фосфатно-солевой буферный раствор, виды раствора Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав могут также включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т. п. Будет понятно, что характеристики носителя, вспомогательного вещества или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящей заявкой дополнительно содержат один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант применяют для усиления защитного иммунного ответа на F-белки RSV фармацевтических композиций. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде масляных эмульсий (или композиции типа "масло в воде"), в том числе сквален-водные эмульсии, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы с сапонами, такие как, например, QS21, и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примеры которых представляют собой монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, АДФ-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ и т. п.; белки эукариотов (например, антитела или их фрагменты (например, направленные против самого антигена или CD1a, CD3, CD7, CD80) и лиганды к рецепторам (например, CD40L, GMCSF, GCSF и т. д.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с реципиентными клетками. Также возможно применение адъюванта, кодируемого вектором, например, путем применения гетерологичной нуклеиновой



кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации C4-связывающего белка (C4bp) с антигеном, представляющим интерес (например, Solabomi et al, 2008, Infect Immun 76: 3817-23). В определенных вариантах осуществления первый иммуногенный компонент составлен с адъювантом. В других вариантах осуществления второй иммуногенный компонент составлен с адъювантом. В определенных вариантах осуществления оба иммуногенных компонента содержат адъювант. Как правило, адъювант смешивают (например, перед введением или в стабильном составе) с антигенным компонентом. Когда иммуногенную комбинацию необходимо вводить субъекту определенной возрастной группы, тогда адъювант выбирают таким образом, чтобы он был безопасным и эффективным для субъекта или популяции субъектов. Таким образом, при составлении иммуногенной комбинации для введения субъекту пожилого возраста (например, субъекту в возрасте старше 65 лет) адъювант выбирают таким образом, чтобы он был безопасным и эффективным для пожилых субъектов. Аналогичным образом, когда комбинированная иммуногенная композиция предназначена для введения субъектам-новорожденным или -младенцам (как, например, субъектам в возрасте от рождения до двух лет), тогда адъювант выбирают таким образом, чтобы он был безопасным и эффективным для новорожденных и младенцев. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат алюминий в качестве адъюванта, т. е. в виде гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации, в концентрациях 0,05-5 мг, например 0,075-1,0 мг, содержания алюминия на дозу.

Фармацевтические композиции можно применять, например, для независимой профилактики заболевания или состояния, вызванного RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими способами лечения, такими как (существующие или будущие) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

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

6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с введением или после введения (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) второго терапевтического средства субъекту.

Фармацевтические композиции по настоящей заявке могут быть составлены в соответствии со способами, известными в уровне техники, с учетом настоящего изобретения.

В настоящей заявке также представлены способы предупреждения инфицирования и/или репликации RSV с приемлемым профилем безопасности у субъекта-человека, нуждающегося в этом. В конкретных вариантах осуществления способ включает профилактическое введение субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". Это будет снижать неблагоприятные эффекты, возникающие в результате RSV-инфекции, у субъекта и, таким образом, способствовать защите субъекта от таких неблагоприятных эффектов при введении фармацевтической композиции.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовых путях и/или легких субъекта и/или отсутствием или уменьшением степени проявления клинических симптомов RSV-инфекции при воздействии RSV по сравнению с таковым у субъекта, которому не вводили фармацевтическую композицию, при воздействии RSV. В определенных вариантах осуществления отсутствие вирусной нагрузки, обусловленной RSV, или отсутствие неблагоприятных эффектов RSV-инфекции означает снижение до таких низких уровней, что они не являются клинически значимыми.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуются предупреждением или уменьшением степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), у субъекта при воздействии RSV.

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

Дополнительно или в качестве альтернативы, предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуются уменьшением степени проявления симптоматики заболевания по сравнению с таковым у субъекта, которому не вводили фармацевтическую композицию, при воздействии RSV.

Дополнительно или в качестве альтернативы, предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуется более быстрым восстановлением здоровья по сравнению с таковым у субъекта, которому не вводили фармацевтическую композицию, при воздействии RSV.

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество фармацевтической композиции предусматривает количество фармацевтической композиции, достаточное для предупреждения инфицирования и/или репликации RSV с приемлемым профилем безопасности. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента предусматривает от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". В конкретных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, предпочтительно приблизительно 150 мкг на дозу, F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, как, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно

3x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 4x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 5x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 6x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 7x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 8x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 9x10<sup>10</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 1x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 2x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 3x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 4x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 5x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 6x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 7x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 8x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 9x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу или приблизительно 1x10<sup>12</sup> вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В предпочтительных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента предусматривает приблизительно от 5x10<sup>10</sup> до 2x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, как, например, приблизительно 1x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу, приблизительно 1,3x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу или приблизительно 1,6x10<sup>11</sup> вирусных частиц на дозу.

Предпочтительно, рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор создан на основе серотипа 26, такого как рекомбинантный Ad26.

Согласно вариантам осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента предусматривает от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, например приблизительно 30 мкг на дозу, приблизительно 40 мкг на дозу, приблизительно 50 мкг на дозу, приблизительно 60 мкг на дозу, приблизительно 70 мкг на дозу, приблизительно 80 мкг на дозу, приблизительно 90 мкг на дозу, приблизительно 100 мкг на дозу, приблизительно 110 мкг на дозу, приблизительно 120 мкг на дозу, приблизительно 130 мкг на дозу, приблизительно 140 мкг на дозу, приблизительно 150 мкг на дозу, приблизительно 160 мкг на дозу, приблизительно 170 мкг на дозу, приблизительно 180 мкг на дозу, приблизительно 190 мкг на дозу, приблизительно 200 мкг на дозу, приблизительно 225 мкг на дозу или приблизительно 250 мкг на дозу, растворимого F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". Предпочтительно растворимый рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 или под SEQ ID NO: 7. Дополнительно или в качестве альтернативы,

растворимый рекомбинантный F-белок RSV кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В настоящей заявке также представлены способы вакцинации субъекта против RSV-инфекции с приемлемым профилем безопасности у субъекта-человека,

5 нуждающегося в этом. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту (а) эффективного количества первого иммуногенного компонента, содержащего аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", и (b) эффективного количества второго иммуногенного компонента, содержащего F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество фармацевтической композиции предусматривает количество фармацевтической композиции, достаточное для вакцинации субъекта против RSV-инфекции с приемлемым профилем безопасности. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента предусматривает от 15 приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, предпочтительно приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". В конкретных вариантах осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от 20 приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, предпочтительно приблизительно 150 мкг на дозу, F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния".

В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, как, например, приблизительно  $1 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, 30 приблизительно  $7 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{10}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $2 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $4 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу,

приблизительно  $6 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $7 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $8 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу, приблизительно  $9 \times 10^{11}$  вирусных частиц на дозу или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу, аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". Предпочтительно, рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, и аденовирусный вектор создан на основе серотипа 26, такого как рекомбинантный Ad26.

Согласно вариантам осуществления эффективное количество второго иммуногенного компонента предусматривает от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу, например приблизительно 30 мкг на дозу, приблизительно 40 мкг на дозу, приблизительно 50 мкг на дозу, приблизительно 60 мкг на дозу, приблизительно 70 мкг на дозу, приблизительно 80 мкг на дозу, приблизительно 90 мкг на дозу, приблизительно 100 мкг на дозу, приблизительно 110 мкг на дозу, приблизительно 120 мкг на дозу, приблизительно 130 мкг на дозу, приблизительно 140 мкг на дозу, приблизительно 150 мкг на дозу, приблизительно 160 мкг на дозу, приблизительно 170 мкг на дозу, приблизительно 180 мкг на дозу, приблизительно 190 мкг на дозу, приблизительно 200 мкг на дозу, приблизительно 225 мкг на дозу или приблизительно 250 мкг на дозу, растворимого F-белка RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния". Предпочтительно растворимый рекомбинантный F-белок RSV характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 или под SEQ ID NO: 7. Дополнительно или в качестве альтернативы, растворимый рекомбинантный F-белок RSV кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В настоящей заявке также представлены иммуногенные комбинации (например, наборы) или комбинированные вакцины, содержащие (а) первый иммуногенный компонент, содержащий аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, где эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, и (b) второй иммуногенный компонент, содержащий F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", который описан в настоящем документе, где эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от приблизительно 30 мкг до

приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу. Комбинацию можно применять для индуцирования защитного иммунного ответа против RSV-инфекции у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Предпочтительно комбинацию применяют для предупреждения опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR).

Иммуногенные компоненты комбинаций могут включать составленные вместе композиции или различные композиции, которые содержат каждый компонент по отдельности. В определенных вариантах осуществления комбинации содержат первый иммуногенный компонент и второй иммуногенный компонент в одном контейнере. В других вариантах осуществления комбинации содержат первый иммуногенный компонент и второй иммуногенный компонент в отдельных контейнерах. Контейнер(ы) может представлять собой, например, один или несколько предварительно заполненных шприцев. Такой шприц может представлять собой многокамерный (например, двухкамерный) шприц. В определенных вариантах осуществления в случае многокамерного шприца первый иммуногенный компонент содержится в одной камере, а второй иммуногенный компонент содержится во второй камере. Перед введением два компонента можно смешать, а затем ввести субъекту в одно и то же место (например, с помощью одной иглы).

## ПРИМЕРЫ

Следующие примеры в настоящей заявке предназначены для дополнительной иллюстрации сущности настоящей заявки. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают настоящее изобретение и что объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

### **Пример 1. Иммунотенность pre-F-белка RSV без адьюванта и Ad26.RSV.pre-F у интактных мышей**

У интактных мышей измеряли гуморальную и клеточную иммунотенность при 5 мкг или 0,5 мкг pre-F-белка RSV без адьюванта при введении вместе с субоптимальной дозой  $1 \times 10^8$  вирусных частиц (в. ч.) Ad26.RSV.pre-F при гомологичной схеме "прайм-буст" иммунизации. У интактных мышей (субоптимальная) доза  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F индуцировала выработку титров нейтрализующих вирус антител (VNT) от очень низких до неопределяемых, для штамма A2 RSV. Смесь содержала буфер Ad26.RSV.pre-F и буфер (PBS) pre-F-белка

RSV в соотношении 1:1. Группы сравнения получали только PBS или "прайм-буст" иммунизацию посредством либо pre-F-белка RSV, либо Ad26.RSV.pre-F.

Мышей Balb/c подвергали примирующей или бустерной иммунизации внутримышечно (IM) смесью  $10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и 5 мкг или 0,5 мкг pre-F-белка RSV (n = 12 на группу), или с помощью  $10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F (n = 12), или с помощью 5 мкг или 0,5 мкг pre-F-белка RSV (n = 8 на группу), или с помощью PBS (n = 8). Интервал "прайм-буст" иммунизации составлял 4 недели.

#### Ответы в виде выработки нейтрализующих антител

Через 2 недели после бустерной иммунизации животных умерщвляли и выделяли сыворотку крови. Титры нейтрализующих вирус A2 RSV антител определяли с использованием репортерного анализа люциферазы светлячка. Рассчитывали титры IC<sub>50</sub>, и результаты представлены на фиг. 2. Средний ответ на группу указан горизонтальной линией. Пунктирная линия показывает нижний предел количественного определения  $6,88 \log_2$ . Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Во всех группах VNT были от низких до неопределяемых через 4 недели (день 28) после примирующей иммунизации (фиг. 2, верхняя панель). Через две недели после бустерной вакцинации (день 42) иммунизация отдельно дозами 5 мкг и 0,5 мкг preF-белка RSV индуцировала выработку VNT, которые были сопоставимы между 2 дозами (фиг. 2, нижняя панель).

У интактных мышей смесь pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F индуцировала выработку более высоких VNT, чем низкая (субоптимальная) доза отдельно Ad26.RSV.preF ( $1 \times 10^8$  в. ч.) при исследованных дозах 5 мкг и 0,5 мкг pre-F-белка RSV ( $p < 0,001$ , ANOVA). VNT, индуцированные отдельно pr-eF-белком RSV, существенно не отличались от VNT, индуцированных смесью pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.preF ( $p = 0,255$ , ANOVA, сравнение доз).

#### Ответы в виде связывания антител с pre-F и post-F RSV

IgG-Антитела к pre-F RSV и post-F RSV измеряли с помощью ELISA. Планшеты покрывали антителом к F RSV с последующим добавлением pre-F-белка RSV или post-F-белка RSV. Планшеты инкубировали с серийно разбавленными образцами с последующим обнаружением с помощью антитела к IgG мыши и измеряли оптическую плотность.

Во всех группах титры антител к pre-F и post-F RSV были от низких до неопределяемых через 4 недели после примирующей иммунизации (данные не показаны). Через две недели после бустерной иммунизации индуцировались высокие



титры антител против pre-F RSV после иммунизации с помощью 0,5 мкг или 5 мкг pre-F-белка RSV. Смесь pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F индуцировала выработку титров антител к pre-F RSV, сходных с титрами при введении pre-F-белка RSV отдельно ( $p=0,869$ , ANOVA, сравнение доз) (фиг. 3, верхняя панель). Мыши, иммунизированные отдельно низкой дозой Ad26.RSV.pre-F, имели низкие или неопределяемые титры антител к pre-F RSV, а смесь pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F индуцировала значительно более высокие титры антител к pre-F RSV, по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно ( $p<0,001$ , ANOVA). Аналогичную картину индукции антител наблюдали для антител, связывающих post-F, хотя и с более низкими титрами, чем против pre-F RSV (фиг. 3, средняя панель). Титры приведены в виде  $\log_{10}$  значения IC50. Нижний предел количественного определения (LLOQ) указан пунктирной линией. На фиг. 3 на нижней панели отображено соотношение между антителами к preF и postF для всех образцов, которые показали титры к preF и postF выше LLOQ. Средний ответ на группу указан горизонтальной линией. Статистическое сравнение введения Ad26.RSV.preF отдельно с введением смеси проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), а сравнение белка со смесью сравнивали с помощью ANOVA для сравнения доз (н. с. = не существенно).

У мышей, иммунизированных смесью pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F, не наблюдали существенно отличающегося соотношения антител, связывающих pre-F/post-F RSV, по сравнению с мышами, иммунизированными только preF-белком RSV ( $p=0,146$ , ANOVA, сравнение доз). Сравнение с группой, получавшей Ad26.RSV.pre-F отдельно, провести было невозможно из-за неопределяемых титров у многих животных из этой группы.

#### Клеточные ответы

Клеточные ответы измеряли в спленоцитах, взятых через 2 недели после бустерной иммунизации. Спленоциты выделяли и стимулировали пептидным пулом, охватывающим F-белок A2 RSV. Количество пятнообразующих единиц IFN $\gamma$  (SFU) на  $10^6$  спленоцитов определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISPOT) (фиг. 4). Среднее геометрическое значение ответа на группу указано горизонтальной линией. Пунктирная линия отображает предел обнаружения, определяемый как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленоцитах.

Примирующая и бустерная иммунизации посредством Ad26.RSV.pre-F отдельно или в сочетании с низкой дозой (0,5 мкг) preF-белка RSV индуцировала сопоставимые ELISPOT ответы Т-клеток IFN $\gamma$  (фиг. 3). Смесь Ad26.RSV.preF с более высокой дозой

(5 мкг) preF-белка RSV давала значительно более низкий ответ Т-клеток  $IFN\gamma^+$  по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно ( $p < 0,001$ , ANOVA). "Прайм-буст" иммунизация preF-белком RSV отдельно индуцировала незначительный клеточный ответ на F RSV. Сходные результаты наблюдали в анализе ICS (фиг. 5 и фиг. 6). Иммунизация Ad26.RSV.preF индуцировала  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетки, продуцирующие  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-2. Иммунизация смесью preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF приводила к снижению ответов  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, в частности в отношении более высокой дозы белка и клеточных популяций, продуцирующих  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ .

На фиг. 5 показан процент цитокин-положительных  $CD3^+CD4^+$  спленоцитов, измеренный с помощью ICS. Предел обнаружения (LOD) определяли как среднее фоновое окрашивание + 3 стандартных отклонения средних контролей. LOD  $CD3^+CD4^+$  для  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-2 составляли соответственно 0,09, 0,08 и 0,07. Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) (н. с. = не существенно).

На фиг. 6 показан процент цитокин-положительных  $CD3^+CD8^+$  спленоцитов, измеренный с помощью ICS. Предел обнаружения (LOD) определяли как среднее фоновое окрашивание + 3 стандартных отклонения средних контролей. LOD  $CD3^+CD8^+$  для  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-2 составляли соответственно 0,19, 0,29 и 0,07. Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) или ANOVA со сравнением доз (н. с. = не существенно).

### **Пример 2. Иммуногенность различных смешанных комбинаций Ad26.RSV.pre-F и pre-F-белка RSV у мышей**

У интактных мышей сравнивали гуморальную и клеточную иммуногенность смеси  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и различных концентраций pre-F-белка RSV (15, 1,5, 0,15 и 0,015 мкг) с  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F отдельно после гомологичной схемы "прайм-буст" иммунизации у мышей. Мышей Balb/c подвергали примирующей и бустерной иммунизации ИМ смесью  $10^8$  вирусных частиц (в. ч.) Ad26.RSV.pre-F и 15, 1,5, 0,15 или 0,015 мкг pre-F-белка RSV, смесью  $10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и 15 мкг pre-F-белка RSV, или с помощью  $10^8$  в. ч. или  $10^9$  Ad26.RSV.pre-F ( $n=6$  на группу), или с помощью PBS ( $n=3$ ). Смесь содержала буфер Ad26.RSV.pre-F и буфер для составления pre-F-белка RSV в соотношении 1:1. Группа отрицательного контроля получала смесь двух составов с буфером в соотношении 1:1. Интервал "прайм-буст" иммунизации составлял 4 недели. Через 2 недели после бустерной иммунизации животных умерщвляли и выделяли сыворотку крови.

### Ответы в виде выработки нейтрализующих антител

Титры нейтрализующих вирус CL57 RSV антител определяли с использованием репортерного анализа люциферазы светлячка. Рассчитывали титры IC<sub>90</sub>, и средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией (фиг. 6). Пунктирная линия

5 показывает нижний предел количественного определения  $6,88 \log_2$ . Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

Через две недели после бустерной вакцинации (день 42) иммунизация смесью  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и 15, 1,5, 0,15 или 0,015 мкг preF-белка RSV индуцировала значительно более высокие VNT по сравнению с Ad26.RSV.preF. отдельно ( $p \leq 0,018$

10 ANOVA, последующее тестирование, начиная с самой высокой дозы). Смесью  $1 \times 10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и 15 мкг pre-F-белка RSV индуцировала более высокие VNT по сравнению с  $1 \times 10^9$  в. ч. Ad26.RSV.preF отдельно.

### Ответы в виде связывания антител с pre-F и post-F RSV

IgG-Антитела к pre-F RSV и post-F RSV измеряли с помощью ELISA. Планшеты

15 покрывали антителом к F RSV с последующим добавлением pre-F-белка RSV или post-F-белка RSV. Планшеты инкубировали с серийно разбавленными образцами с последующим обнаружением с помощью антитела к IgG мыши и измеряли оптическую плотность.

Титры приведены в виде  $\log_{10}$  значения IC<sub>50</sub> (фиг. 7). Нижний предел

20 количественного определения (LLOQ) указан пунктирной линией. На нижнем графике отображено соотношение между антителами к preF и postF для всех образцов, которые показали титры к preF и postF выше LLOQ. Средний ответ на группу указан горизонтальной линией. Статистическое сравнение Ad26.RSV.preF отдельно со смесью проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим

25 тестированием, начиная с самой высокой дозы белка; н. с. = не существенно.

Через две недели после бустерной иммунизации у мышей, получавших субоптимальную дозу Ad26.RSV.pre-F ( $10^8$  в. ч.), наблюдали низкие титры антител к pre-F RSV. Иммунизация смесью Ad26.RSV.pre-F и pre-F-белка RSV индуцировала значительно более высокие титры pre-F RSV по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно

30 для всех тестируемых доз pre-F-белка RSV ( $p < 0,001$  для всех, ANOVA). Смесью не индуцировала значительно более высокие титры post-F RSV по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно. Наблюдали значительно более высокое соотношение pre-F/post-F по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно ( $p < 0,001$  для всех, ANOVA).

Аналогичные результаты наблюдали со смесью  $10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F и 15 мкг pre-F-белка RSV.

#### Клеточные ответы

Клеточные ответы измеряли в спленоцитах, взятых через 2 недели после бустерной иммунизации. Количество пятнообразующих единиц  $IFN\gamma$  (SFU) на  $10^6$  спленоцитов определяли с помощью анализа с иммуноферментными пятнами (ELISPOT). На фиг. 8 среднее геометрическое значение ответа на группу указано горизонтальной линией. Пунктирная линия отображает предел обнаружения, определяемый как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленоцитах. Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA); н. с. = не существенно.

Примиряющая и бустерная иммунизации с помощью Ad26.RSV.pre-F, смешанного с 15, 1,5, 0,15 и 0,015 мкг preF-белка RSV, индуцировала ответы Т-клеток  $IFN\gamma^+$  не меньшей эффективности согласно ELISPOT по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно (4-кратно относительно предела не меньшей эффективности, фиг. 9). Смесь, содержащая  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F в дозе 15 мкг белка, показала тенденцию к ухудшению по сравнению с Ad26.RSV.pre-F отдельно. Смесь  $10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F с 15 мкг показала ответы не меньшей эффективности по сравнению с  $10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F отдельно.

Через 2 недели после бустерной иммунизации животных умерщвляли, выделяли спленоциты и стимулировали пептидным пулом, охватывающим F-белок A2 RSV. Процент цитокин-положительных  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD8^+$  спленоцитов, измеренный с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), показан на фиг. 10. Предел обнаружения (LOD) определяли как среднее фоновое окрашивание + 3 стандартных отклонения средних контролей. LOD  $CD3^+CD4^+$  для  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-2 составлял соответственно 0,39, 0,15 и 0,24, а LOD  $CD3^+CD8^+$  для  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и IL-2 составлял соответственно 0,19, 0,14 и 0,67. Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA); н. с. = не существенно.

По результатам ICS видно, что  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F, смешанных с 15, 1,5 или 0,15 мкг pre-F-белка RSV, не индуцировали существенно отличающиеся ответы  $CD4^+IFN\gamma^+$ ,  $CD4^+IL2^+$  и  $CD4^+TNF\alpha^+$  Т-клеток по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно, хотя наблюдали тенденцию, согласно которой 15 мкг pre-F-белка RSV приводило к более низким уровням ответов  $CD4^+$  Т-клеток (ANOVA). Интересно, что  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F, смешанных с 0,015 мкг pre-F-белка RSV, показали

значительно более высокие уровни ответов CD4+IFN $\gamma$ +, CD4+IL2+ и CD4+TNF $\alpha$ + T-клеток по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно. Ad26.RSV.preF ( $1 \times 10^8$  в. ч.), смешанных с 15, 1,5, 0,15 или 0,015 мкг pre-F-белка RSV, не индуцировали существенно различающиеся ответы CD8+IFN $\gamma$ +, CD8+IL2+ или CD8+TNF $\alpha$ + T-клеток по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно (ANOVA) (фиг. 11).

### **Пример 3. Иммуногенность preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV**

В исследовании с только примированием мышей Balb/c предварительно подвергали воздействию  $5 \times 10^5$  б. о. е. A2 RSV посредством интраназального применения за 17 недель до иммунизации. Затем мышам вводили смесь 1,5 мкг или 0,15 мкг pre-F-белка RSV вместе с  $1 \times 10^8$  или  $1 \times 10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F (n=12 на группу). Контрольные группы получали 1,5 мкг pre-F-белка RSV (n=5) отдельно, или  $1 \times 10^8$  или  $1 \times 10^9$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F отдельно, или имитацию иммунизации смесью составов с буфером. Сыворотку крови брали через 6 недель после иммунизации.

#### Ответы в виде выработки нейтрализующих антител

Титры нейтрализующих вирус CL57 RSV антител определяли с использованием репортерного анализа люциферазы светлячка. Титры IC90 показаны на фиг. 12. Средний ответ на группу указан горизонтальной линией. Пунктирная линия показывает нижний предел количественного определения (LLOQ)  $5,28 \log_2$ . Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA с поправкой Даннета при сравнении доз Ad26.RSV.pre-F). Группа с имитацией иммунизации показала, что мыши, предварительно подвергшиеся воздействию A2 RSV, имели VNT к CL57 RSV выше LLOQ в отношении анализа. Все группы иммунизации демонстрировали увеличение среднего VNT по сравнению с имитацией иммунизации. Сравнение доз Ad26.RSV.pre-F показало, что иммунизация смесью pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F давала более высокие VNT, чем Ad26.RSV.pre-F отдельно (0,15 мкг pre-F-белка RSV  $p < 0,001$ ; 1,5 мкг pre-F-белка RSV  $p = 0,002$ , ANOVA для потенциально цензурированных измерений с поправкой Даннета для множественных сравнений).

#### **Ответы в виде связывания антител с pre-F и post-F RSV**

Сыворотку крови брали через 6 недель после иммунизации. IgG-Антитела к pre-F RSV и post-F RSV измеряли с помощью ELISA. Планшеты покрывали антителом к F RSV с последующим добавлением pre-F-белка RSV или post-F-белка RSV. Планшеты инкубировали с серийно разбавленными образцами с последующим обнаружением с помощью антитела к IgG мыши и измеряли оптическую плотность. На фиг. 13 титры

антител, связывающих pre-F и post-F, представлены в виде  $\log_{10}$  значения EC50. Нижний предел количественного определения (LLOQ) указан пунктирной линией. На нижнем графике отображено соотношение между антителами к preF и postF для всех образцов, которые показали титры к preF и postF выше LLOQ. Средний ответ на группу  
 5 указан горизонтальной линией.

До иммунизации все группы, подвергшиеся предварительному воздействию RSV, по-видимому, имели сопоставимые титры антител к pre-F и post-F (данные не показаны). После иммунизации во всех группах наблюдали увеличение титров антител как к pre-F, так и к post-F (фиг. 13). Мыши, иммунизированные смесью pre-F-белка RSV  
 10 и Ad26.RSV.pre-F, имели значительно более высокие титры к pre-F и post-F по сравнению с мышами, иммунизированными Ad26.RSV.pre-F отдельно ( $p \leq 0,001$  для всех групп, ANOVA для потенциально цензурированных наблюдений по дозе Ad26.RSV.pre-F с поправкой Даннета для множественного тестирования). Соотношение титров антител к pre-F и post-F существенно не различалось между  
 15 группами.

#### Клеточные ответы

Спленоциты, полученные через 6 недель после иммунизации, стимулировали пептидным пулом, охватывающим F-белок A2 RSV. Количество пятнообразующих единиц IFN $\gamma$  (SFU) на  $10^6$  спленоцитов определяли с помощью способа  
 20 иммуноферментных пятен (ELISPOT). Среднее геометрическое значение ответа на группу указано горизонтальной линией (фиг. 14). Пунктирная линия отображает предел обнаружения, определяемый как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленоцитах. Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA со сравнением доз Ad26.RSV.preF); н. с. = не  
 25 существенно.

Результаты SFU IFN $\gamma$ , полученные с помощью ELISPOT, существенно не отличались между введением смеси 0,15 мкг pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F и введением Ad26.RSV.pre-F отдельно (фиг. 14). При применении смеси 1,5 мкг pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F наблюдали значительно более низкий ответ по сравнению  
 30 с Ad26.RSV.pre-F отдельно ( $p=0,024$ , ANOVA для сравнения доз Ad26.RSV.pre-F). Различие было более выраженным для более низкой ( $10^8$  в. ч.) дозы Ad26.RSV.preF, чем для более высокой ( $10^9$  в. ч.) дозы. В группе, получавшей только pre-F-белок RSV клеточный ответ был низким.

Процент цитокин-положительных CD3+CD4+ и CD3+CD8+ спленоцитов измеряли с помощью ICS. Предел обнаружения (LOD) определяли как среднее фоновое окрашивание + 3 стандартных отклонения средних контролей (фиг. 14). LOD CD3+CD4+ для IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 составляли соответственно 0,30, 0,34 и 0,13. LOD CD3+CD8+ для IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 составляли соответственно 0,65, 0,78 и 0,19. Статистический анализ проводили с помощью теста Кокрана-Мантеля-Хензеля с дозой Ad26.RSV.preF в качестве фактора стратификации и с поправкой Бонферрони; н. с. = не существенно.

Только предварительное воздействие не показало обнаруживаемой экспрессии цитокинов CD4+ или CD8+ Т-клетками (фиг. 15А и В). Ad26.RSV.preF при применении отдельно индуцировал низкий ответ CD4+ Т-клеток (CD4+ Т-клетки, экспрессирующие IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , в основном ниже 1% CD3+CD4+ клеток). Смесь Ad26.RSV.preF и PRPM показала значительно более низкие ответы IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  для обеих концентраций PRPM в смеси, за исключением 0,15 мкг для CD4+TNF $\alpha$  Т-клеток (фиг. 15А). Ad26.RSV.preF при применении отдельно индуцировал CD8+ Т-клетки, экспрессирующие IFN $\gamma$ , IL-2 (низкий процент) и TNF $\alpha$  (фиг. 15В). В соответствии с результатами ELISPOT, смесь Ad26.RSV.preF и 1,5 мкг PRPM индуцировала значительно более низкие ответы IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  по сравнению с мышами, получавшими Ad26.RSV.preF отдельно ( $p=0,042$  и  $0,040$ , соответственно, тест СМН в зависимости от дозы Ad, фиг. 15В). Ответ IL-2 также был снижен у мышей, получавших смесь Ad26.RSV.preF и 0,15 мкг PRPM ( $p<0,001$ ).

Эти данные показывают, что компонент Ad26.RSV.preF индуцирует клеточные ответы, и указывают на то, что добавление preF-белка RSV может влиять на клеточный ответ в зависимости от применяемого соотношения preF-белок RSV/Ad26.RSV.preF.

#### **Пример 4. Иммуногенность при гетерологичных схемах введения preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF у мышей, предварительно подвергшихся воздействию RSV**

Иммуногенность смеси pre-F-белка RSV и Ad26.RSV.pre-F только после примиряющей иммунизации сравнивали с гетерологичной схемой введения "прайма" Ad26.RSV.pre-F, "буста" pre-F-белка RSV у мышей. Мышей Balb/c предварительно подвергали интраназальному введению  $5 \times 10^5$  б. о. е. A2 RSV, а через 26 недель проводили примиряющую иммунизацию смесью 0,15 мкг pre-F-белка RSV и  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F ( $n=13$ ) или  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F ( $n=12$ ) отдельно. Группы, получавшие "прайм-буст" с 4-недельным интервалом дозирования иммунизировали

$1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.pre-F "прайм" и 0,15 мкг pre-F-белка RSV (n=12) "буст" или 0,15 мкг pre-F-белка RSV "прайм" и "буст" (n=4). Группа имитации иммунизации получала буферный состав (n=7).

#### Ответы в виде выработки нейтрализующих антител

- 5 Сыворотку крови брали через 6 недель после примиряющей (через 2 недели после бустерной) иммунизации. Титры нейтрализующих вирус CL57 RSV антител определяли с использованием репортерного анализа люциферазы светлячка. Средний ответ на группу указан горизонтальной линией. Пунктирная линия показывает нижний предел количественного определения  $5,28 \log_2$ . Статистический анализ проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и теста гипотезы не меньшей
- 10 эффективности между дозами. Предел не меньшей эффективности был установлена как 4-кратное изменение титра IC<sub>90</sub>, т. е.  $2 \log_2$ . Устойчивый ответ в виде выработки нейтрализующих антител против штамма CL57 RSV наблюдали через 6 недель после однократной иммунизации смесью 0,15 мкг pre-F-белка RSV и  $1 \times 10^8$  в. ч.
- 15 Ad26.RSV.pre-F, что показало не меньшую эффективность относительно гетерологичной схемы с Ad26.RSV.preF "прайм", pre-F-белка RSV "буст" с помощью тех же доз (фиг. 16). Гетерологичная схема "прайм-буст" также индуцировала значительно более высокие VNT по сравнению с однократной иммунизацией Ad26.RSV.pre-F отдельно ( $p < 0,001$ , ANOVA).

#### 20 Ответы в виде связывания антител с pre-F и post-F RSV

- Через две недели после бустерной вакцинации (неделя 6) смесь preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF привела к титрам антител к pre-F и post-F не меньшей эффективности по сравнению с мышами, получавшими гетерологичную схему с Ad26.RSV.pre-F "прайм", pre-F-белка RSV "буст" (фиг. 17A и B). С помощью гетерологичной схемы
- 25 "прайм-буст" индуцировали значительно более высокие титры антител к pre-F ( $p=0,013$ ) и соотношение титров pre-F/post-F ( $p < 0,001$ ) по сравнению с Ad26.RSV.pre-F "прайм" отдельно (фиг. 17A и C); титры post-F (фиг. 17B) между этими группами были одинаковыми. Следует отметить, что перед ревакцинацией (неделя 4) две группы, получавшие Ad26.RSV.preF "прайм", показали значительно различающиеся уровни
- 30 титров pre-F и post-F ( $p=0,009$  и  $p=0,006$ , соответственно, ANOVA), вероятно, случайно. Из исследовательского анализа видно, что группа, иммунизированная смесью preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF, показала значительно более высокие титры pre-F и post-F антител по сравнению с мышами, получавшими Ad26.RSV.preF отдельно, как на 4-й, так и на 6-й неделе ( $p < 0,001$  для всех сравнений, ANOVA). На 6-ой неделе у мышей,



получавших Ad26.RSV.preF отдельно, было значительно более низкое соотношение антител pre-F/post-F, чем у мышей, получавших смесь preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF ( $p=0,012$ , ANOVA).

#### Клеточные ответы

5 Клеточный ответ измеряли с помощью IFN $\gamma$  ELISPOT и ICS для IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ . Из-за технического сбоя в анализе ELISPOT нельзя сделать никаких выводов из этого анализа. В анализе ICS гетерологичная схема с Ad26.RSV.preF "прайм", preF-белком RSV "буст", индуцировала значительно более высокие ответы CD4+ Т-клеток TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно (в обоих случаях  $p<0,001$ , ANOVA) (фиг. 18). Смесь 0,15 мкг preF-белка RSV и  $1 \times 10^8$  в. ч. Ad26.RSV.preF индуцировала значительно более низкий ответ CD8+IFN $\gamma$ , CD8+TNF $\alpha$  и CD4+IFN $\gamma$  Т-клеток по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно ( $p<0,05$  для всех, ANOVA).

#### **Пример 5. Иммуногенность preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF у предварительно подвергшихся воздействию приматов, отличных от человека (NHP)**

15 Африканских зеленых обезьян (самки, 9-26 лет) подвергали предварительному интраназальному воздействию штамма Memphis 37 RSV  $7,5 \times 10^5$  б. о. е. Успешное предварительное воздействие было подтверждено с помощью ELISA образцов сыворотки крови с post-F RSV, полученных через 14 недель (данные не показаны).  
 20 Затем обезьян распределяли по исследовательским группам на основе титров post-F RSV, полученных с помощью ELISA, и возраста, чтобы получить равномерное распределение титров антител RSV до воздействия между группами. Через девятнадцать недель после предварительного воздействия животные получали однократную иммунизацию посредством  $10^{11}$  в. ч. Ad26.RSV.preF, 150 мкг preF-белка RSV или смеси  $10^{11}$  в. ч. Ad26.RSV.preF и 150 мкг, 50 мкг или 15 мкг preF-белка RSV,  
 25 соответственно.

#### Ответы в виде выработки нейтрализующих антител

Предварительно подвергшиеся воздействию RSV NHP имели VNT против CL57 RSV выше предела обнаружения за 1 неделю до иммунизации. Увеличение VNT наблюдали во всех вакцинированных группах через 2 недели после иммунизации (фиг. 19). Никаких существенных различий в VNT не наблюдали между группой, получавшей Ad26.RSV.preF отдельно, и группами, получавшими смесь Ad26.RSV.preF и preF-белка RSV, в любой момент времени (ANOVA с поправкой Даннета для множественного тестирования). Ответ в виде VNT был очень высоким в группе,

иммунизированной Ad26.RSV.preF, и поэтому вывод о дополнительном значении preF-белка RSV в смеси в этой модели сделать было невозможно.

Ответ в виде VNT на preF-белок RSV оказался менее стойким, чем на иммунизацию Ad26.RSV.preF. У животных, получавших 150 мкг preF-белка RSV, VNT существенно не отличались от таковых у животных, получавших Ad26.RSV.preF или смесь 150 мкг preF-белка RSV и Ad26.RSV.preF через 2 и 4 недели после иммунизации. Однако через 7, 9, 11 и 15 недель после иммунизации VNT, индуцированные preF-белком RSV, были значительно ниже по сравнению с Ad26.RSV.preF отдельно, а также были ниже через 9, 11 и 15 недель по сравнению с таковыми при получении смеси 150 мкг белка preF RSV и Ad26.RSV.preF ( $p < 0,05$  для всех, ANOVA с поправкой Даннета для множественного тестирования).

#### Клеточные ответы

F-специфические Т-клеточные ответы в отношении RSV до вакцинации, как правило, были низкими в группах у большинства животных. Между отдельными животными наблюдали большую вариацию специфического в отношении F RSV клеточного ответа (фиг. 20). По сравнению с клеточными ответами до иммунизации, животные, иммунизированные Ad26.RSV.preF отдельно, показали значительно более высокий ответ на 7-й и 9-й неделе ( $p = 0,03$  и  $0,02$ , соответственно, ANOVA с поправкой Бонферрони для множественных сравнений). Более того, со смесью с 50 мкг preF-белка RSV наблюдали значительно более высокий ответ во всех временных точках ( $p = 0,03$ ,  $0,04$ ,  $0,04$ ,  $0,04$  для 2, 7, 9 и 15 недель, соответственно), а со смесью с 15 мкг preF-белка RSV наблюдали значительно более высокий ответ на 2-ой и 9-ой неделе ( $p = 0,0003$  и  $p = 0,0001$ , соответственно). Иммунизация смесью Ad26.RSV.preF и 150 мкг preF-белка RSV или 150 мкг preF-белка RSV отдельно не показала значительного увеличения ответов Т-клеток в любой временной точке. Никаких существенных различий не наблюдали между группой, получавшей Ad26.RSV.preF отдельно, и группами, получавшими комбинацию Ad26.RSV.preF и preF-белка RSV, в любой временной точке (ANOVA с поправкой Даннета для множественного тестирования). Животные, иммунизированные Ad26.RSV.preF отдельно и смесью Ad26.RSV.preF и 150 мкг preF-белка RSV, показали значительно более высокий уровень клеточного ответа по сравнению с животными, иммунизированными 150 мкг preF-белка RSV отдельно, в любой временной точке ( $p \leq 0,05$  для всех).

**Пример 6. Исследование фазы 2b с оценкой эффективности, иммуногенности и безопасности схемы на основе Ad26.RSV.preF в предупреждении опосредованных RSV заболеваний нижних дыхательных путей, подтвержденных RT-PCR, у взрослых в возрасте 65 лет и старше**

Было проведено многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 2b для подтверждения правильности концепции у участников мужского и женского пола в возрасте  $\geq 65$  лет со стабильным состоянием здоровья. Планировали набрать до 5800 участников. Схематический обзор плана исследования и групп представлен ниже.

| Группа   | N <sup>a</sup> | День 1                                                                  |
|----------|----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Группа 1 | 2900           | Ad26.RSV.preF ( $1 \times 10^{11}$ в. ч.) /<br>preF-белок RSV (150 мкг) |
| Группа 2 | 2900           | Плацебо                                                                 |

**Рандомизация.** Участников рандомизировали параллельно в соотношении 1:1 в 1 из 2 групп для получения вакцины Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV или плацебо. Рандомизация будет стратифицирована по возрастным категориям (65-74 года, 75-84 года,  $\geq 85$  лет) и по наличию повышенного риска тяжелого заболевания, обусловленного RSV (да/нет), и будет проводиться блоками для обеспечения баланса между группами.

**Схемы вакцинации/продолжительность исследования.** Скрининг подходящих участников будет проводиться до вакцинации в день 1. Участников будут подвергать последующему наблюдению до конца сезона RSV. Если исследование продолжится после первого сезона RSV (при условии результатов первичного анализа), то продолжительность исследования составит приблизительно 1,6 года.

**Основная анализируемая выборка для оценки эффективности.** Популяция пациентов, выполнивших требования протокола (PPE) для оценки эффективности, будет включать всех рандомизированных и вакцинированных участников, исключая участников с серьезными отклонениями от протокола, которые могут повлиять на результаты эффективности. Любой участник с опосредованной RSV ARI, подтвержденной RT-PCR, с началом в течение 14 дней после вакцинации будет исключен, также как и участники, прекратившие участие в течение 14 дней после вакцинации.

**Первичная конечная точка эффективности.** Три первичные конечные точки эффективности представляют собой первое появление опосредованного RSV LRTD, подтвержденного RT-PCR, в соответствии с каждым из 3 определений случая, представленных в таблице ниже.

| Определение случая № 1                 | Определение случая № 2           | Определение случая № 3                                                                                                  |
|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\geq 3$ симптомов LRTI                | $\geq 2$ симптомов LRTI          | $\geq 2$ симптомов LRTI,<br><i>ИЛИ</i>                                                                                  |
| (новые и ухудшение<br>имеющихся)       | (новые и ухудшение<br>имеющихся) | $\geq 1$ симптома LRTI<br><i>в комбинации с</i><br>$\geq 1$ системным симптомом<br><br>(новые и ухудшение<br>имеющихся) |
| + подтверждение RSV посредством RT-PCR |                                  |                                                                                                                         |

5

LRTI = инфекция нижних дыхательных путей.

Симптомы собирают с помощью RiiQ, опросника ePRO, заполняемого участником на начальном этапе и ежедневно во время ARI, а также с помощью клинической оценки PI, проводимой на начальном этапе и во время визита на 3-5 день на протяжении ARI.

10

Первое возникновение рассматриваемой конечной точки определяют как первый день симптомов первого эпизода ARI, подтвержденной RSV, когда критерии соответствующего определения случая выполняются при по меньшей мере одной оценке рассматриваемого эпизода.

15

3 определения случая, оцененные в данном исследовании, были разработаны для охвата диапазона тяжести заболевания, обусловленного RSV. Наличие комбинации из 3 симптомов инфекции нижних дыхательных путей, аналогичных тем, которые применяли в данном исследовании, было связано с 3-кратным повышением риска тяжелого исхода (Belongia et al., Adult RSV Epidemiology and Outcomes, *OFID*, 2018).

20

## Первичная цель(и)

- Продemonстрировать эффективность активной исследуемой вакцины при предупреждении опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей, подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR), согласно одному из трех определений случая, по сравнению с плацебо.

## Вакцина

Активной исследуемой вакциной была смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV, содержащая:

- Ad26.RSV.preF, неспособный к репликации аденовирус серотипа 26 (Ad26), содержащий транген дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), кодирующий F-белок (pre-F), стабилизированный в конформации "до слияния", полученный из штамма A2 RSV, т. е. F-белок (pre-F), стабилизированный в конформации "до слияния", под SEQ ID NO: 5; и
- preF-белок RSV, F-белок, стабилизированный в конформации "до слияния", полученный из штамма A2 RSV, т. е. preF-белок RSV под SEQ ID NO: 6 или 7.

Вакцину вводили в виде однократной инъекции в дельтовидную мышцу. Объем всех инъекций составлял 1 мл.

- Вводили приведенные ниже дозы.
- Ad26.RSV.preF предоставляли в концентрации  $2 \times 10^{11}$  в. ч. (вирусных частиц)/1 мл в одноразовых флаконах. Применяли уровни дозы  $1 \times 10^{11}$  в. ч.
  - preF-Белок RSV предоставляли в концентрации 0,3 мг/1 мл в одноразовых флаконах. Применяли уровни дозы 150 мкг.
  - Плацебо для Ad26.RSV.preF и preF-белка RSV.

О серьезных неблагоприятных явлениях (SAE) сообщали с момента введения исследуемой вакцины до окончания сезона RSV или через 6 месяцев после него.

## Краткое изложение результатов

- Ниже описаны основные результаты первичного анализа. Представлены неослепленные результаты. Включены данные, полученные до 15 мая 2020 г. Это была дата, когда все участники должны были выполнить звонок, соответствующий окончанию сезона, или прекратить участие в исследовании раньше. Один клинический центр не смог обеспечить сбор данных по окончании сезона, включая SAE, до

окончания сбора базы данных из-за пандемии COVID-19. Кроме того, в связи с участвовавшими случаями заболевания COVID-19 в США, период эпиднадзора в отношении ARI был сокращен с 30 апреля 2020 года до 20 марта 2020 года.

Предусмотренные АЕ (до 7 дней после вакцинации) и непредусмотренные АЕ (до 28 дней после вакцинации) были зарегистрированы в подгруппе из ~700 участников (подгруппа безопасности). У всех участников были зарегистрированы SAE. Данные в отношении гуморальной и клеточной иммуногенности с течением времени собирали для подгруппы из 200 участников (иммуноподгруппа).

Исследование считается успешным, как только будет продемонстрирована эффективность вакцины (VE) хотя бы по одной из первичных конечных точек. Для контроля частоты ложных ответов в отношении множественности применяли способ Спирсона и Дебуа. Если р-значение ниже уровня альфа с поправкой на множественность для по меньшей мере 1 из 3 первичных конечных точек, то подтверждение правильности концепции считается продемонстрированным. Соответственно, если скорректированный на множественность доверительный интервал (CI) превышает 0 для по меньшей мере 1 из 3 первичных конечных точек, то исследование считается успешным.

В общей сложности 6673 участника прошли скрининг в 40 центрах в США. Из них 857 человек не прошли скрининг, 34 человека были рандомизированы и не вакцинированы, а 5782 участника были рандомизированы и вакцинированы (2891 человек в каждой группе). 107 (3,7%) участников в группе активного средства и 100 (3,5%) участников в группе плацебо прекратили исследование, большинство (129 участников) отзывали согласие. Все остальные участники продолжали лечение на момент окончания сбора базы данных. В популяции полного анализа (FA) 57,7% участников были женского пола, и 92,5% представителями европеоидной расы. Средний возраст составил 71 год, в диапазоне от 65 до 98 лет. Средний BMI составил 28,7 кг/м<sup>2</sup>, в диапазоне от 11,7 до 41,1 кг/м<sup>2</sup>. 25,4% участников имели повышенный риск заболевания RSV (уровень риска, указанный в eCRF, с использованием рекомендаций CDC (например, хронические заболевания сердца и легких)), а 26,2% участников были предрасположенными к заболеванию или имели слабое здоровье на исходном уровне. У 92 (3,2%) участников в группе получения вакцины Ad26/preF-белок RSV и у 83 (2,9%) участников в группе получения плацебо наблюдали серьезные отклонения от протокола, повлиявшие на эффективность. Эти участники были исключены из выборки

пациентов, выполнивших требования протокола для оценки эффективности (PPE), основной анализируемой выборки для анализа эффективности.

### Анализ первичной конечной точки

Три первичные конечные точки эффективности представляют собой первое появление опосредованного RSV LRTD, подтвержденного RT-PCR, в соответствии с каждым из трех определений случая, описанных выше.

Данные о симптомах собирали с помощью RiiQ, опросника ePRO, заполняемого участником на начальном этапе и ежедневно на протяжении ARI (острой респираторной инфекции), а также с помощью клинической оценки PI, проводимой на начальном этапе и во время визита на 3-5 день на протяжении ARI. Признаки и симптомы, принятые во внимание при характеристике определения случая, представлены в таблице 1. Подсчет количества новых или ухудшенных имеющихся симптомов проводили за день и за оценку, поэтому клиническая оценка или результат, сообщенный пациентом в электронном дневнике или в электронном устройстве, не объединяли для подсчета.

**Таблица 1. Симптомы инфекции нижних дыхательных путей и системные симптомы согласно RiiQ или клинической оценке**

| Симптомы по определению случая |                            | Термин RiiQ                  | Термин клинической оценки (клинический визит на 3-5 день при ARI)                     |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Симптомы LRTI</b>           | Кашель                     | Кашель                       | Кашель                                                                                |
| 0                              | Сбивчивое дыхание          | Затруднение дыхания          | Одышка или снижение степени насыщения кислородом                                      |
| 0                              | Выделение мокроты          | Откашливание слизи (мокроты) | Выделение мокроты                                                                     |
| 0                              | Бронхо-легочная обструкция | Бронхо-легочная обструкция   | Бронхо-легочная обструкция или хрипящие звуки, хрипы или другие признаки консолидации |
|                                | Учащенное дыхание          |                              | Учащенное дыхание                                                                     |
| <b>Системные симптомы</b>      | Усталость                  | Усталость (утомляемость)     | Недомогание (утомляемость)                                                            |
| 0                              | Лихорадка                  |                              | Лихорадка                                                                             |
| 0                              | Лихорадочное состояние     | Чувство жара или лихорадка*  |                                                                                       |

LRTI = инфекция нижних дыхательных путей, RiiQ = опросник по интенсивности и

воздействию респираторных инфекций.

\*Лихорадка, определенная на основании данных о ежедневной температуре, полученных от участников в электронном дневнике.

Первое возникновение рассматриваемой конечной точки определяют как первый день симптомов первого эпизода ARI, подтвержденной RSV, когда критерии соответствующего определения случая выполняются при по меньшей мере одной оценке рассматриваемого эпизода. Для первичного анализа учитывают только эпизоды, происходящие в течение первого сезона у участника.

Для каждой из 3 первичных конечных точек будет выполнено следующее: точная регрессия Пуассона будет подобрана с частотой явлений, определяемой как количество случаев за время последующего наблюдения (смещение) в качестве зависимой переменной, а группа вакцинации, возраст и наличие повышенного риска тяжелого заболевания, обусловленного RSV (обе стратифицированы) в качестве независимых переменных.

Основной анализируемой выборкой для оценки эффективности является выборка PPE, которая включает всех рандомизированных и вакцинированных участников, исключая участников с серьезными отклонениями от протокола, которые могли бы повлиять на результаты эффективности. Любой участник с опосредованной RSV ARI, подтвержденной RT-PCR, с началом в течение 14 дней после вакцинации будет исключен, также как и участники, прекратившие участие в течение 14 дней после вакцинации.

Исследование считали успешным, как только продемонстрирована эффективность вакцины (VE) хотя бы по одной из первичных конечных точек. Для контроля частоты ложных ответов в отношении множественности применяли способ Списсенса и Дебуа.

Точное одностороннее р-значение из описанной выше регрессии Пуассона, соответствующее группе вакцинации, будет сравниваться с альфа-уровнем с поправкой на множественность. Если р-значение ниже порогового для по меньшей мере одной из трех первичных конечных точек, то подтверждение правильности концепции считается продемонстрированным. Соответственно, если скорректированный на множественность доверительный интервал (CI) превышает 0 для по меньшей мере одной из трех первичных конечных точек, то исследование считается успешным.

### **Первичный анализ эффективности**

Результаты первичного анализа представлены в таблице 2 и на фигуре 21.

Значимость показана для всех трех первичных конечных точек.



**Таблица 2. Первичный анализ эффективности. Процент участников с опосредованным RSV LRTD, подтвержденным RT PCR, в соответствии с каждым из 3 определений случая и эффективности вакцины при их первом появлении; выборка пациентов, выполнивших требования протокола для оценки эффективности (исследование VAC18193RSV2001)**

|                                                                                                            | Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV |               | Эффективность вакцины (94,211% CI) | p-значение | $\alpha$ -уровень |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------|------------------------------------|------------|-------------------|
|                                                                                                            | n (%)                                       | Плацебо n (%) |                                    |            |                   |
| <b>Анализируемая выборка: выборка пациентов, выполнивших требования протокола для оценки эффективности</b> | 2791                                        | 2801          |                                    |            |                   |
| <b>Определение случая 1</b>                                                                                | 6 (0,2%)                                    | 30 (1,1%)     | 80,0 (52,2, 92,9)                  | 0,00004    | 0,02895           |
| <b>Определение случая 2</b>                                                                                | 10 (0,4%)                                   | 40 (1,4%)     | 75,0 (50,1, 88,5)                  | 0,00001    | 0,02895           |
| <b>Определение случая 3</b>                                                                                | 13 (0,5%)                                   | 43 (1,5%)     | 69,8 (43,7, 84,7)                  | 0,00004    | 0,02895           |

**Определение случая 1:**  $\geq 3$  симптомов LRTI + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.  
**Определение случая 2:**  $\geq 2$  симптомов LRTI + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.  
**Определение случая 3:**  $\geq 2$  симптомов LRTI или  $\geq 1$  симптома LRTI в сочетании с  $\geq 1$  системным симптомом + подтверждение RSV с помощью RT-PCR.  
 Р-значение и эффективность вакцины рассчитывали на основе точной регрессии Пуассона с частотой явлений, определяемой как число случаев за время последующего наблюдения (смещение) в качестве зависимой переменной, а также группой вакцинации и возрастом, а также с повышенным риском тяжелого ARI, обусловленной RSV (обе стратифицированные), как независимые переменные.  $\alpha$ -Уровень корректировали для учета нескольких конечных точек.  
 Включены все данные в отношении субъектов до 15 мая 2020 г.

### Анализ в отношении чувствительности

Проводили ряд анализов в отношении чувствительности. Каждый анализ в отношении чувствительности подразумевал изменение одной из характеристик, использованных для первичного анализа (популяция, модель, зависимая переменная, независимые переменные и т. д.).

Результаты анализа в отношении чувствительности представлены на фигуре 22 для определения случая 1. В целом, результаты анализа в отношении чувствительности соответствуют результатам первичного анализа: точечные оценки и доверительные интервалы аналогичны, за исключением анализа в отношении чувствительности для CD1 с использованием только клинических оценок (нижняя граница VE ниже 0%) и

для CD1 без учета кашля (нижняя граница VE 15,3%), что может быть объяснено низким количеством наблюдаемых явлений. Для CD2 и CD3 наблюдали большее количество явлений при анализе в отношении чувствительности с использованием только клинических оценок и без учета кашля, и результаты соответствуют результатам первичного анализа для этих определений случая.

### **Результаты, о которых сообщают пациенты**

#### **RiiQ (опросник по интенсивности и воздействию респираторных инфекций)**

Участников опрашивали в отношении наличия у них в течение последних 24 часов

каких-либо из следующих симптомов: кашель, боль в горле, головная боль, заложенность носа, чувство озноба, ломота и боли в теле, усталость, боль в шее, прерывистый сон, откашливание слизи (мокроты), затруднение дыхания или потеря аппетита.

В шкале симптомов RiiQ каждый симптом оценивали по следующей шкале:

0 = нет, 1 = легкий, 2 = умеренный и 3 = сильный. На основании этого опросника подсчитывали общие показатели за определенный период времени.

- Общий показатель респираторных и системных симптомов по RiiQ в каждой временной точке оценивали как среднее значение показателей по всем симптомам (2 симптома URTI, 4 симптома LRTI и 7 системных симптомов).
- Общий показатель симптомов по определению случая по RiiQ оценивали в каждой временной точке как среднее значение 4 симптомов LRTI (кашель, бронхо-легочная обструкция, сбивчивое дыхание и откашливание слизи/мокроты) и 2 системных симптомов, используемых в определениях случая, усталость и чувство озноба.

Шкала влияния на ежедневную активность по RiiQ (вопрос 2, приложение 1) состоит из 7 видов деятельности. Способность выполнять каждый пункт деятельности оценивали по следующей шкале: 0 = нет сложности, 1 = небольшая сложность, 2 = умеренная сложность и 3 = значительная сложность. Общий показатель влияния на ежедневную активность по RiiQ рассчитывали как среднее значение всех 7 пунктов (диапазон 0-3).

Для вышеуказанных показателей, полученных при подтвержденных с помощью RT-PCR ARI, опосредованных RSV, рассчитаны AUC, которые представлены в виде коробчатых диаграмм на фигуре 23. Из данных видно, что у участников с подтвержденным с помощью RT-PCR ARI, обусловленной RSV, медиана (Q1; Q3) AUC

общего показателя респираторных и системных симптомов по шкале RiiQ составила 39 (11; 74) в группе получения вакцины на основе смеси Ad26/preF-белок RSV по сравнению со 128 (58; 242) в группе плацебо. В отношении AUC общего показателя симптомов по RiiQ для симптомов, включенных в CD (показатель RiiQ CD), медианы (Q1; Q3) составляли соответственно 53 (10; 108) и 171 (79; 317). В отношении оценки влияния на ежедневную активность по RiiQ медиана (Q1; Q3) AUC составляла 5 (0; 13) и 4 (0; 48). Более низкие значения AUC указывают на менее тяжелое заболевание (т. е. симптомы более сопоставимы с исходными). Эти данные подтверждают, что при заражении RSV у людей, получивших вакцину на основе смеси Ad26/preF-белок, наблюдают менее тяжелые симптомы по сравнению с людьми, получившими плацебо.

### **Показатели общего клинического впечатления (PGI)**

Опросники по PGI собирали ежедневно на протяжении ARI и использовали для оценки общего состояния здоровья участников.

Участников опрашивали на предмет того, вернулись ли они к своему обычному состоянию здоровья после появления симптомов, указывающих на ARI. Вычисления по способу Каплана-Мейера в отношении числа дней, которые потребовались участнику для возвращения к своему обычному состоянию здоровья, показаны на фигуре 24. Важно отметить, что из этих данных видно, что участники группы получения вакцины на основе смеси Ad26/preF-белок RSV быстрее возвращаются к своему обычному состоянию здоровья по сравнению с получающими плацебо, что подчеркивает положительное влияние вакцины на течение заболевания, обусловленного RSV (медиана времени возвращения к обычному состоянию здоровья: группа получения вакцины на основе смеси Ad26/белок RSV: 19 дней; плацебо: 30 дней).

### **Иммуногенность**

Данные в отношении гуморальной и клеточной иммуногенности с течением времени собирали для подгруппы из 200 участников (иммуноподгруппа). Соотношение рандомизации в иммуноподгруппе также составляло 1:1. В таблице 4 приведена сводная информация об иммуногенности, наблюдаемой в группе получения вакцины на основе смеси Ad26/preF-белок RSV. Анализ проводили в отношении выборки пациентов, выполнивших требования протокола для оценки иммуногенности.

**Таблица 4. Обзор иммуногенности; выборка пациентов, выполнивших требования протокола для оценки иммуногенности**

| Анализ                   | Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV (N=97) |                      |                      |
|--------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                          | Исходный уровень                                   | День 15              | День 169             |
| VNA A2 GMT (95% CI)      | 542 (457; 643)                                     | 7244 (5889; 8912)    | 3057 (2523; 3703)    |
| VNA B GMT (95% CI)       | 4079 (3501; 4752)                                  | 38006 (31693; 45577) | 17362 (14768; 20413) |
| Медиана ELISpot (Q1, Q3) | 34 (34; 76)                                        | 444 (279; 641)       | 201 (123; 324)       |

Таким образом, вакцина по настоящему изобретению вызывает надежные и длительные гуморальный и клеточный иммунные ответы.

## 5 Безопасность

Предусмотренные АЕ (до 7 дней после вакцинации) и непредусмотренные АЕ (до 28 дней после вакцинации) были зарегистрированы в подгруппе из ~700 участников (подгруппа безопасности). У всех участников были зарегистрированы SAE. В таблице 5 представлен обзор безопасности, о которой сообщалось в заблокированной базе данных.

В общей популяции до момента окончания сбора базы данных 132 (4,6%) и 136 (4,7%) участников испытывали по меньшей мере одно серьезное неблагоприятное явление в группе, получавшей вакцину на основе смеси Ad26/preF-белок RSV, и в группе плацебо, соответственно. Случаев смерти и серьезных неблагоприятных явлений, которые исследователи считали бы связанными с вакцинацией, не наблюдали.

**Таблица 5. Сводная информация о безопасности; полная анализируемая выборка**

|                                                                                          | Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV |         | Плацебо    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|------------|
|                                                                                          | n (%)                                       | N = 348 | n (%)      |
| <b>Предусмотренные АЕ (подгруппа для оценки безопасности, 7 дней после вакцинации):</b>  |                                             |         | N = 347    |
| Участники, имеющие 1 или более из:                                                       |                                             |         |            |
| предусмотренных АЕ                                                                       | 179 (51,4%)                                 |         | 70 (20,2%) |
| предусмотренных АЕ по меньшей мере 3-й степени тяжести                                   | 11 (3,2%)                                   |         | 2 (0,6%)   |
| предусмотренных местных АЕ                                                               | 132 (37,9%)                                 |         | 29 (8,4%)  |
| предусмотренных местных АЕ по меньшей мере 3-й степени тяжести                           | 6 (1,7%)                                    |         | 1 (0,3%)   |
| предусмотренных системных АЕ                                                             | 144 (41,4%)                                 |         | 57 (16,4%) |
| предусмотренных системных АЕ по меньшей мере 3-й степени тяжести                         | 7 (2,0%)                                    |         | 1 (0,3%)   |
| <b>Предусмотренные АЕ (подгруппа для оценки безопасности, 28 дней после вакцинации):</b> |                                             | N = 348 | N = 347    |
| Участники, имеющие 1 или более из:                                                       |                                             |         |            |
| <b>непредусмотренных АЕ</b>                                                              | 58 (16,7%)                                  |         | 50 (14,4%) |
| непредусмотренных АЕ по меньшей мере 3-й степени тяжести                                 | 6 (1,7%)                                    |         | 5 (1,4%)   |

|                                                                                         | Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV |  | Плацебо    |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--|------------|--|
|                                                                                         | n (%)                                       |  | n (%)      |  |
| непредусмотренных АЕ, предположительно связанных с исследуемой вакциной                 | 18 (5,2%)                                   |  | 8 (2,3%)   |  |
| <b>SAE и АЕ, приведшие к прекращению исследования (все участники, все исследование)</b> | N = 2891                                    |  | N = 2891   |  |
| Участники, имеющие 1 или более из:                                                      |                                             |  |            |  |
| SAE                                                                                     | 132 (4,6%)                                  |  | 136 (4,7%) |  |
| SAE, предположительно связанных с исследуемой вакциной                                  | 0                                           |  | 0          |  |
| АЕ с летальным исходом                                                                  | 8 (0,3%)                                    |  | 12 (0,4%)  |  |
| АЕ с летальным исходом, предположительно связанных с исследуемой вакциной               | 0                                           |  | 0          |  |
| АЕ, приведших к окончательному прекращению исследования                                 | 10 (0,3%)                                   |  | 15 (0,5%)* |  |

\*: для 2 участников группы получения плацебо с летальным АЕ в базе данных АЕ еще не указано, что это АЕ привело к прекращению лечения.

- 5 Таким образом, было показано, что комбинированная вакцина по настоящему изобретению имеет приемлемый профиль безопасности.

10 Как описано, в данном исследовании оценивают схему вакцины, выбранную в фазе 1/2a исследования VAC18193RSV1004, которая состоит из смеси Ad26.RSV.preF ( $1 \times 10^{11}$  в. ч.) и preF-белка RSV (150 мкг) (Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV), вводимой в виде одной инъекции. Первичный анализ после первого сезона RSV был завершен, а последующее наблюдение за участниками в течение второго сезона RSV продолжается.

15 Таким образом, в данном исследовании имеется когорта недавней ревакцинации, включенная на 365-й день, в которой в общей сложности около 240 участников получили смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV на 365-й день. Половина участников этой когорты ревакцинации была взята из активной части исследования, в которой субъекты получали вакцину на основе смеси Ad26/preF-белок RSV в день 1, а другая половина взята из группы плацебо. В этой когорте вызванные вакциной иммунные ответы после ревакцинации через 12 месяцев после получения вакцины на основе смеси Ad26/preF-белок RSV будут изучены после ревакцинации через 1 год.

20 Гуморальную иммуногенность в этой когорте будут оценивать по сыворотке крови, собранной на 1-й день, 14-й день, 28-й день, 3-й месяц, 6-й месяц и 12-й месяц после первой вакцинации и ревакцинации через 12 месяцев. Из последних данных указанной когорты ревакцинации видно, что гуморальные иммунные ответы (preF согласно ELISA, postF согласно ELISA и VNA\_A2) все еще были значительно выше

(приблизительно в 4 раза), чем таковые на исходном уровне как через 14, так и через 28 дней после ревакцинации. Через 15 дней после ревакцинации средние геометрические титров VNA\_A2 и pre-F согласно ELISA увеличились менее чем в 2 раза по сравнению с показателями до ревакцинации и оставались примерно в 2,5-2,7 раза ниже по сравнению со средними геометрическими титров (GMT) через 15 дней после первой вакцинации (фигура 29 и фигура 30). Эти данные дополнительно подтверждают результаты гуморальной иммуногенности ревакцинации через 12 месяцев в когорте 3 препарата SR1004 (фигура 26 и фигура 27).

#### **Пример 7. Фаза 1/2а исследования VAC18193RSV1004. Продолжительность иммунных ответов и иммуногенность после ревакцинации**

Продолжительность иммунных ответов, вызванных вакциной, и иммунные ответы после ревакцинации оценивали в текущей фазе 1/2а исследования VAC18193RSV1004 среди взрослых участников в возрасте 60 лет и старше, имеющих стабильное состояние здоровья.

План исследования включает 3 последовательные когорты: начальную когорту безопасности (когорта 1 с общим числом участников 64) для схемы вакцины, содержащей preF-белок RSV, когорту выбора схемы (когорта 2 с общим числом участников 288) и расширенную когорту безопасности (когорта 3 с общим числом участников 315).

Долгосрочную продолжительность гуморального и клеточного иммунного ответа после однократной иммунизации оценивали в 2 группах когорты 2, которые получали смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV в дозе  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг (группа 14) и  $5 \times 10^{10}$  в. ч./150 мкг (группа 15). Кинетику гуморального и клеточного иммунного ответа оценивали в этих группах путем анализа образцов, собранных через 14 дней, 28 дней, 56 дней, 26 недель, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев и 36 месяцев после вакцинации.

На фигуре 25 показаны данные в отношении иммуногенности группы получения смеси Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV, получавшей смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV ( $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг) (группа 14) до 18 месяцев после вакцинации. Гуморальный иммунный ответ, оцененный с помощью pre-F согласно ELISA и анализа нейтрализации вируса против A2 RSV (VNA A2), достигал пика примерно через 15 дней после первой вакцинации (~13-кратное превышение исходного уровня), затем снижался и достигал плато через 1 год, оставаясь ~4-кратно выше исходного уровня до 1,5 года относительно последней анализируемой временной точки. Клеточные

иммунные ответы, измеренные с помощью способа иммуноферментных пятен специфического в отношении F RSV интерферона (IFN) $\gamma$  (ELISpot), имели аналогичную кинетику.

В когорте 3 (расширенная когорта безопасности) оценивали иммуногенность после ревакцинации. В общей сложности 270 участников получали смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV в концентрации  $1 \times 10^{11}$  в. ч./150 мкг (Ad26.RSV.preF/preF белок RSV) в день 1. Половина участников получала дополнительную вакцинацию на 12-м и 24-м месяце, в то время как другая половина получала дополнительную вакцинацию только на 24-м месяце (см. таблицу 1).

**Таблица 1. План исследования VAC18193RSV1004. Расширенная когорта (когорта 3)**

| Группа                  | N          | День 1                                                              | 12-й месяц                                                          | 24-й месяц                                                           |
|-------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 19                      | 135        | Смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг | Смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг | Смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг  |
| 20                      | 135        | Смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг | Плацебо                                                             | Смесь Ad26.RSV.preF/preF-белок RSV $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг* |
| 21                      | 45         | Плацебо                                                             | Плацебо                                                             | Плацебо                                                              |
| <b>Общее количество</b> | <b>315</b> |                                                                     |                                                                     |                                                                      |

N = количество участников; в. ч.=вирусные частицы.

\* В настоящее время рассматривается поправка к протоколу, предусматривающая добавление этой ревакцинации.

При таком плане исследования в когорте 3 будет изучена продолжительность иммунных ответов, вызванных вакциной смесью Ad26/preF-белок RSV, как при ежегодной ревакцинации на 1-ом и 2-ом году, так и при ревакцинации на 2-ом году. Кроме того, кинетика клеточных иммунных ответов будет доступна в подгруппе (n=63) этих участников (рандомизация 2:2:1).

Кинетику иммунного ответа будут анализировать в течение 3 лет у всех участников.

Следует отметить, что кинетика иммунных ответов в течение 3 лет без ревакцинации будет доступна для группы 14 в когорте 2.

По последним данным когорты 3 оценивают иммунные ответы в группах активной вакцины с ревакцинацией и без нее на 12-м месяце, причем данные были доступны до 28 дней после ревакцинации на 12-м месяце (393-й день). Во время ревакцинации на 12-м месяце гуморальный и клеточный иммунные ответы все еще были значительно выше (примерно в 4 раза), чем таковые на исходном уровне. Через 28 дней после ревакцинации средние геометрические титров VNA A2 и pre-F согласно ELISA

увеличились соответственно в 1,4 и 2,0 раза по сравнению с показателями до ревакцинации и достигали уровней, в 4-5 раз превышающих исходный уровень, но оставались примерно в 2 раза ниже по сравнению со средними геометрическими титров (GMT) через 28 дней после первой вакцинации (фигура 26 и фигура 27). Клеточный

5 иммунный ответ, измеренный с помощью IFN $\gamma$  согласно ELISpot, увеличивался в 2,5 раза через 28 дней после ревакцинации на 12-м месяце по сравнению с уровнем до ревакцинации, достигнув уровня, сравнимого с уровнем через 28 дней после первой вакцинации (фигура 28, только для участников с данными за 393 день). Корреляции между нейтрализующими Ad26 антителами, измеренными до первой вакцинации или

10 до ревакцинации на 365-й день, и иммунными ответами, вызванными после вакцинации или ревакцинации (preF согласно ELISA, postF согласно ELISA, VNA\_A2 и IFN $\gamma$  согласно ELISPOT), соответственно, не наблюдали.



## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKKNCNGTDAK  
 5 IKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLLGVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQ  
 KNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV  
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT  
 PSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTV  
 10 SVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVSTTNI  
 MITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**SEQ ID NO: 2 (домен тримеризации)**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

15

**SEQ ID NO: 3 (линкер)**

SAIG

**SEQ ID NO: 4 (вставка Ad26.preF)**

20 ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGC  
 CAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAACC  
 GGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAGAAATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAA  
 GTGAAGCTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACC  
 CCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTTCATGAAGTACACCCCTGAACAACGCCAAAAAGACC  
 25 AACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTGCTGGGCTTCTGCTGGGCGTGGGCTCTGCCATTGCTAGC  
 GGAGTGGCCGTGTCTAAAGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGAGCGCCCTGCTGAGCACCAAC  
 AAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAAGTACATCGAC  
 AAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAG  
 AAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAACGCTGGCGTGACCACCCCCGTGTCCACCTAC  
 30 ATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGC  
 AACACGTGCAGATCGTGCAGCAGAGCTACTCCATCATGTCCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTG  
 GTGCAGCTGCCCCGTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAAC  
 ACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCA  
 TTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTG  
 35 CCCTCCGAAGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACC  
 GACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGACCGCCAGC  
 AACAGAACCAGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTG  
 TCCGTGGGCAACACCTGTACTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATC  
 AACTTCTACGACCCCTGGTGTTCAGCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAAC  
 40 CAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAATGTGAATGCCGTGAAGTCCACCACCAATATC  
 ATGATCACCAACATCATCATCGTGATCATTGTGATCCTGCTGAGCCTGATCGCCGTGGGCTGCTGCTGTACTGC

AAGGCCAGATCCACCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAACTGATAA

**SEQ ID NO: 5, F-белок RSV, кодируемый Ad26.preF**

5 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEIKCNGTDAK  
VKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRFLPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLLGVGSAIAS  
GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVQSCSIPNIETVIEFQQ  
KNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV  
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL  
10 PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTV  
SVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTNI  
MITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIAFSN\*\*

**SEQ ID NO: 6, растворимый preF-белок RSV (предшественник, т. е. не процессированный)**

15 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEIKCNG  
TDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRFLPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRL  
GFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPV  
NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN  
VQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNA  
20 GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
YGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP  
SNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

Сигнальный пептид: подчеркнут дважды

25 Антиген: без подчеркивания

**SEQ ID NO: 7, растворимый preF-белок RSV, процессированный**

QNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKY  
30 KNAVTELQLLMQSTPATNNRARRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALL  
STNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEIT  
REFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEE  
VLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQ  
AETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIV  
35 SCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGE  
PIINFYDPLVFPNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**SEQ ID NO: 8, нуклеотидная последовательность, кодирующая preF-белок RSV**

atggaactgctgatcctgaaggccaacgccatcaccaccatcctgaccgccgtgaccttctgctttgccagcgccagaacat

caccgaggagttctacca

gagcacctgtagcgccgtgtccaagggtacctgagcgccctgagaaccggctggtacaccagcgtgatcaccatcgagctga

5 gcaacatcaaagaaat

caagtgaacggcaccgacgccaaagtgaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagaatgccgtgaccgaactgcagc

tgctgatgcagagca

ccccgccaccaacaacggggccagaagagaactgcccagattcatgaactacaccctgaacaacgccccaaaagaccaacgtg

acctgagcaagaa

10 gcggaagcggcggttctctgggctttctgctgggagtggaagcgccattgctagcggagtgccgtgtctaaggtgctgcacc

tggaaaggcgaagtga

caagatcaagtcgccctgctgagcaccaacaaggccgtggtgtctctgagcaacggcgtgtccgtgctgaccagcaaggtgc

tggatctgaagaactac

atcgacaaacagctgctgcccatcgtgaacaagcagagctgcagcatccccaacatcgagacagtgatcgagttccagcagaa

15 gaacaacggctgctg

gaaatcaccgcgagttcagcgtgaacgctggcgtgaccacccccgtgtccacctacatgctgaccaacagcgagctgctgtc

cctgatcaacgacatgc

ccatcaccaacgaccagaaaaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcccagcagagctactccatcatgagcattatc

aaagaagaggtgctgg

20 cctacgtgggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccctgctggaagctgcacaccagccctctgtgcaccaccaac

accaagagggcgagca

acatctgcctgaccggacggacagaggtggtactgcgataatgccggctccgtctcattctttccacaagccgagacatgc

aaggtgcagagcaaccg

ggtgttctgcgacaccatgaacagcctgaccctgccctccgaagtgaatctgtgcaacgtggacatcttcaaccctaagtacg

25 actgcaagatcatgacctc

caagaccgacgtgtccagctccgtgatcacaagcctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgccagca

acaagaaccggggca

tcataagaccttcagcaacggctgcgactacgtgtccaacaaggggtggacaccgtgtctgtgggcaacacccctgtactac

gtgaacaaacaggaagg

30 caagagcctgtacgtgaagggcgagcccatcatcaacttctacgacccctgggtgttcccagcaacgagttcgacgccagca

tcagccaagtgaacgag

aagatcaaccagagcctggccttcatcagaaagtccgatgagctgctgagcgccatcggcggctacatccctgaggccctag

agatggccaggccctatg tgcggaaggacggcgaaatgggtgctgctgtctaccttccctgtga

35 Сигнальный пептид: подчеркнут дважды

Антиген: без подчеркивания

**SEQ ID NO: 9 (5'-концевые нуклеотиды рекомбинантных аденовирусных векторов)**

СТАТСТАТ

40

**SEQ ID NO: 10 (5'-концевые нуклеотиды исходных аденовирусных векторов)**

САТСАТСА

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции защитного иммунного ответа против респираторно-синцитиальной вирусной (RSV) инфекции у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту комбинации, содержащей
  - (a) эффективное количество первого иммуногенного компонента, содержащего аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", причем предпочтительно эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу; и
  - (b) эффективное количество второго иммуногенного компонента, содержащего растворимый F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", причем предпочтительно эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу,где предпочтительно (a) и (b) вводят совместно.
2. Способ по п. 1, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации и предусматривает делецию в по меньшей мере одном из аденовирусного раннего участка 1 (участка E1) и раннего участка 3 (участка E3).
3. Способ по п. 2, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad26, предусматривающий делецию участка E1 и участка E3.
4. Способ по п. 2, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad35, предусматривающий делецию участка E1 и участка E3.
5. Способ по любому из пп. 1-4, где рекомбинантный F-белок RSV, кодируемый аденовирусным вектором, имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4.
- 5 7. Способ по любому из пп. 1-6, где растворимый F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 7.
- 10 8. Способ по любому из пп. 1-7, где растворимый F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", закодирован нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 8.
- 15 9. Способ по любому из пп. 1-8, где эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.
- 10 10. Способ по любому из пп. 1-9, где эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет приблизительно 150 мкг F-белка RSV на дозу.
- 20 11. Способ по любому из пп. 1-10, дополнительно включающий введение субъекту
  - (с) эффективного количества первого иммуногенного компонента, причем предпочтительно эффективное количество составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу; и
  - (d) эффективного количества второго иммуногенного компонента, причем предпочтительно эффективное количество составляет от приблизительно 30 мкг до
  - 25 приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу,
 после первоначального введения.
- 30 12. Способ по любому из пп. 1-11, где субъект является восприимчивым к RSV-инфекции.
13. Способ по любому из пп. 1-12, где возраст субъекта составляет больше 60 лет или равен 60 годам, предпочтительно больше 65 лет или равен 65 годам.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где защитный иммунный ответ характеризуется предупреждением или уменьшением степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR).
- 5
15. Способ по любому из пп. 1-14, где защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта при воздействии RSV.
- 10
16. Способ по любому из пп. 1-15, где защитный иммунный ответ характеризуется отсутствием или уменьшением степени проявления клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.
- 15
17. Способ по любому из пп. 1-16, где защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых в период от по меньшей мере 15 до 169 дней после введения иммуногенных компонентов.
- 20
18. Способ безопасного предупреждения инфицирования и/или репликации RSV у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий профилактическое введение внутримышечно субъекту комбинации, содержащей
  - (a) эффективное количество первого иммуногенного компонента, составляющее от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на дозу аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, где аденовирусный вектор является неспособным к репликации; и
  - (b) эффективное количество второго иммуногенного компонента, составляющее от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг на дозу F-белка RSV, имеющего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 7,
- 25
- 30 где (a) и (b) вводят совместно.
19. Способ по п. 18, где аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор на основе Ad26, предусматривающий делецию участка E1 и участка E3.

20. Способ по п. 18 или п. 19, где эффективное количество первого иммуногенного компонента составляет приблизительно  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу.

5

21. Способ по любому из пп. 18-20, где эффективное количество второго иммуногенного компонента составляет приблизительно 150 мкг F-белка RSV на дозу.

10 22. Способ по любому из пп. 18-21, дополнительно включающий введение субъекту  
(с) эффективного количества первого иммуногенного компонента, составляющего от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу; и  
(d) эффективного количества второго иммуногенного компонента, составляющего от  
15 приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу, после первоначального введения.

23. Способ по любому из пп. 18-22, где субъект является восприимчивым к RSV-инфекции.

20

24. Способ по любому из пп. 18-23, где возраст субъекта составляет больше 60 лет или равен 60 годам.

25 25. Способ по любому из пп. 18-24, где предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуется предупреждением или уменьшением степени проявления опосредованного RSV заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (RT PCR).

30 26. Способ по любому из пп. 18-25, где предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или снижением вирусной нагрузки, обусловленной RSV, в носовом ходу и/или легких субъекта.

27. Способ по любому из пп. 18-26, где предупреждение инфицирования и/или репликации RSV характеризуется отсутствием или уменьшением степени проявления клинического симптома, вызванного RSV, у субъекта при воздействии RSV.

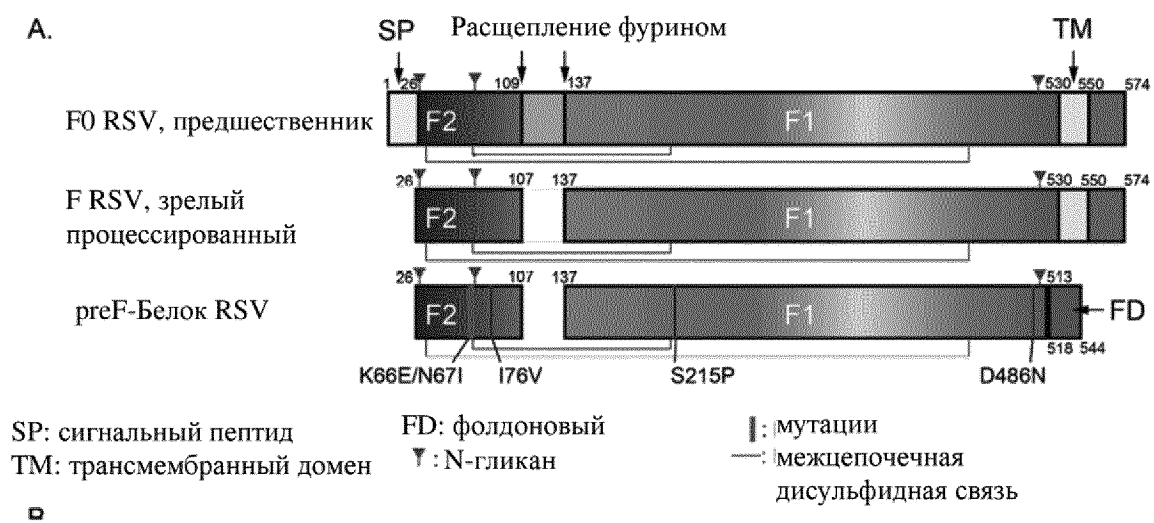
5

28. Способ по любому из пп. 18-27, где защитный иммунный ответ характеризуется наличием нейтрализующих антител к RSV и/или защитного иммунитета против RSV, предпочтительно выявляемых в период от по меньшей мере 15 до 169 дней после введения иммуногенных компонентов.

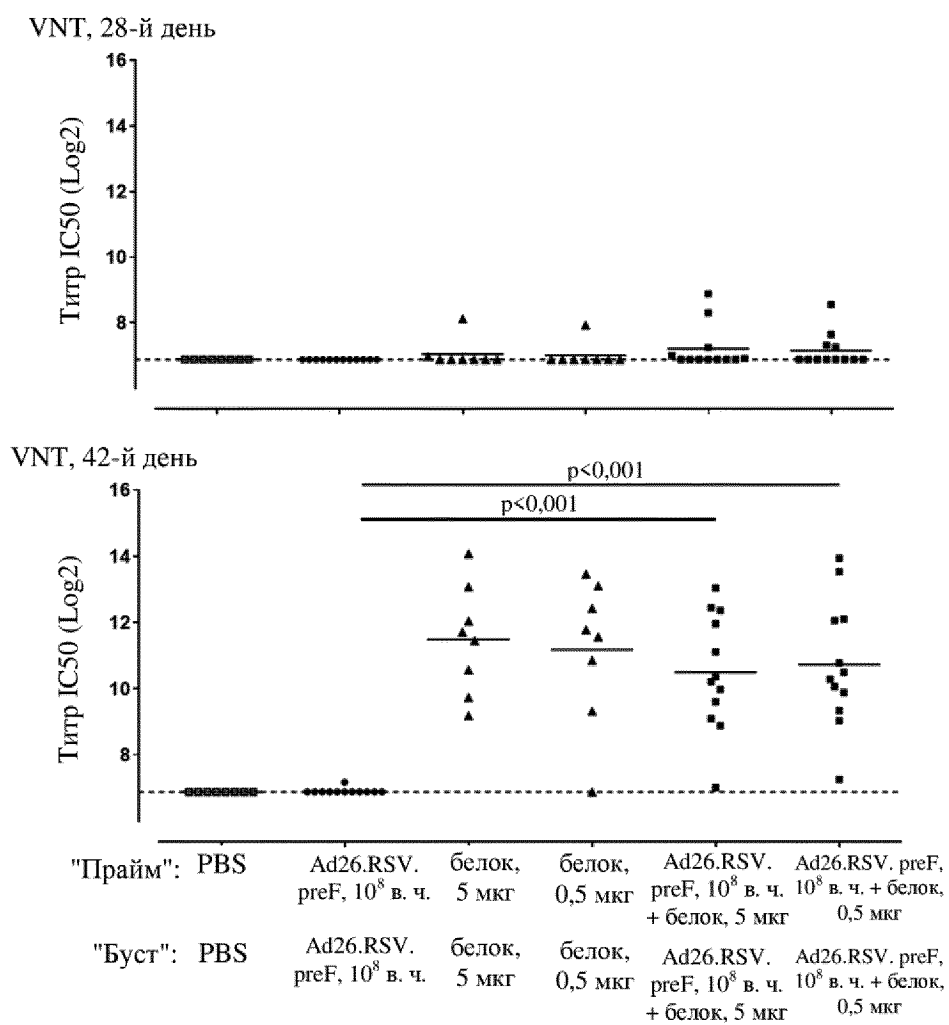
10

29. Иммуногенная комбинация, содержащая (а) первый иммуногенный компонент, содержащий аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", и (b) второй иммуногенный компонент, содержащий растворимый F-белок RSV, который стабилизирован в конформации "до слияния", для одновременного, 15  
отдельного или последовательного применения для индукции защитного иммунного ответа против RSV-инфекции у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем предпочтительно первый и второй иммуногенные компоненты вводятся совместно, более предпочтительно, первый иммуногенный компонент 20  
вводится в эффективном количестве, составляющем от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц аденовирусного вектора на дозу, а второй иммуногенный компонент вводится в эффективном количестве, составляющем от приблизительно 30 мкг до приблизительно 300 мкг F-белка RSV на дозу.

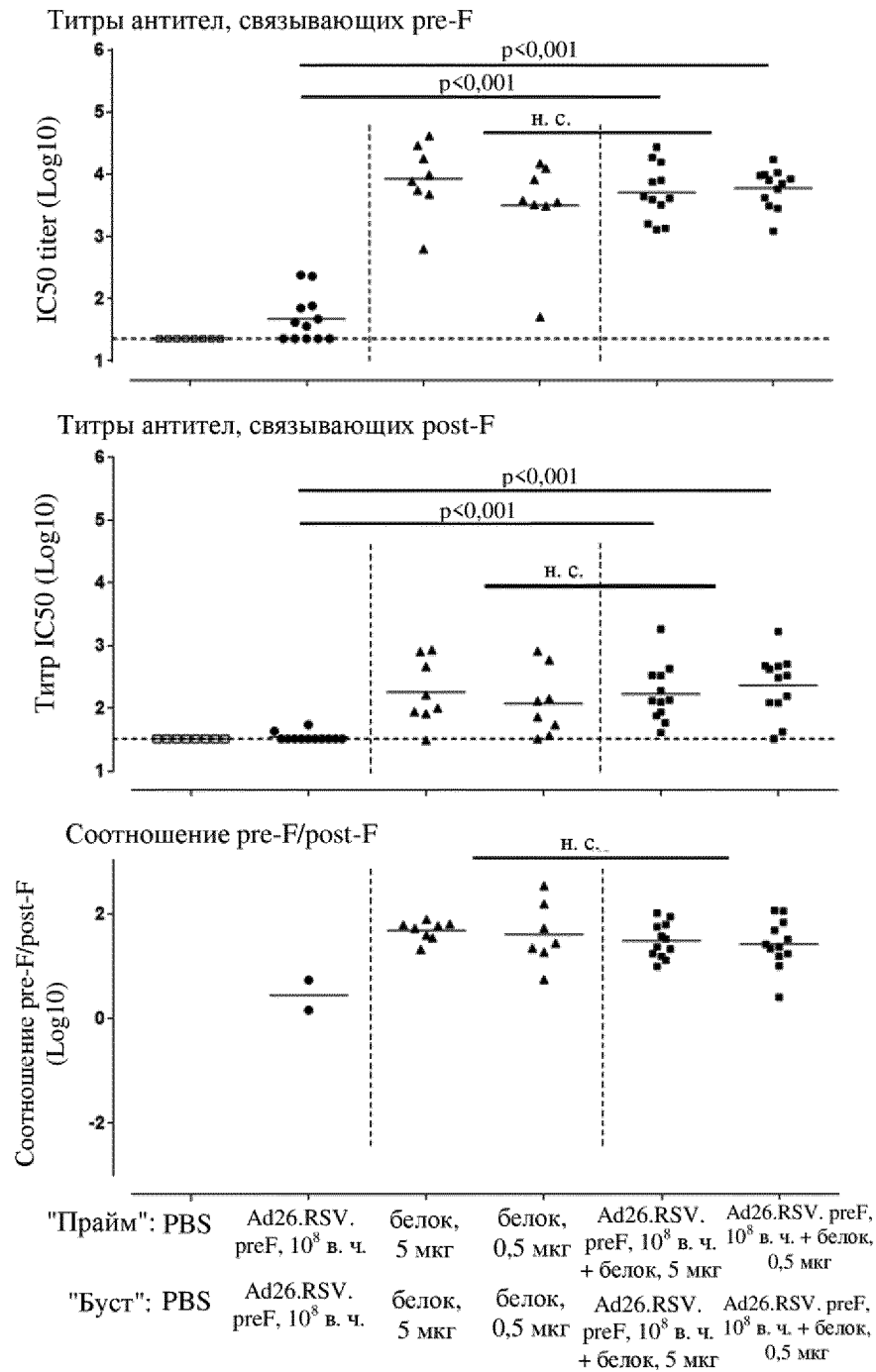




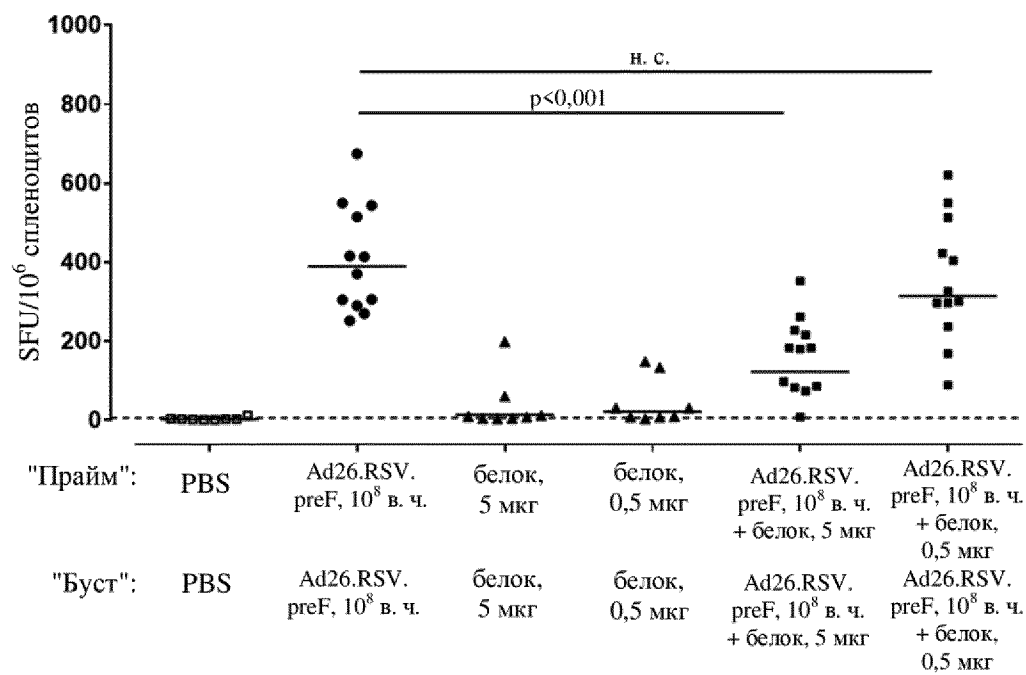
ФИГ. 1



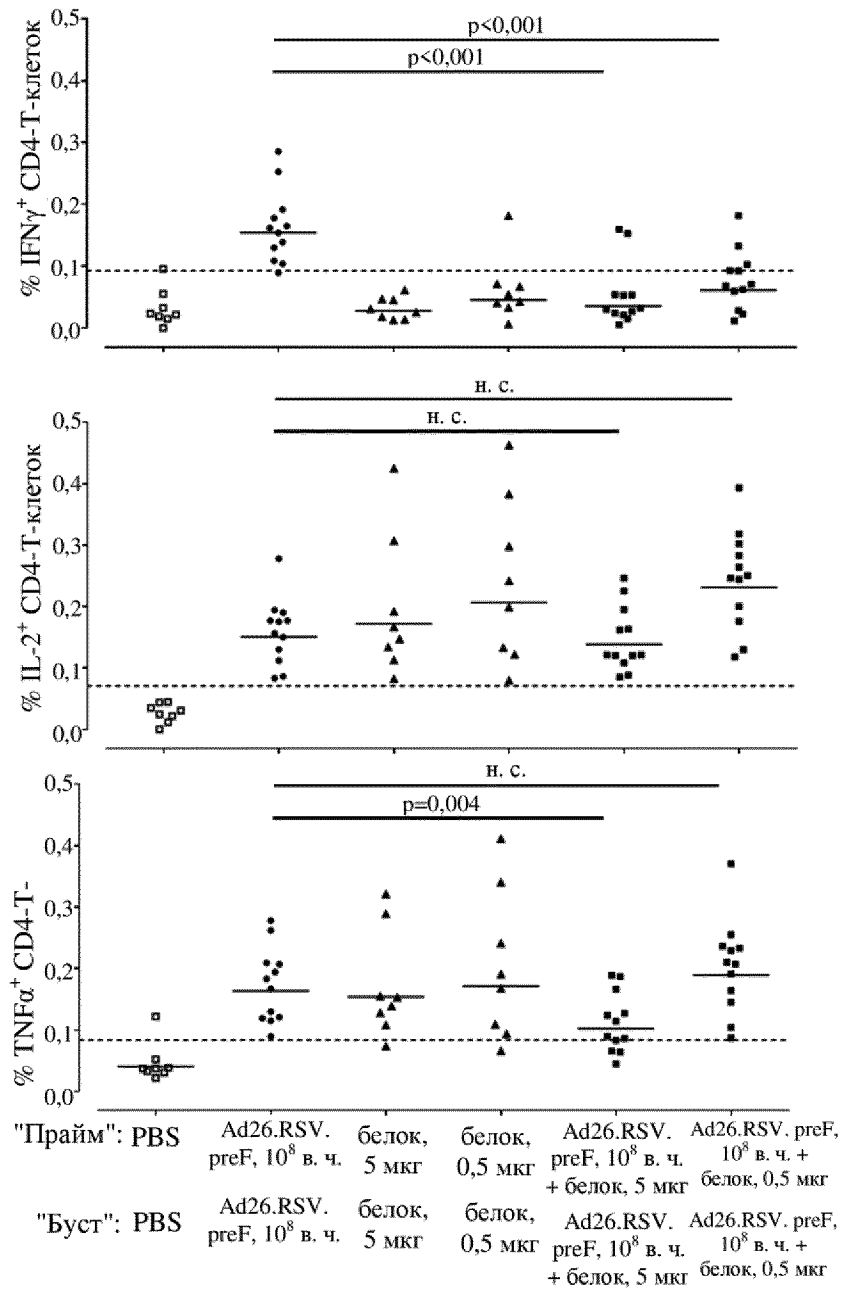
ФИГ. 2



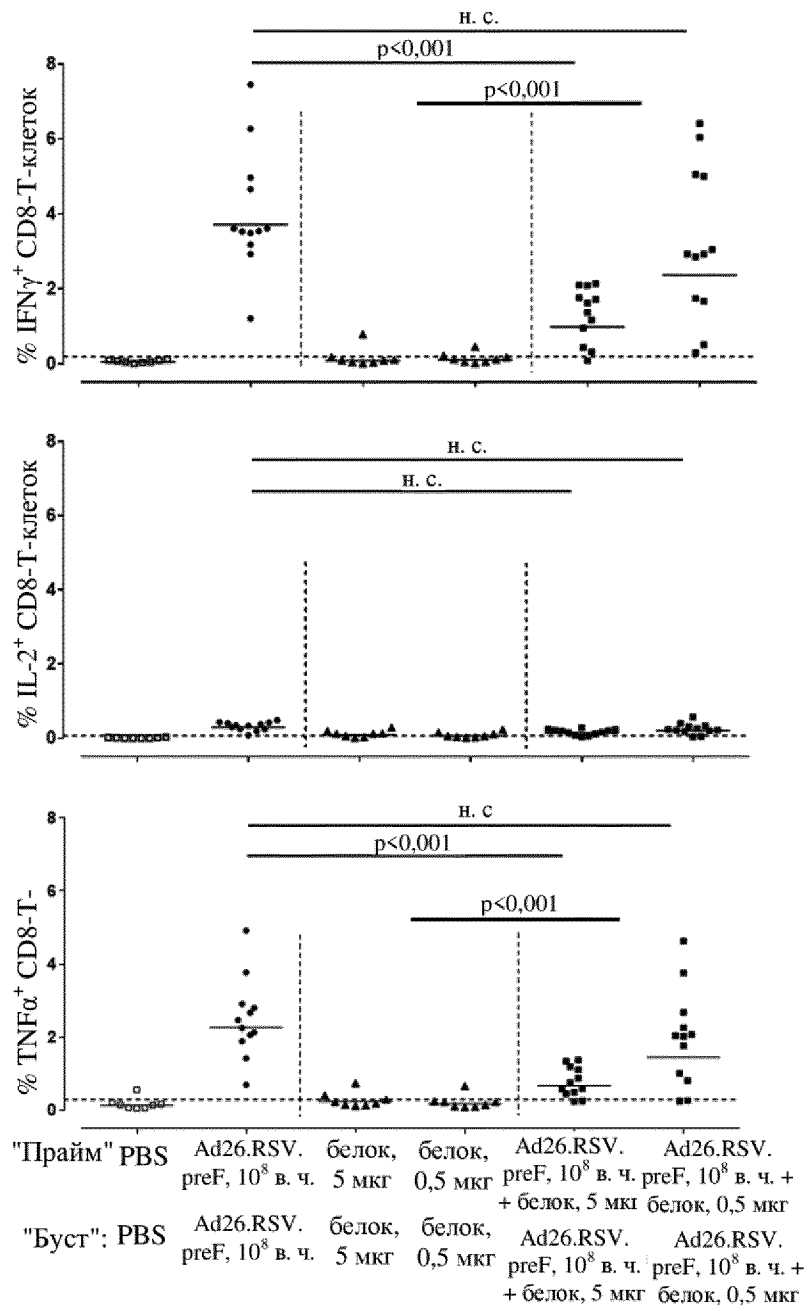
ФИГ 3



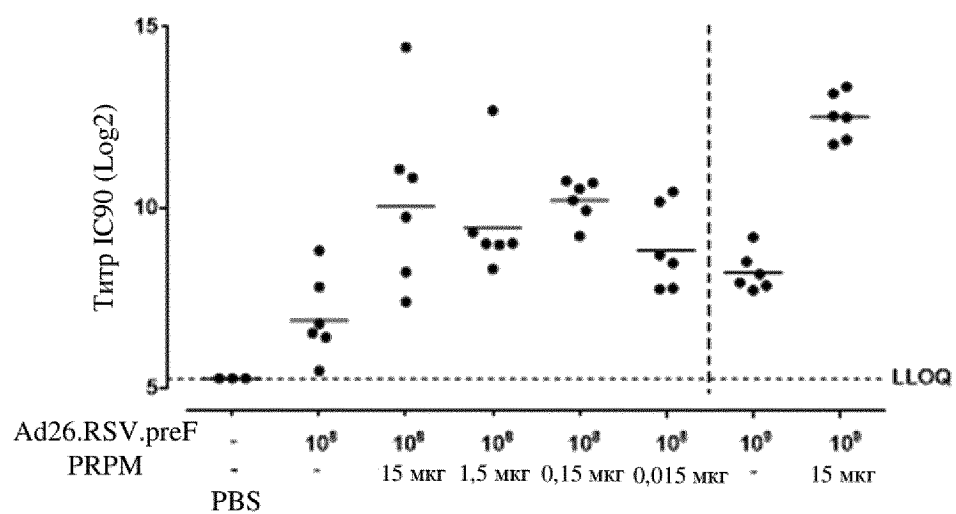
ФИГ. 4



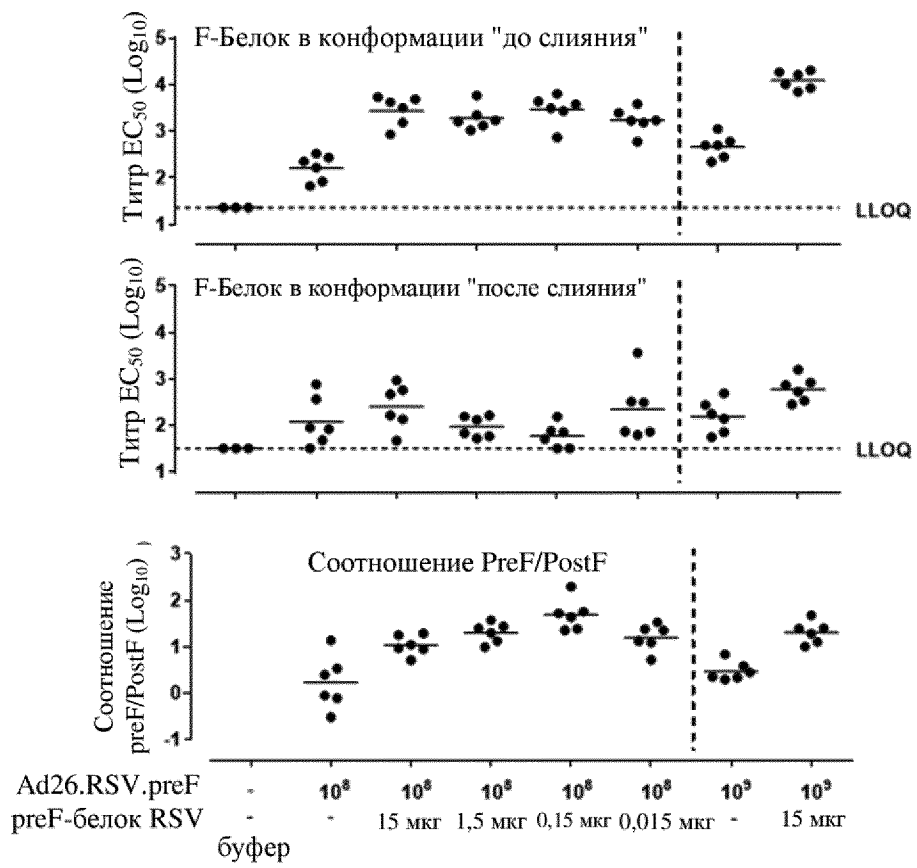
ФИГ. 5



ФИГ. 6

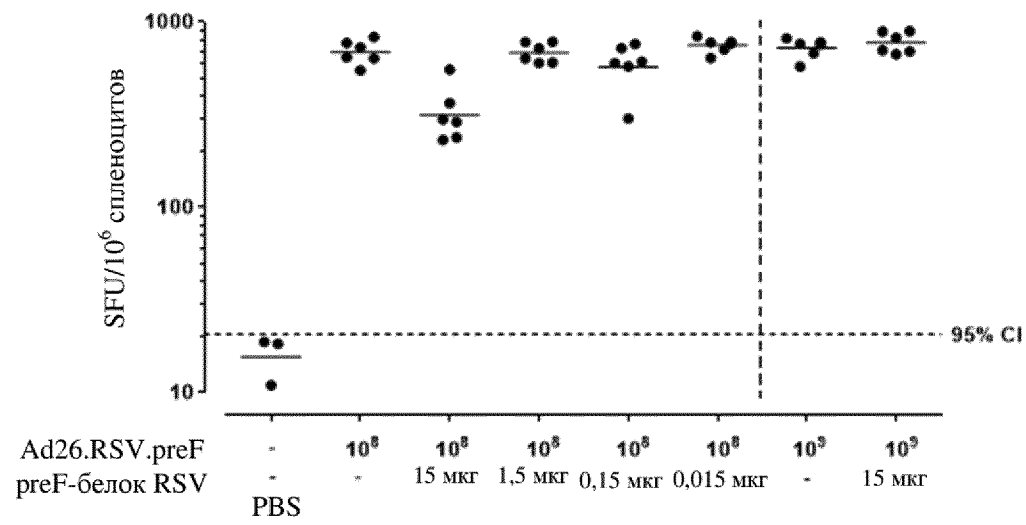


ФИГ. 7

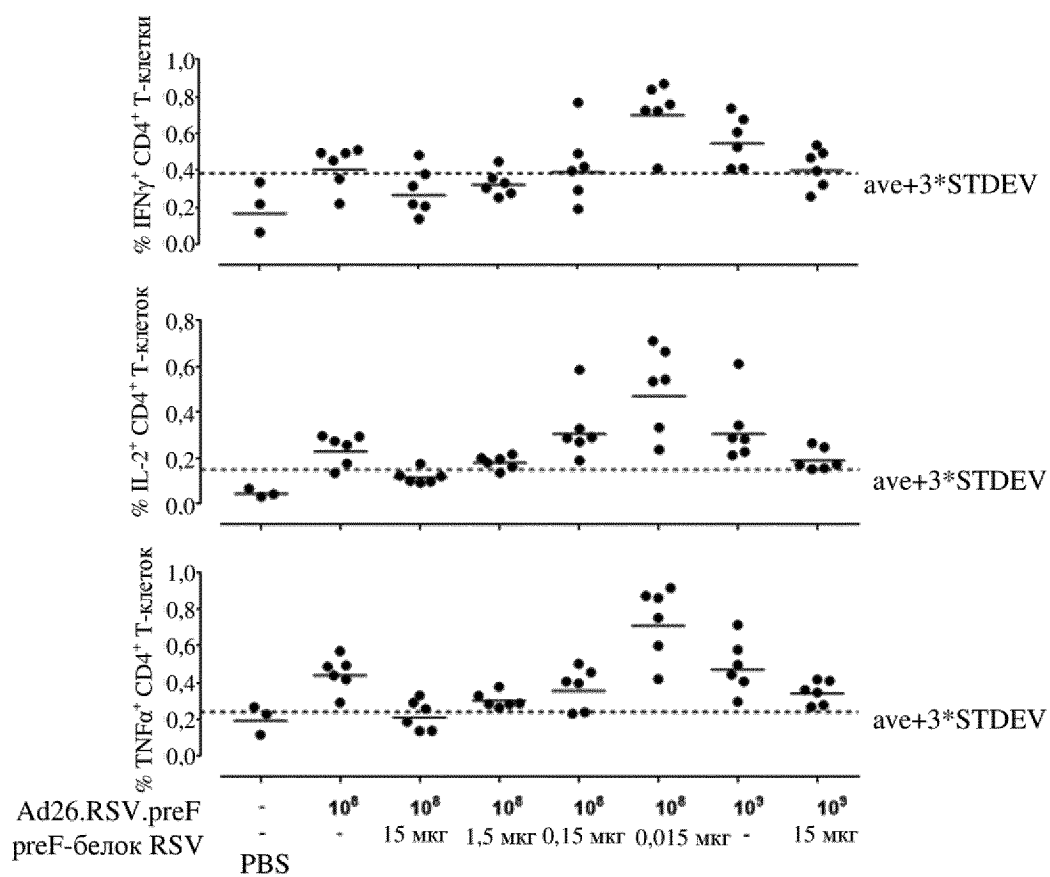


ФИГ. 8

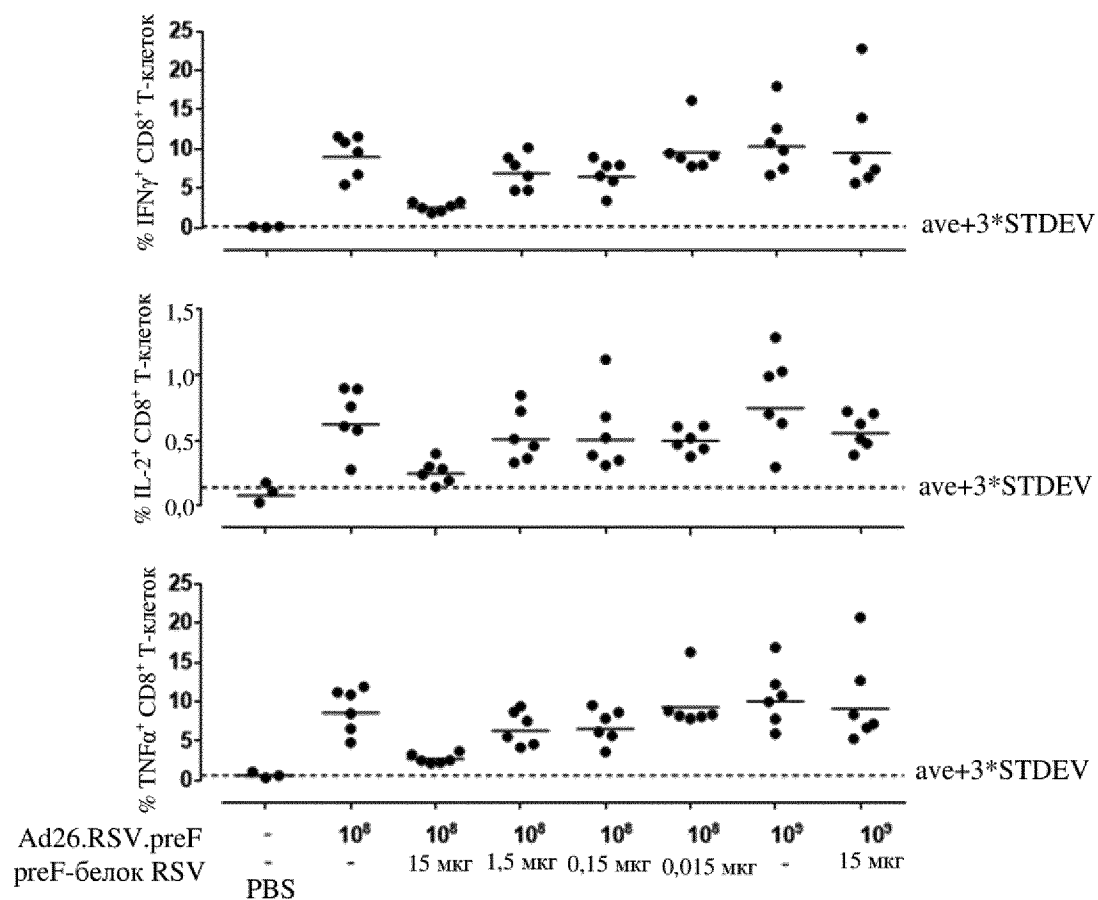




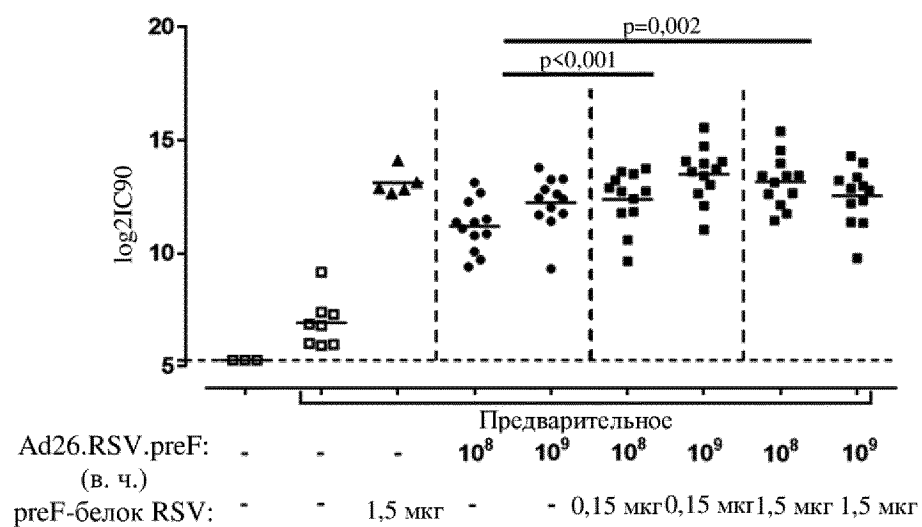
Фиг. 9



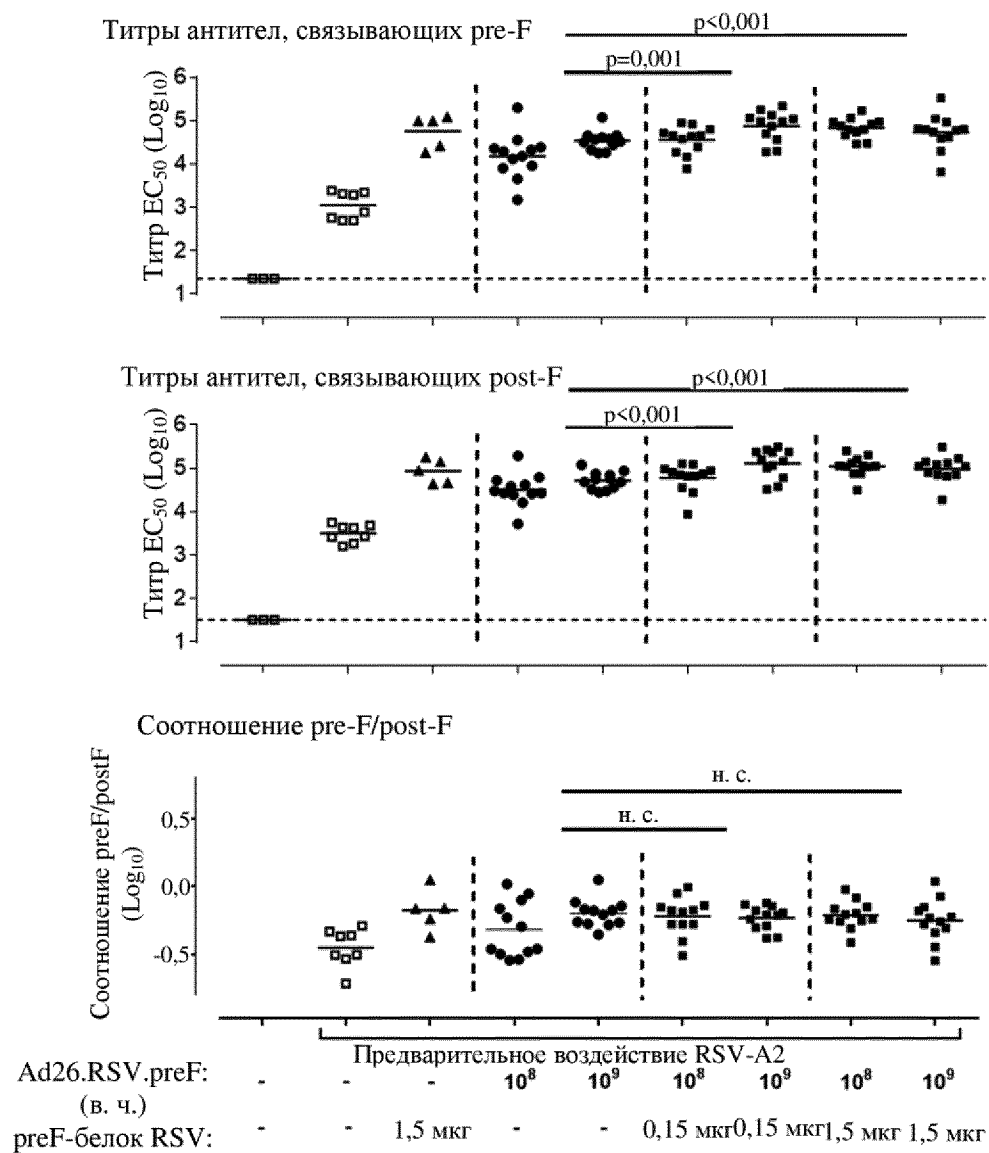
ФИГ. 10



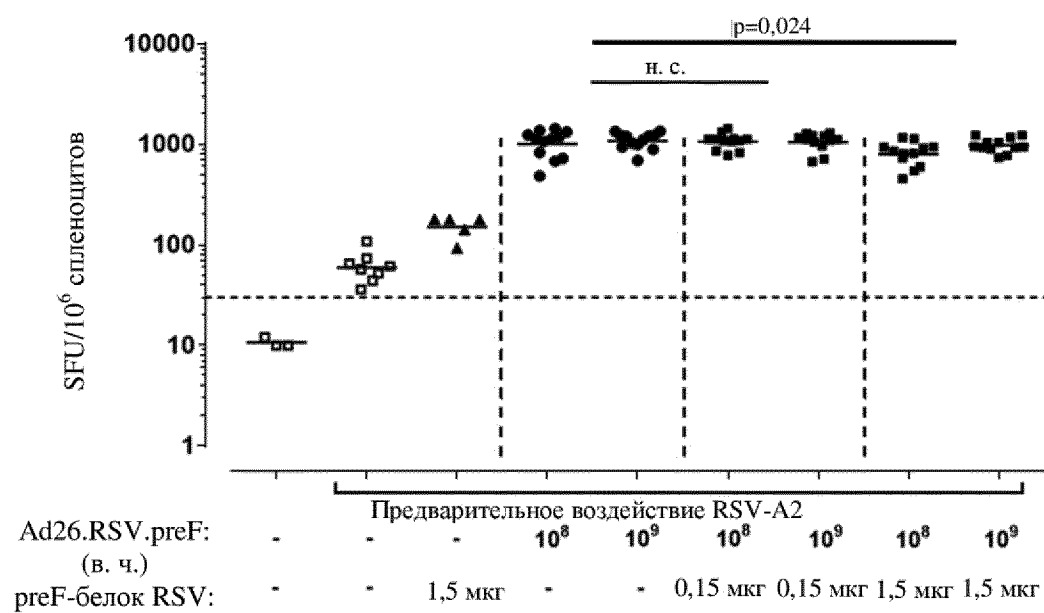
ФИГ. 11



ФИГ. 12

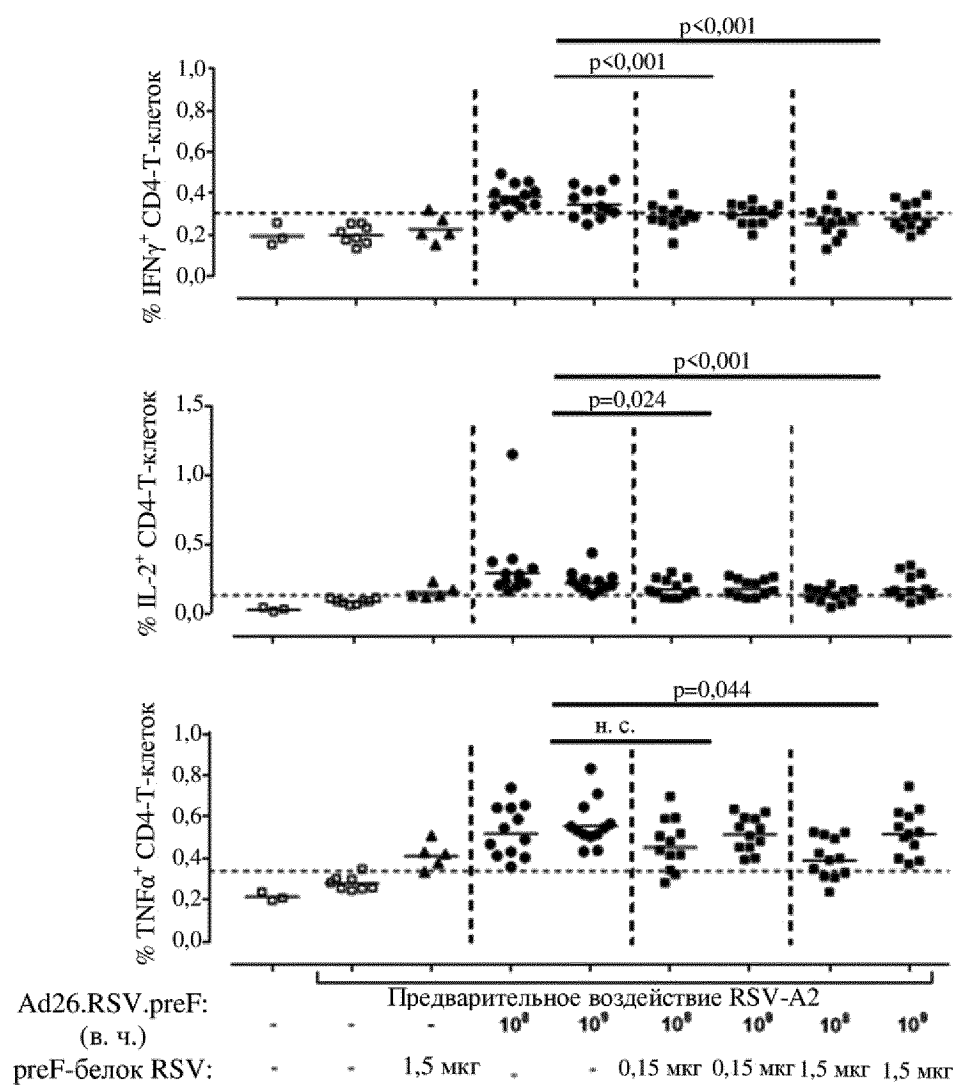


ФИГ. 13



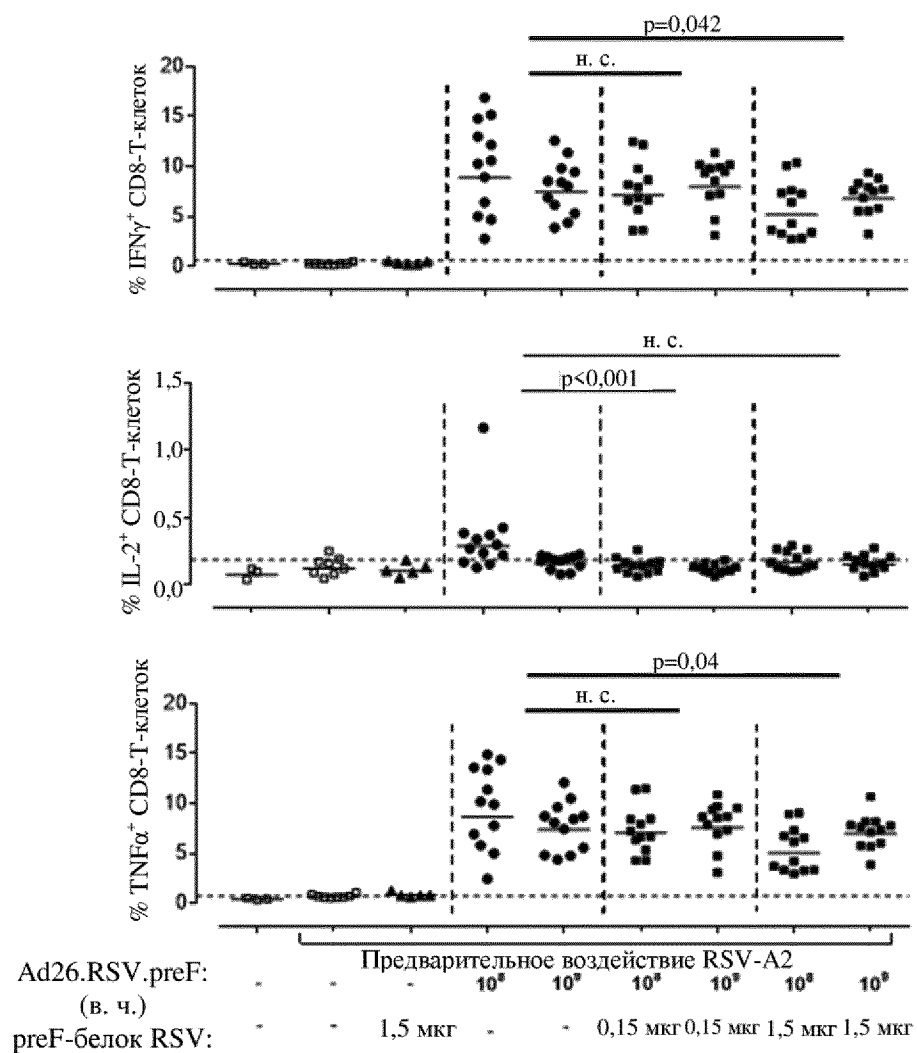
ФИГ. 14

## CD4+



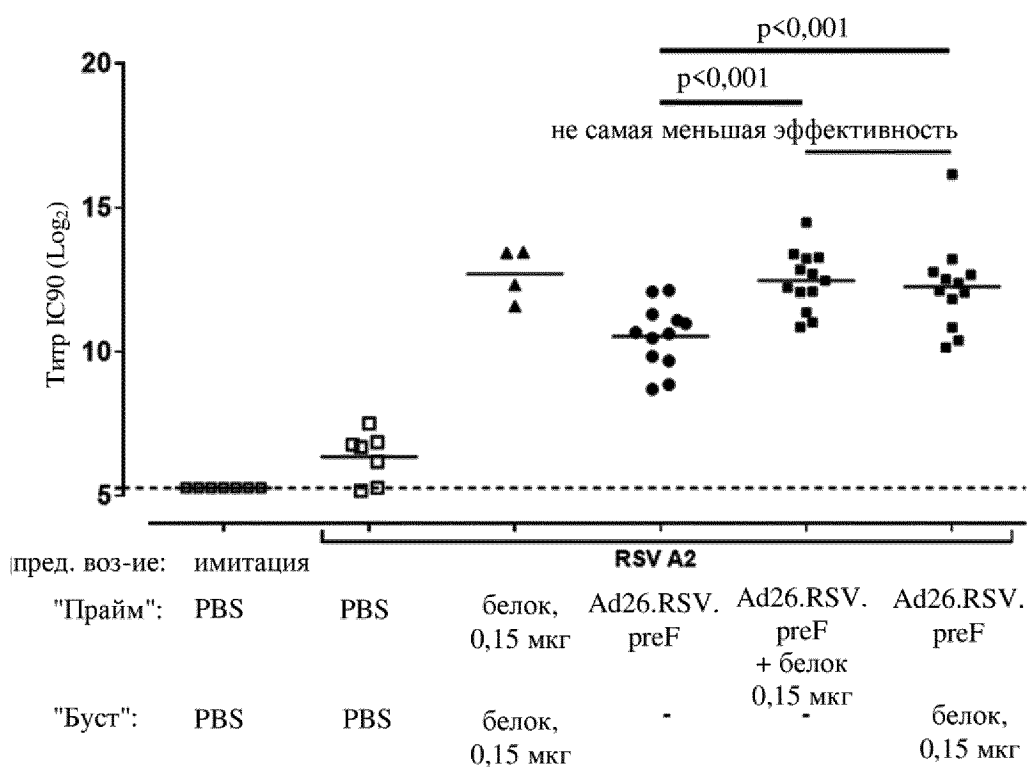
ФИГ. 15А

## CD8+

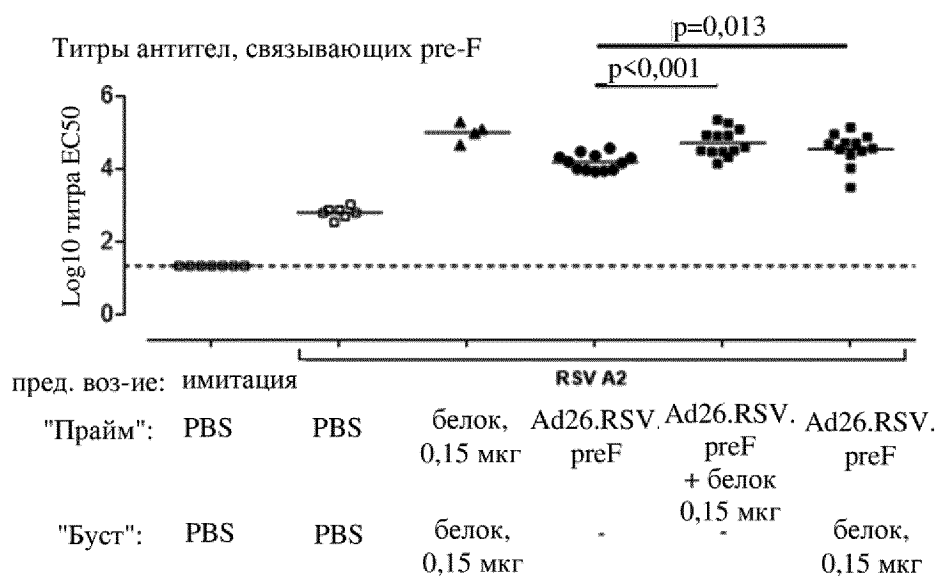


ФИГ. 15В

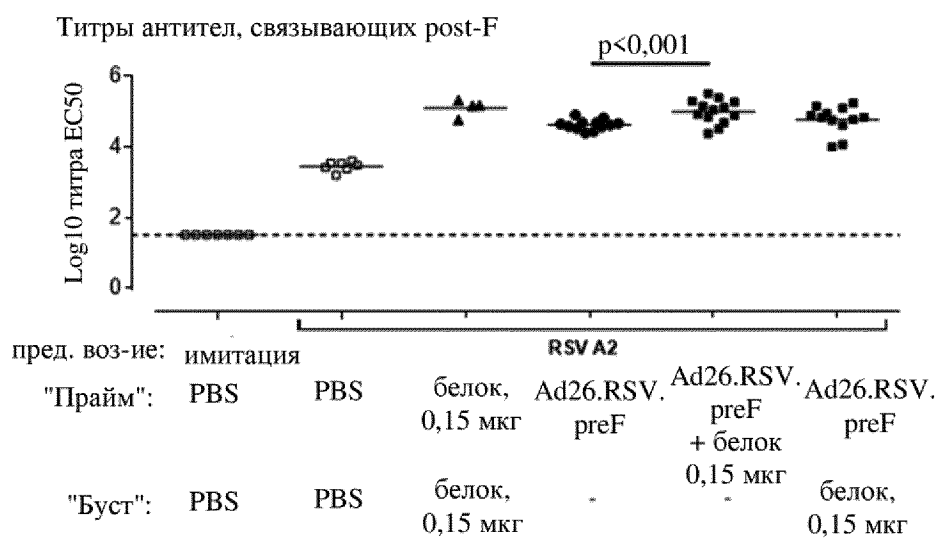




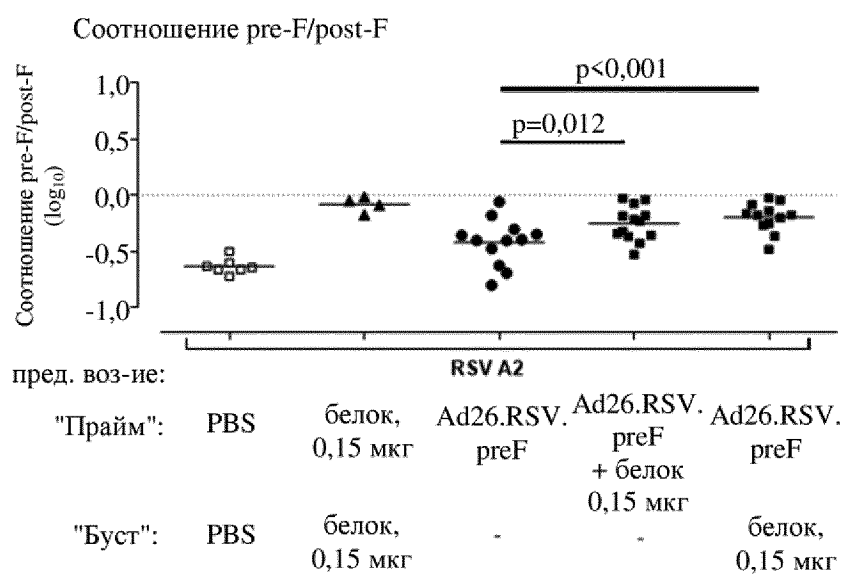
ФИГ. 16



ФИГ.17А

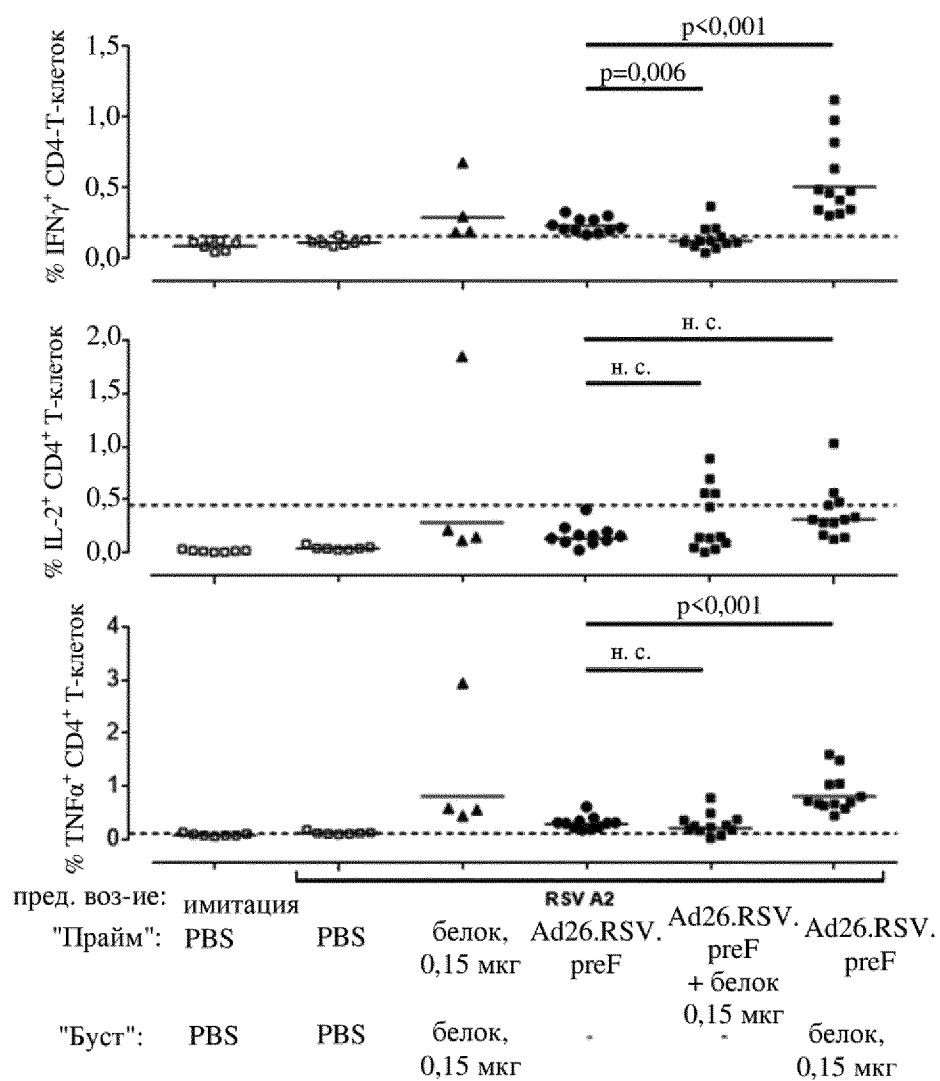


ФИГ.17В



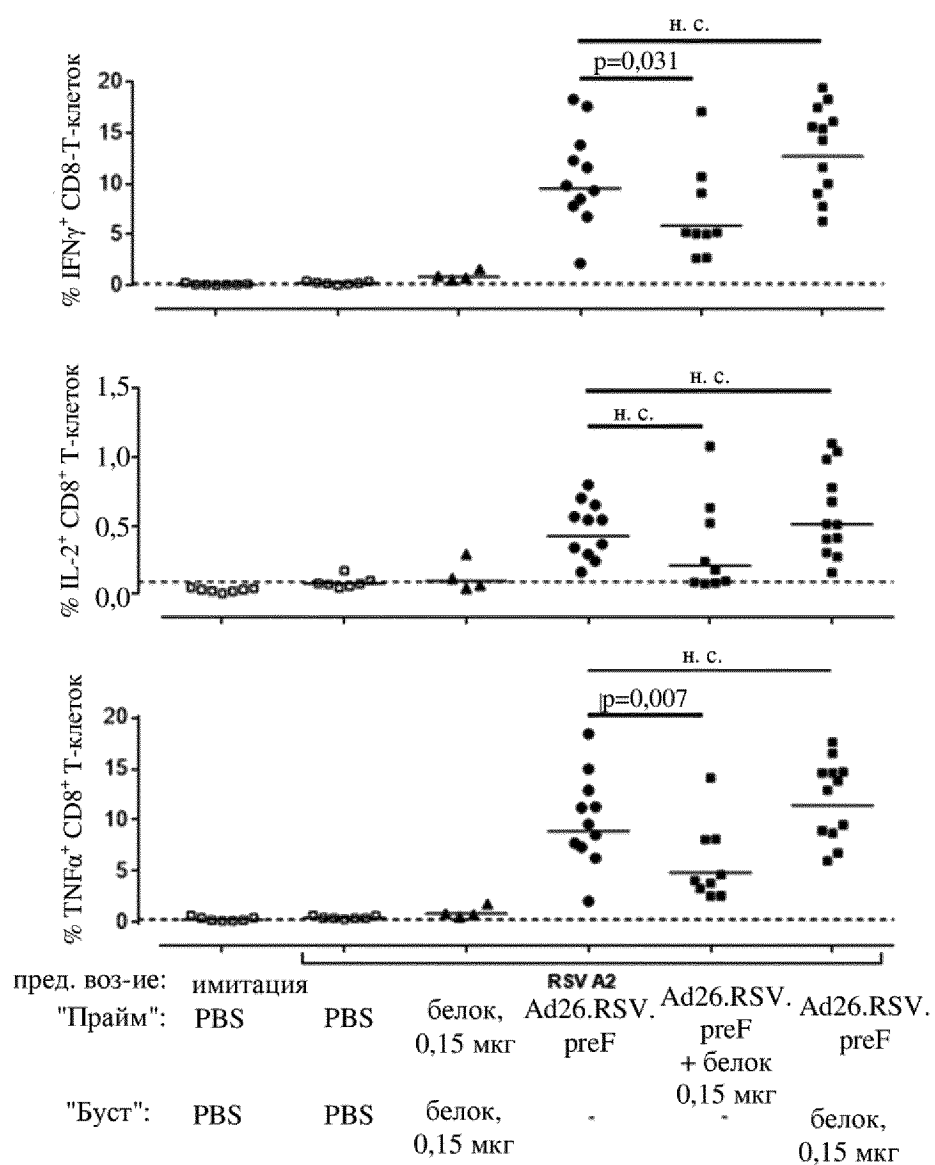
ФИГ. 17С

## CD4+

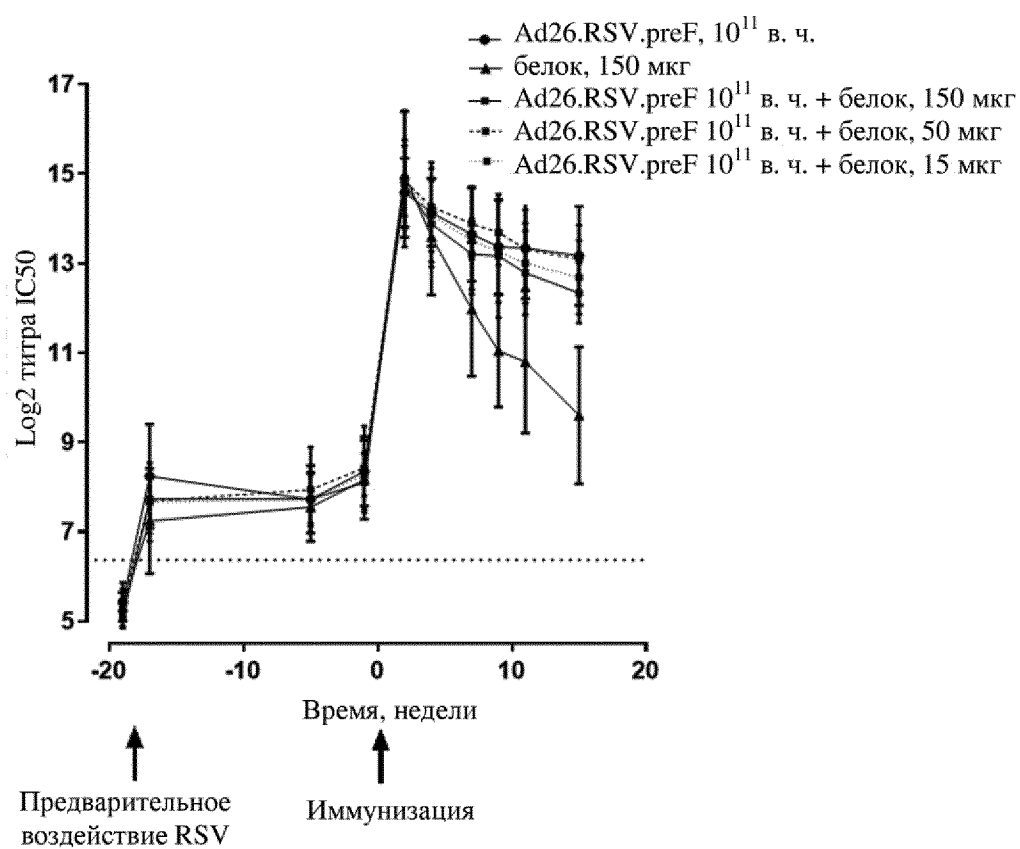


ФИГ. 18

## CD8+

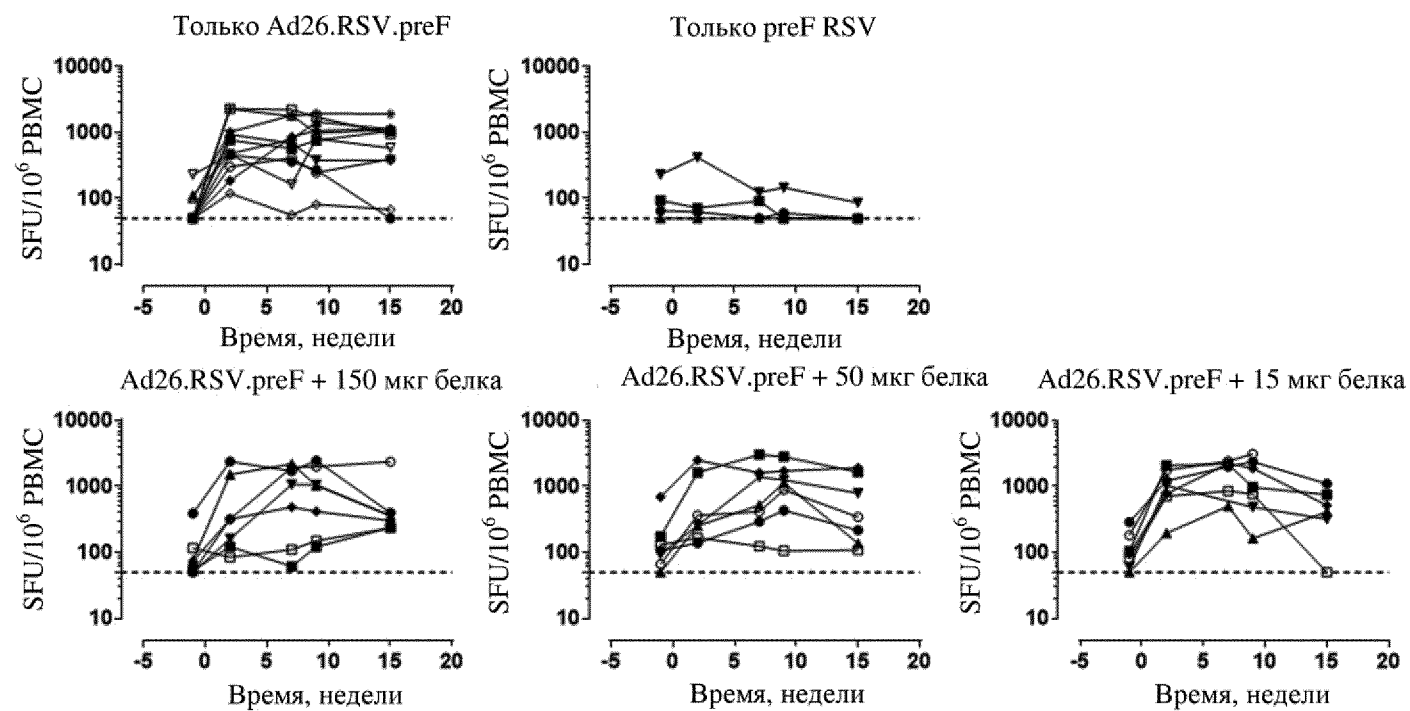


ФИГ. 18 (продолжение)

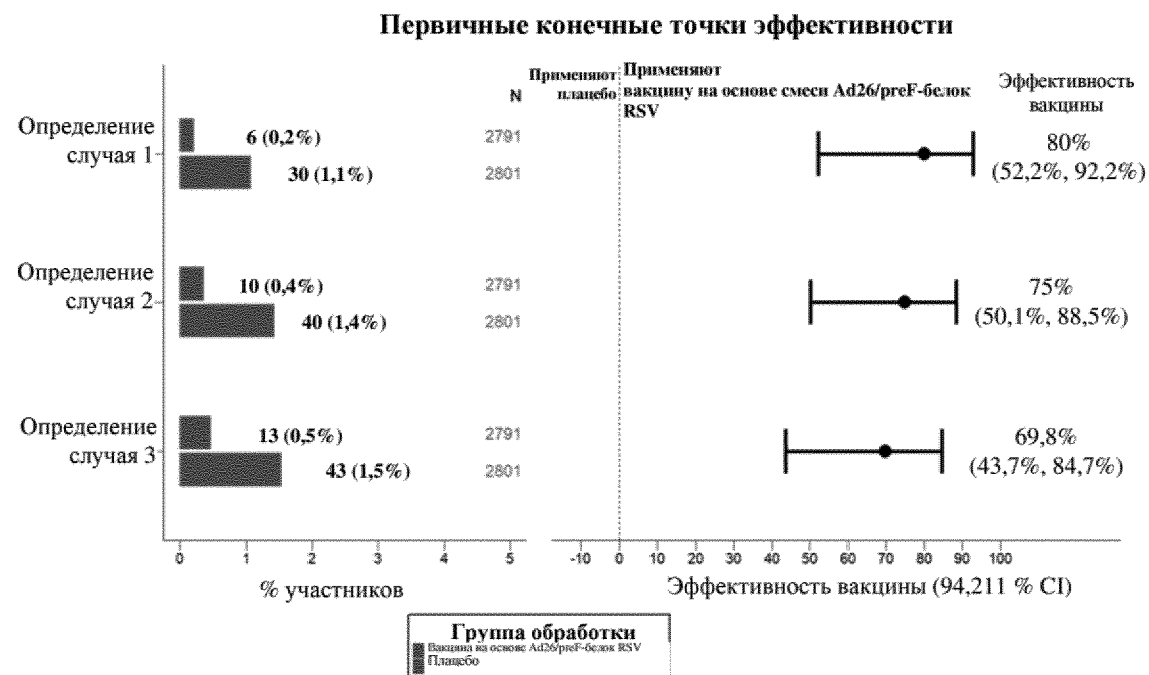


ФИГ. 19

ФИГ. 20

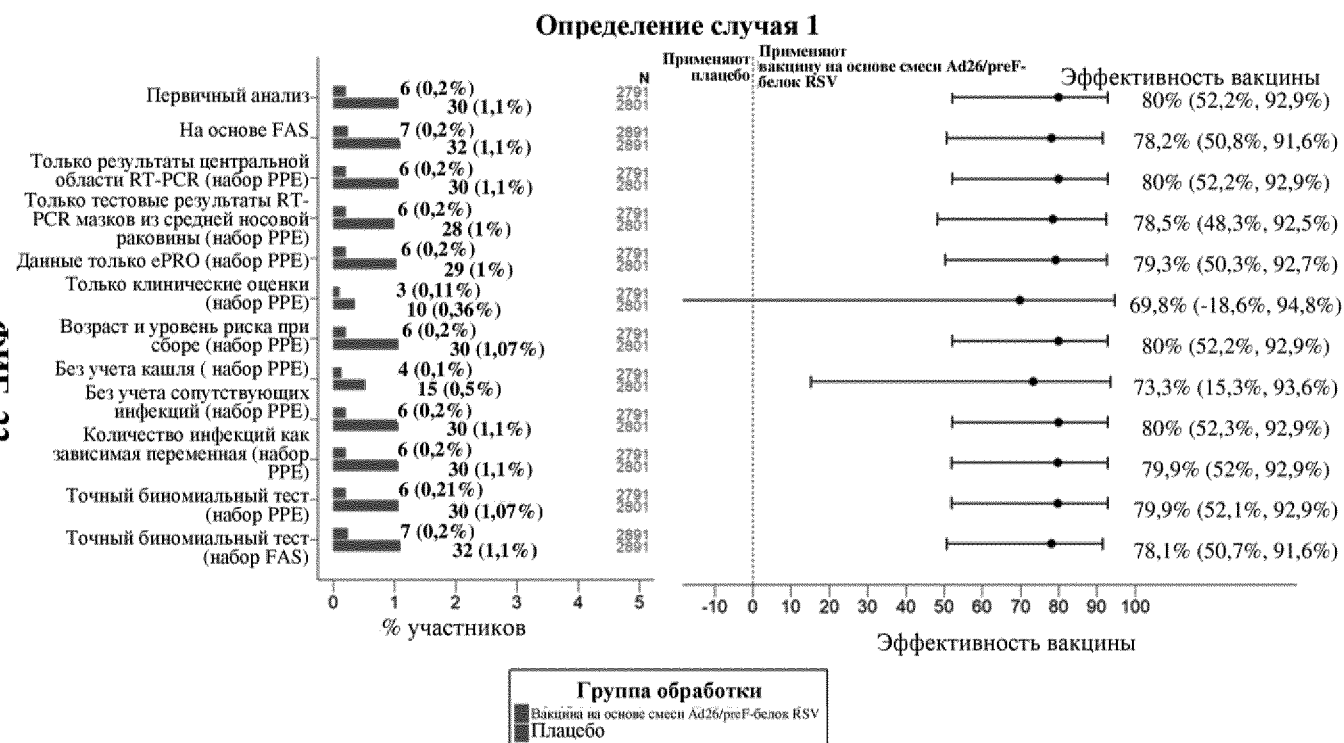


ФИГ. 21

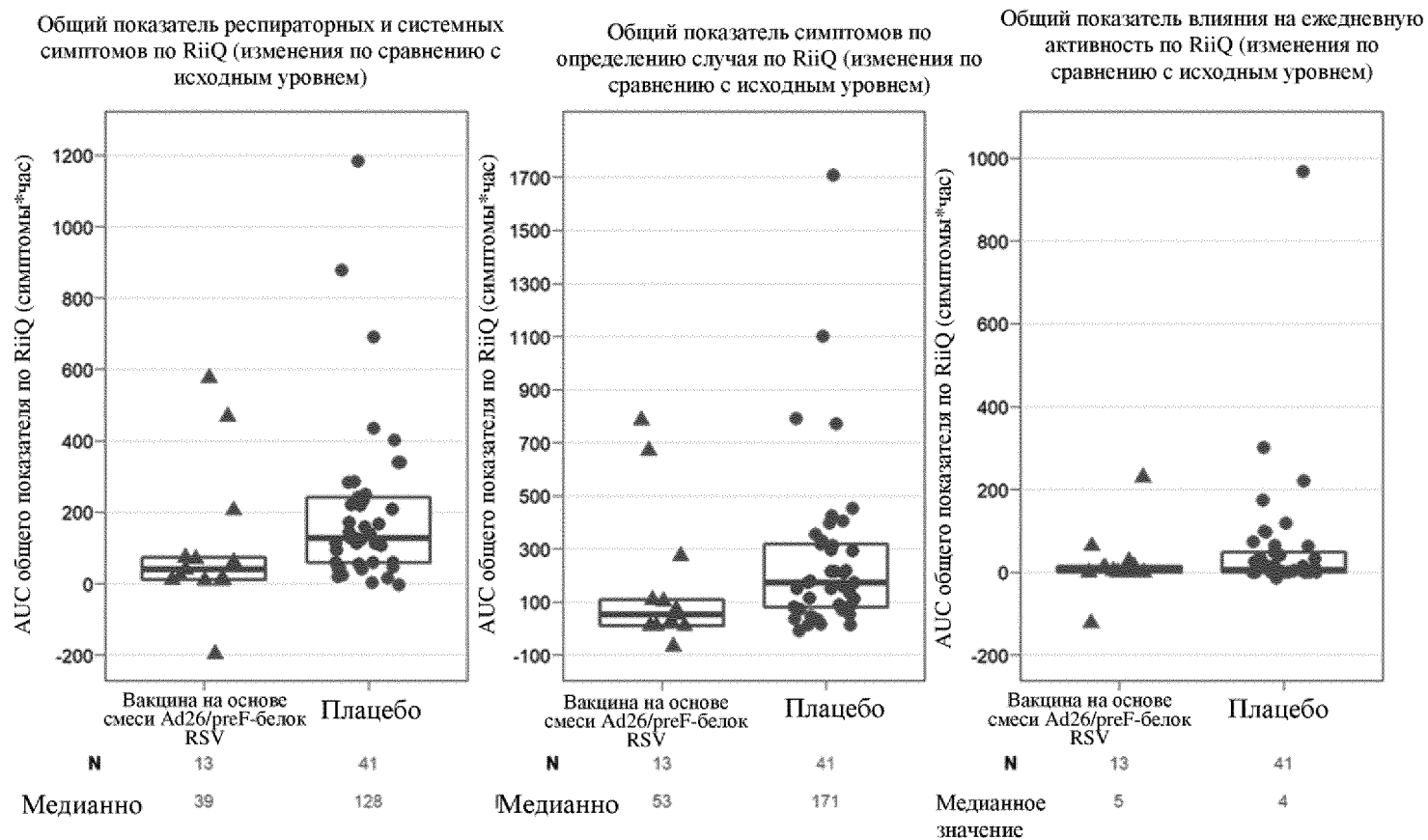


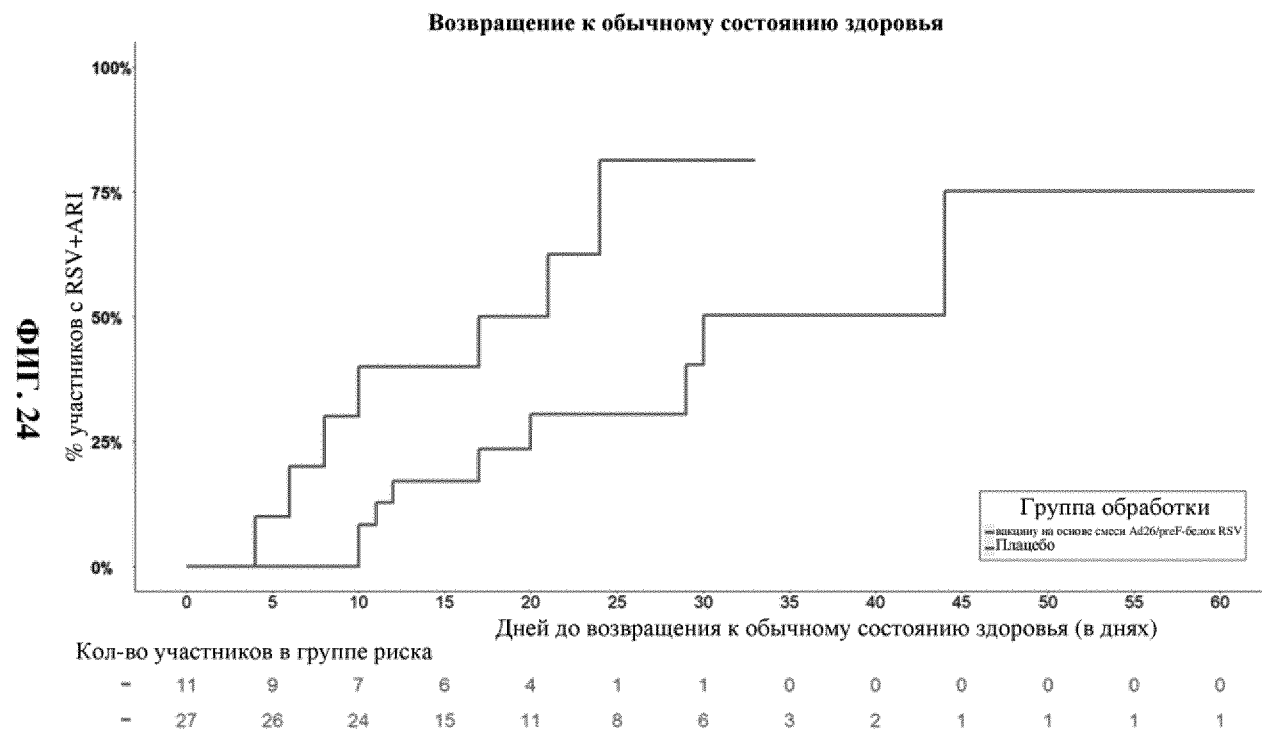


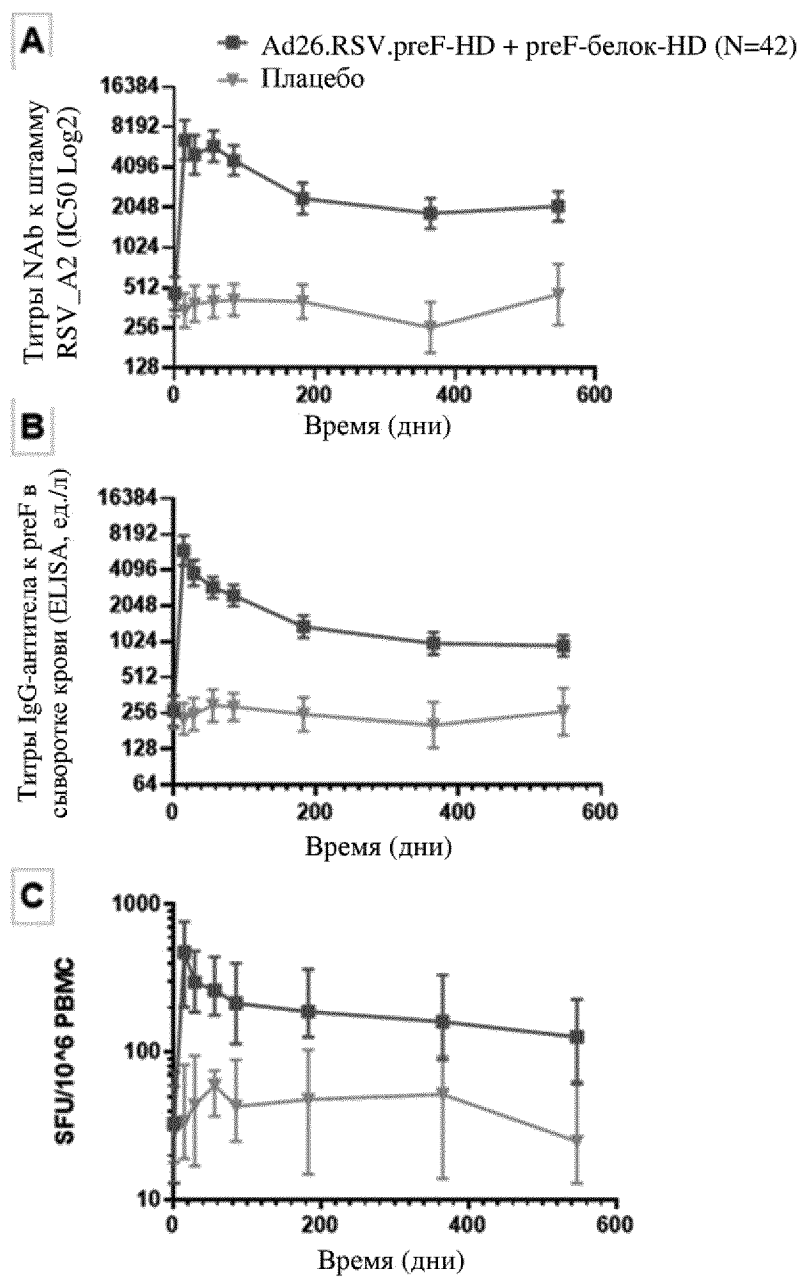
ФИГ. 22



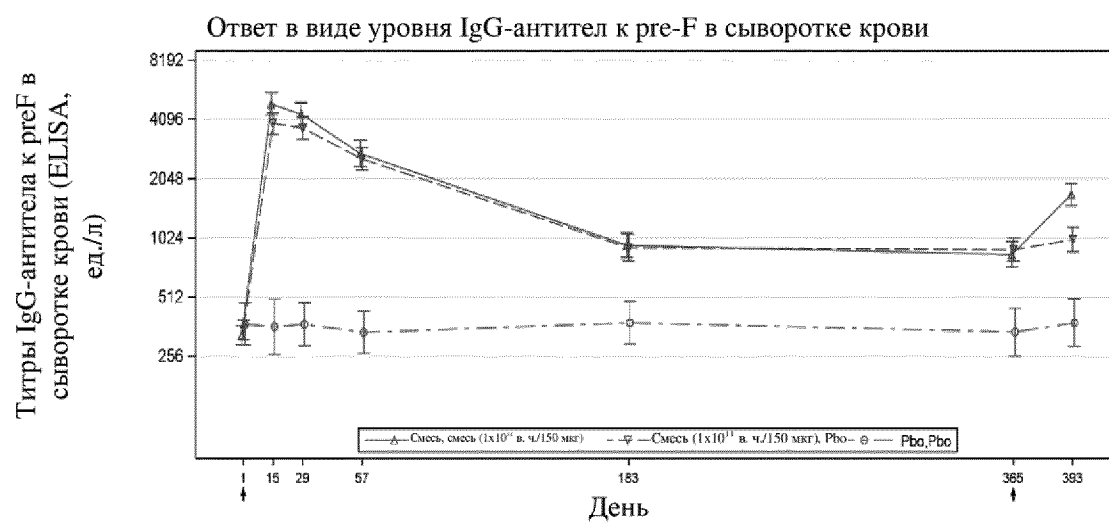
ФИГ. 23





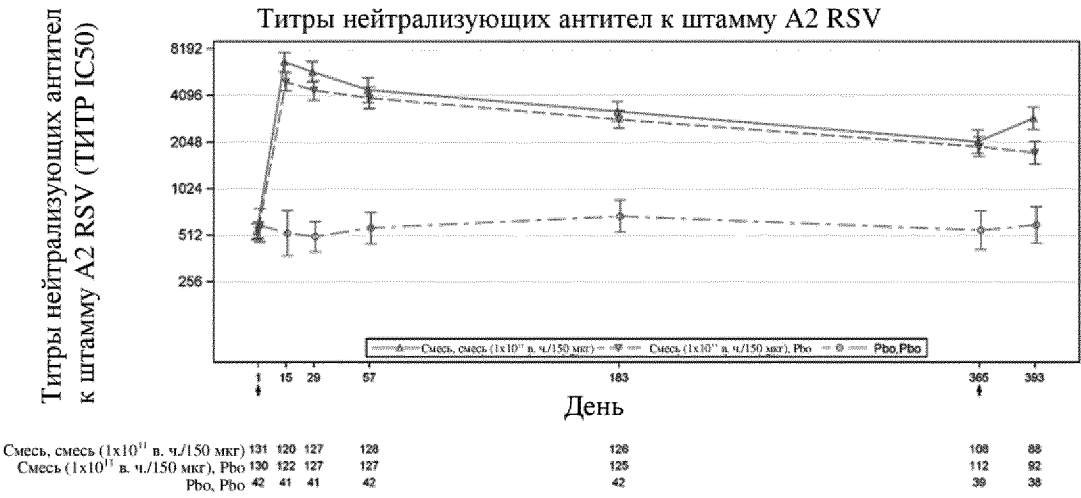


ФИГ. 25



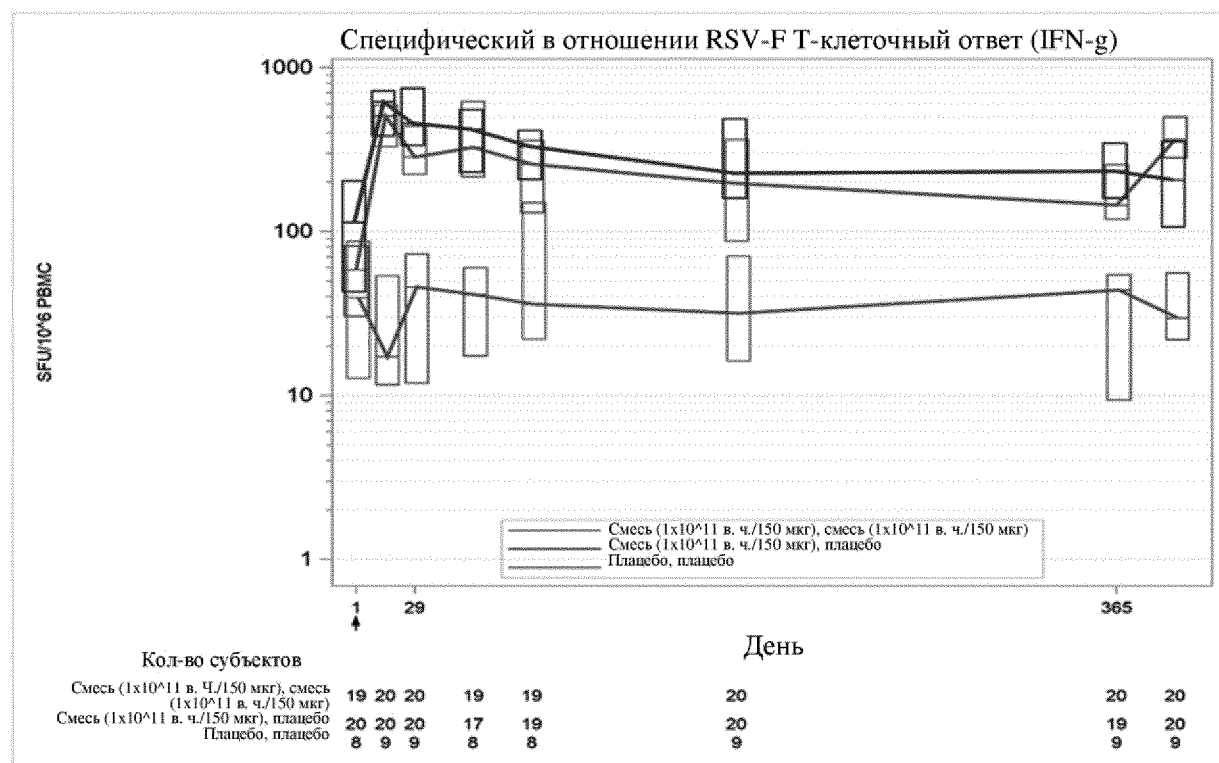
|                                                  |     |     |     |     |     |     |    |
|--------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Смесь, смесь ( $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг) | 131 | 120 | 127 | 128 | 126 | 108 | 88 |
| Смесь ( $1 \times 10^{11}$ в. ч./150 мкг), Pbo   | 130 | 122 | 127 | 127 | 125 | 112 | 91 |
| Pbo, Pbo                                         | 42  | 41  | 41  | 42  | 42  | 39  | 38 |

ФИГ. 26



ФИГ. 27

ФИГ. 28



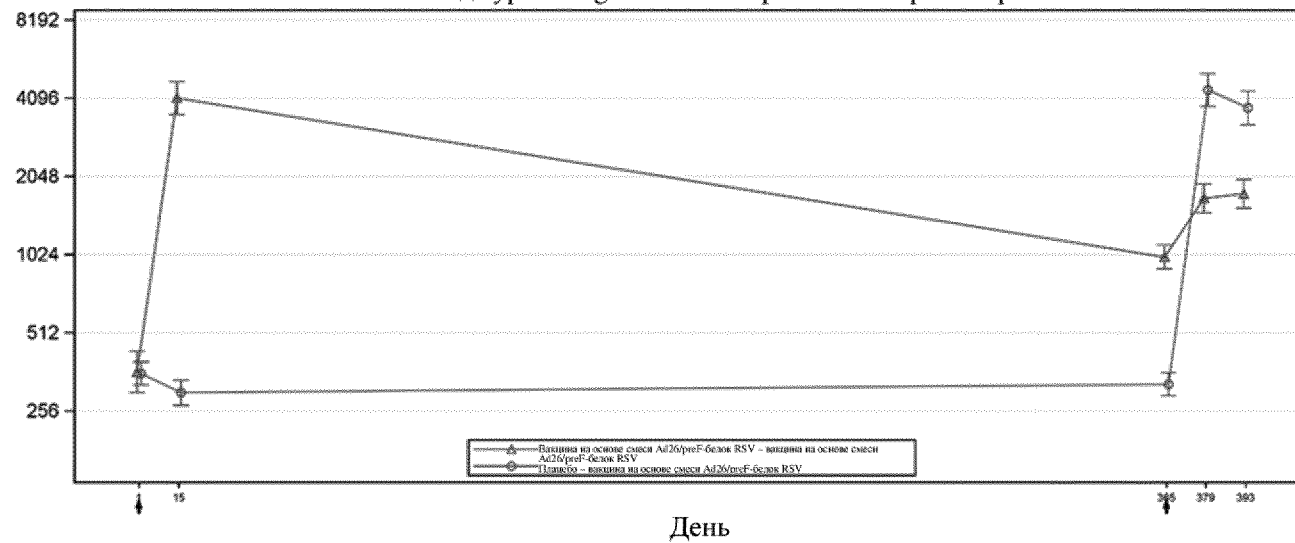
ФИГ. 29

GMT (95% CI) ответа в виде уровня  
IgG-антител к pre-F в сыворотке  
крови (ELISA, ед./л)

Кол-во субъектов

|                                                                                           |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV – вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV | 120 | 111 |
| Плацебо – вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV                                     | 125 | 118 |

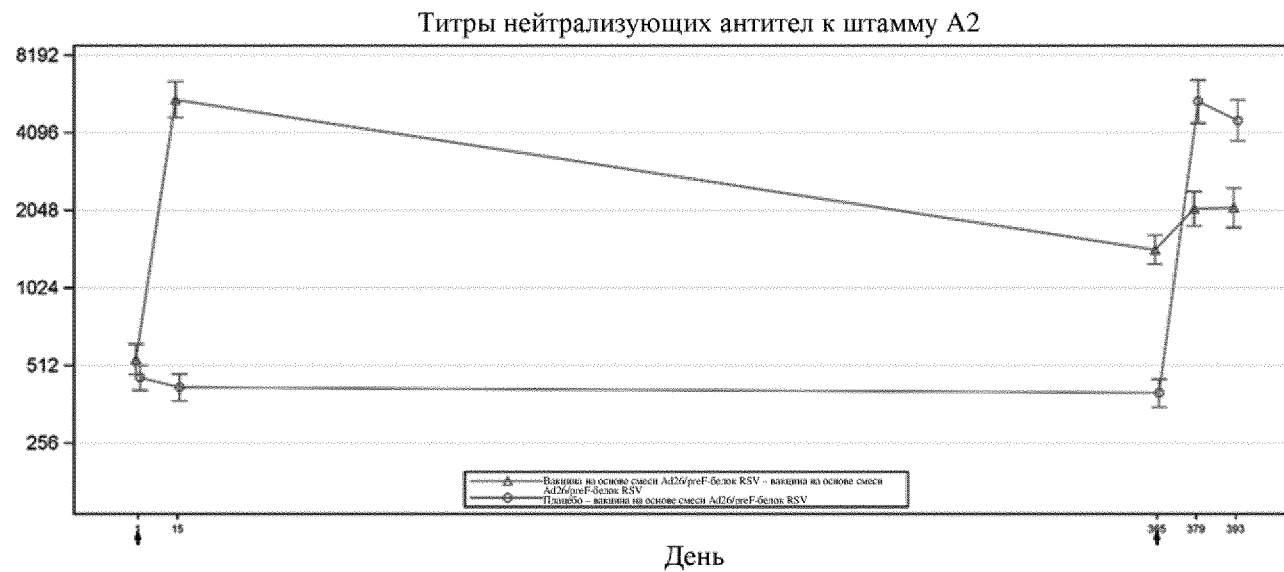
Ответ в виде уровня IgG-антител к pre-F в сыворотке крови



|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 117 | 90  | 97  |
| 121 | 100 | 100 |



GMT (95% CI) титров нейтрализующих антител к штамму A2 RSV (IC50)



Кол-во субъектов:

Вакцина на основе смеси Ad26/preF-белок RSV - вакцина на основе смеси

Ad26/preF-белок RSV

Плацебо - вакцина на основе смеси

Ad26/preF-белок RSV

120 111

125 118

116 90 97

121 100 98