

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390257 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.02

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

(22) Дата подачи заявки
2021.07.07

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВГВ НА ОСНОВЕ РНК-РЕПЛИКОНА

(31) 63/049,400; 63/144,051

(72) Изобретатель:

(32) 2020.07.08; 2021.02.01

Дехарт Джейсон Л., Ван Натаниел
Стивен, Алиахмат Париназ, Мейн
Кристиан (US), Дэвис Хетер Линн
(BE), Пейс Крейг (US)

(33) US

(86) PCT/EP2021/068879

(87) WO 2022/008613 2022.01.13

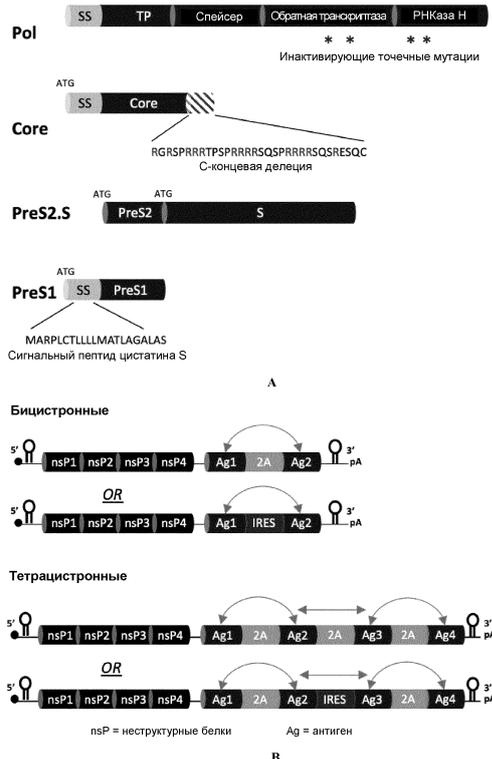
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE)

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 молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие поверхностные антигены вируса гепатита В (ВГВ), коровые антигены ВГВ и антигены ВГВ-полимеразы, а также связанные с ними комбинации. Также описаны векторы, такие как плазмиды ДНК или вирусные векторы, и РНК-репликоны, экспрессирующие антигены ВГВ, и фармацевтические композиции, содержащие векторы экспрессии. Также описаны способы индукции иммунного ответа против ВГВ или лечения вызываемого ВГВ заболевания, особенно у лиц, страдающих хронической инфекцией ВГВ, с использованием фармацевтических композиций согласно изобретению.



A1

202390257

202390257

A1

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВГВ НА ОСНОВЕ РНК-РЕПЛИКОНА

5 **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет для Предварительной патентной заявки США № 63/049,400, поданной 8 июля 2020 г., и Предварительной патентной заявки США № 63/144,051, поданной 1 февраля 2021 г., содержание которых включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

10 **ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ**

[2] Настоящая заявка содержит список последовательностей, представленный в электронной форме через EFS-Web как Список последовательностей в формате ASCII с именем файла “TIP1088WOPCT1-Sequence_Listing” и датой создания 24 июня 2021 г., и имеющий размер 390 Кбайт. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, составляет часть описания и включен в данный документ путем ссылки в полном объеме.

20 **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[3] Раскрытие настоящего изобретения в целом относится к области молекулярной биологии и генной инженерии, включая молекулы нуклеиновых кислот, применяемые для регулирования экспрессии генов, и применения молекул нуклеиновых кислот, например, для продуцирования нужных продуктов в подходящих клетках-хозяевах в культуре клеток или в организме субъекта, и придания благоприятных характеристик клеткам-хозяевам или субъектам.

25 **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[4] Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой малый, 3,2 т.п.н., гепатотропный ДНК-вирус, кодирующий четыре открытых рамки считывания и семь белков. Около двух миллионов человек являются инфицированными ВГВ, и приблизительно 240 миллионов человек имеют хроническую инфекцию гепатита В (хронический ВГВ), характеризующуюся устойчивыми вирусными и субвирусными частицами в крови на протяжении более чем 6 месяцев (Cohen et al. *J. Viral Hepat.* (2011) 18(6), 377 - 83). Устойчивая инфекция ВГВ ведет к истощению Т-клеток в циркулирующих и внутрипеченочных ВГВ-

специфических CD4+ и CD8+ Т-клетках через хроническую стимуляцию ВГВ-специфических рецепторов Т-клеток вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате полифункциональность Т-клеток снижается (т. е., наблюдается сниженный уровень IL-2, фактора некроза клеток (TNF)- α , IFN- γ и отсутствие пролиферации).

[5] Безопасная и эффективная профилактическая вакцина против инфекции ВГВ доступна с 1980-х годов и является главным средством профилактики гепатита В (World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204; 2015 March). Всемирная организация здравоохранения рекомендует вакцинацию всех грудных детей, а в странах, где с низкой или средней эндемичностью гепатита В – вакцинацию всех детей и подростков (в возрасте <18 лет), а также людей определенных подверженных риску категорий населения. Благодаря вакцинации, уровень инфицирования в мире заметно снизился. Однако профилактические вакцины не вылечивают застарелую инфекцию ВГВ.

[6] Хронический ВГВ в настоящее время лечат с применением ИФН- α и нуклеозидных или нуклеотидных аналогов, однако способов окончательного излечения не существует из-за персистенции в инфицированных гепатоцитах внутриклеточного вирусного промежуточного продукта репликации, называемого ковалентно непрерывной кольцевой ДНК (кнкДНК), который играет фундаментальную роль в качестве матрицы для вирусных РНК, а значит, новых вирионов. Считается, что индуцированные вирусспецифические ответы Т-клеток и В-клеток способны эффективно удалять несущие кнкДНК гепатоциты. Применяемые на данный момент средства терапии, направленные на ВГВ-полимеразу, подавляют виремию, но дают ограниченный эффект в отношении кнкДНК, которая находится в ядре, и связанного с этим продуцирования циркулирующего антигена. Наиболее жесткая из возможных форм лечения состоит в удалении кнкДНК ВГВ из организма, которое не наблюдалось ни как естественный исход, ни как результат терапевтического вмешательства. Однако потеря поверхностных антигенов ВГВ (ГВпАг) является клинически эффективным эквивалентом лечения, поскольку рецидив болезни возможен только в случаях тяжелой иммуносупрессии, предотвращение которой возможно путем профилактического лечения. Таким образом, по меньшей мере с

клинической точки зрения, потеря ГВпАг связана с наиболее жесткой формой иммуновосстановительной терапии против ВГВ.

[7] Например, иммуномодуляция пегилированным интерфероном (пегИФН)- α оказалась лучшей по сравнению с нуклеозидной или нуклеотидной терапией в плане длительного внелечебного ответа при ограниченном курсе лечения. Существует информация, что, помимо прямого противовирусного эффекта, ИФН- α обеспечивает эпигенетическое подавление кнкДНК в культуре клеток и у гуманизированных мышей, что приводит к снижению продуцирования вирионов и транскриптов (Belloni et al. *J. Clin. Invest.* (2012) 122(2), 529 - 537). Однако эта терапия все же сопряжена с побочными эффектами, и общие показатели ответа довольно низки, частично из-за того, что ИФН- α имеет лишь слабое модулирующее влияние на ВГВ-специфические Т-клетки. В частности, показатели эффективности лечения являются низкими (< 10 %), а токсичность высокой. Подобным образом, непосредственно действующие противовирусные средства против ВГВ, а именно ингибиторы ВГВ-полимеразы энтекавир та тенофовир, эффективны в качестве средств монотерапии в вызывании вирусной супрессии с высоким генетическим барьером для появления лекарственноустойчивых мутантов и, таким образом, предотвращением прогрессирования заболевания печени. Однако лечение хронического гепатита В, определяемое по потере ГВпАг или сероконверсии, редко достигается с применением таких ингибиторов ВГВ-полимеразы. Таким образом, эти противовирусные средства теоретически требуют неограниченного введения для предотвращения рецидива заболевания печени, подобно антиретровирусной терапии против вируса иммунодефицита человека (HIV).

[8] Терапевтическая вакцинация имеет потенциал удаления ВГВ из организма хронически инфицированных пациентов (Michel et al. *J. Hepatol.* (2011) 54(6), 1286 - 1296). Было исследовано множество стратеги, однако на данный момент успешность терапевтической вакцинации не была подтверждена.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[9] Соответственно, в медицине сохраняется потребность в лечении вируса гепатита В (ВГВ), в частности, хронического ВГВ, для ограниченного хорошо переносимого лечения с высоким показателем эффективности лечения. Изобретение позволяет удовлетворить эту потребность путем обеспечения иммуногенных композиций и способов индукции иммунного ответа против

инфекции вирусов гепатита В (ВГВ). Иммуногенные композиции и способы согласно изобретению применимы для обеспечения терапевтического иммунитета у субъекта, такого как субъект с хронической инфекцией ВГВ.

5 [10] В общем аспекте заявка касается молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации, включающей не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность включает, в порядке от 5'- до 3'- конца:

10 (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и

15 (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ,

причем первый антиген ВГВ и второй антиген ВГВ, каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ, и по меньшей мере один из первого и второго антигенов ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ, предпочтительно антигеном Pre-S1 ВГВ или антигеном PreS2.S ВГВ.

20 [11] В одном варианте осуществления один из первого или второго антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ или pol-антигеном ВГВ.

25 [12] В одном варианте осуществления не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5'- до 3'- конца:

30 (4) второй элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей второй антиген ВГВ, и

(5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген ВГВ, независимо выбранный из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, pol-антиген ВГВ и поверхностный антиген ВГВ.

[13] В другом варианте осуществления не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5'- до 3'-конца:

5 (6) третий элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей третий антиген ВГВ, и

10 (7) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ, независимо выбранный из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, роI-антиген ВГВ и поверхностный антиген ВГВ.

[14] В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает первую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

15 (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и

20 (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ, и

вторую встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген вируса гепатита В (ВГВ),

25 (2) второй элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, и

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ,

30 причем первая и вторая не встречающиеся в природе полинуклеотидные последовательности связаны третьим элементом последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей третий пептид аутопротеазы, или присутствуют в отдельных молекулах нуклеиновых кислот, и

первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ, и по меньшей мере один из первого, второго, третьего и четвертого антигенов ВГВ является
5 поверхностным антигеном ВГВ, выбранным из антигена Pre-S1 ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и антигена PreS2.S ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID
10 NO: 5, предпочтительно один из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ или pol-антигеном ВГВ.

[15] В другом варианте осуществления каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является отличным от других.

[16] В другом варианте осуществления каждый из первого, второго, 15 третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(I) первый антиген Pre-S1 ВГВ, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 20 например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(II) второй антиген Pre-S1 ВГВ, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 25 например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

(III) антиген PreS2.S ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, 30 аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(IV) коровый антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7; и

(V) антиген ВГВ-полимеразы, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9,

предпочтительно каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ независимо является функционально связанным с сигнальным пептидом, и антиген PreS2.S ВГВ включает внутренний сигнальный пептид.

[17] В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 84, 85, или 86, например, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 % идентична SEQ ID NO: 84, 85 или 86. В некоторых вариантах осуществления последние пять С-концевых аминокислот корового антигена ВГВ включают аминокислотную последовательность VVR, более конкретно – аминокислотную последовательность VVRR (SEQ ID NO: 91), более конкретно – аминокислотную последовательность VVRRR (SEQ ID NO: 92).

[18] В некоторых вариантах осуществления каждый из поверхностного антигена ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ включает:

(I) консенсусную последовательность для генотипов ВГВ А, В, С и D; и/или

(II) один или несколько эпитопов для HLA-A*11:01, HLA-A*24:02, HLA-A*02:01, HLA-A*A2402, HLA-A*A0101 или HLA-B*40:01.

[19] В некоторых вариантах осуществления каждый из поверхностных антигенов ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ включает один или несколько эпитопов для HLA-A*11:01.

[20] В другом варианте осуществления каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(I) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(II) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

(III) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(IV) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86; и

(V) pol-антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9,

предпочтительно каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ независимо является функционально связанным с сигнальным пептидом, таким как сигнальный пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

[21] В другом варианте осуществления каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 %

идентична SEQ ID NO: 6, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6;

5 (IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична
10 SEQ ID NO: 8; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая рол-антиген ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO:
15 10,

предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и рол-антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной
20 последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, и антиген PreS2.S ВГВ включает внутренний сигнальный пептид.

[22] В некоторых вариантах осуществления каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

25 (I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S
30 ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоящий из последовательности одной из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая рол-антиген ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 10;

предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и рол-антиген ВГВ независимо функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим сигнальный пептид, таким как полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 90.

[23] В одном варианте осуществления каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы независимо включает пептидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей A (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A), вирус флашерии 2A (BmIFV2A) и их комбинация. Предпочтительно каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A, такую как последовательность P2A SEQ ID NO: 11.

[24] В другом варианте осуществления каждая из первой, второй и третьей IRES взята из вируса энцефаломиокардита (EMCV) или Энтеровируса 71 (EV71). Предпочтительно каждая из первой, второй и третьей IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

[25] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную

последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

5 (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий
10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную
15 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9,
20 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную
25 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген
30 Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную

последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий
5 аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

10 (14) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A
20 SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

(15) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, IRES,
25 имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную
30 последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

(16) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14,

(20) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(21) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или

(22) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и pol-антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

[26] В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54.

5 [27] В еще одном общем аспекте заявка касается вектора, включающего молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно заявке.

[28] В одном варианте осуществления вектор является плазмидой ДНК. В другом варианте осуществления вектор является вирусным вектором ДНК или вирусным вектором РНК. В одном варианте осуществления вектор является вектором модифицированной вакцины Анкара (МВА) или вектором аденовируса.
10 В одном варианте осуществления вектор является вектором Ad26, Ad35 или МВА-BN.

[29] В еще одном общем аспекте заявка касается РНК-репликона, включающего, в порядке от 5'- до 3'-конца:

- 15 (1) 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК;
- (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один, предпочтительно все, из неструктурных белков вируса РНК;
- (3) субгеномный промотор вируса РНК;
- (4) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно заявке; и
- 20 (5) 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК.

[30] В еще одном общем аспекте заявка касается РНК-репликона, включающего, в порядке от 5'- до 3'-конца,

- 25 (1) 5'-нетранслируемую область альфавируса (5'-НТО),
- (2) последовательность 5'-репликации неструктурного гена nsр1 альфавируса,
- (3) правый петлевой (DLP) мотив вида вируса,
- (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый пептид аутопротеазы,
- 30 (5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса,
- (6) субгеномный промотор альфавируса,
- (7) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно заявке,
- (8) 3'-нетранслируемую область альфавируса (3'-НТО) и

(9) необязательно последовательность полиаденозина.

[31] В одном варианте осуществления мотив DLP взят из вида вируса, выбранного из группы, к которой относятся вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MTDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (U AV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHA V), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлэнд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндуму (NDUV) и вирус Багги Крик.

[32] В другом варианте осуществления четвертый пептид аутопротеазы выбран из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A), вирус флашерии 2A (BmIFV2A) и их комбинация. Предпочтительно четвертый пептид аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A.

[33] В еще одном общем аспекте заявка касается РНК-репликона, включающего, в порядке от 5'- до 3'-конца,

- (1) 5'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 55,
- (2) последовательность 5'-репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56,
- (3) мотив DLP, включающий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 57,
- (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность P2A SEQ ID NO: 11,
- (5) полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса, имеющие нуклеиновокислотные последовательности SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно,
- (6) субгеномный промотор, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 62,

(7) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно заявке и

(8) 3'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 63.

[34] В одном варианте осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность P2A, включает SEQ ID NO: 12, молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54, и РНК-репликон также включает последовательность полиаденозина на 3'-конце репликона. Предпочтительно последовательность полиаденозина имеет последовательность SEQ ID NO: 64.

[35] В еще одном общем аспекте заявка касается РНК-репликона, включающего полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 65 по 72.

[36] В еще одном общем аспекте заявка касается молекулы нуклеиновой кислоты, включающей полинуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-репликон согласно заявке. Предпочтительно нуклеиновая кислота также включает T7 промотор, функционально связанный с 5'-концом последовательности ДНК. В более предпочтительном варианте T7 промотор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 73.

[37] В еще одном общем аспекте заявка касается фармацевтической композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию, вектор или РНК-репликон согласно заявке и фармацевтически приемлемый носитель.

[38] В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель включает липидную наночастицу, причем липидная наночастица предпочтительно включает один или несколько из ALC-0315, DOTMA, DOTAP, DDAB, DOGS, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA, DLin-M-C3-DMA, DLin-MP-DMA или DCChol.

[39] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция также включает: (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровий антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую

аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86.

[40] В еще одном общем аспекте заявка касается способа вакцинирования субъекта против ВГВ, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции согласно заявке. В одном варианте осуществления способ также включает введение субъекту второй композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию, которая кодирует по меньшей мере один идентичный антиген ВГВ, в режиме "прайм-буст". В некоторых вариантах осуществления режим "прайм-буст" включает примиряющую композицию, включающую РНК-репликон согласно заявке, и бустерную композицию, включающую вектор, не являющийся РНК-репликоном и кодирующий по меньшей мере один идентичный эпитоп ВГВ, предпочтительно по меньшей мере один идентичный антиген ВГВ, в качестве примиряющей композиции. В одном варианте осуществления бустерная композиция включает вектор модифицированной вакцины Анкара (МВА), вектор аденовируса или плазмидный вектор. В некоторых вариантах осуществления бустерная композиция включает вектор Ad26, Ad35 или МВА-BN. В некоторых вариантах осуществления режим "прайм-буст" включает бустерную композицию, включающую РНК-репликон согласно заявке, и примиряющую композицию, включающую вектор, не являющийся РНК-репликоном и кодирующий по меньшей мере один идентичный эпитоп ВГВ, такой как по меньшей мере один идентичный эпитоп HLA, предпочтительно по меньшей мере один идентичный антиген ВГВ, в качестве бустерной композиции. В одном варианте осуществления примиряющая композиция включает вектор

модифицированной вакцины Анкара (МВА), вектор аденовируса или плазмидный вектор. В некоторых вариантах осуществления примирующая композиция включает вектор Ad26, Ad35 или МВА-BN.

5 [41] В еще одном общем аспекте заявка касается способа уменьшения инфекции и/или репликации ВГВ в организме субъекта, который включает введение субъекту фармацевтической композиции согласно заявке или вакцинирование субъекта в соответствии со способами согласно заявке.

10 [42] В еще одном общем аспекте заявка касается выделенной клетки-хозяина, включающей молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию, вектор или РНК-репликон согласно заявке.

[43] В еще одном общем аспекте заявка касается способа продуцирования РНК-репликона, включающего транскрибирование нуклеиновой кислоты согласно заявке, *in vivo* или *in vitro*.

15 [44] В еще одном общем аспекте заявка касается фармацевтической композиции согласно заявке для применения в индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, причем субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, необязательно в комбинации с другим иммуногенным агентом, предпочтительно другим агентом против ВГВ.

20 [45] В еще одном общем аспекте заявка касается фармацевтической композиции согласно заявке для применения в лечении вызываемого вирусом гепатита В (ВГВ) заболевания у субъекта, который в этом нуждается, причем субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, и вызываемое ВГВ заболевание выбрано из группы, к которой относятся запущенный фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), необязательно в комбинации с другим терапевтическим агентом, предпочтительно другим агентом против ВГВ.

25 [46] Другие аспекты, особенности и преимущества изобретения станут очевидны из представленного ниже раскрытия изобретения, включая подробное описание изобретения и предпочтительные варианты его осуществления и прилагаемую формулу изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

30 [47] Представленное выше краткое описание, а также следующее ниже подробное описание изобретения станут более понятны по прочтении в сочетании с прилагаемыми фигурами. Следует понимать, что изобретение не

ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на фигурах.

[48] ФИГУРА 1А показывает схематическое изображение строения антигенов, включающих Pol с инактивирующими точечными мутациями, усеченную коровую последовательность с С-концевой делецией (SEQ ID NO: 76), PreS2.S и PreS1, представляющий сигнальный пептид цистатина S (SEQ ID NO: 77).

[49] ФИГУРА 1В показывает схематическое изображение бицистронной и тетрацистронной конструкций вакцины.

[50] ФИГУРА 2 представляет серию графиков, показывающих относительную экспрессию антигенов ВГВ из 4-х верхних бицистронных и 4-х верхних тетрацистронных конструкций вакцины. Экспрессию коровой последовательности, PreS2.S и PreS1 в клетках Веро измеряли путем проточной цитометрии и указывали как СКП относительно моногенного контроля. Экспрессию Pol измеряли при помощи вестерн-блоттинга, а относительную экспрессию определяли при помощи денситометрии.

[51] ФИГУРА 3 представляет серию графиков, показывающих относительную экспрессию антигенов ВГВ из трицистронных конструкций вакцины. Экспрессию коровой последовательности и PreS2.S в клетках Веро измеряли путем проточной цитометрии и указывали как СКП относительно моногенного контроля. Экспрессию Pol измеряли при помощи вестерн-блоттинга, а относительную экспрессию определяли при помощи денситометрии.

[52] ФИГУРА 4А - ФИГУРА 4Д являются графиками, показывающими результаты *in vivo* иммунизации кодирующими SMARRT-репликон антигенами ВГВ. Мышам C57BL/6 путем внутримышечной инъекции вводили кодирующие SMARRT-репликон моногенные или примешанные антигены ВГВ. Контрольной группе вводили солевой раствор. через 14 дней после примирования собирали образцы селезенки и спленоциты повторно стимулировали перекрывающимися пептидными пулами для коровой последовательности (ФИГУРА 4А), Pol (ФИГУРА 4В), PreS2.S (ФИГУРА 4С) и PreS1 (ФИГУРА 4Д). Количество продуцирующих IFN γ клеток измеряли при помощи ELISpot. Графики показывают среднее значение с 95 % ДИ (n=5 мышей на группу). Выполняли тест Манна-Уитни для статистических сравнений *p<0,05; **p<0,01.

[53] ФИГУРА 5А - ФИГУРА 5Н являются графиками, показывающими результаты *in vivo* иммунизации и выполненной на 2-й неделе повторной стимуляции кодирующими SMARRT-репликон антигенами ВГВ. Мышам C57BL/6 путем внутримышечной инъекции вводили кодирующие SMARRT-репликон моногенные или примешанные антигены ВГВ. Контрольной группе вводили солевой раствор. через 14 дней после примирования, собирали образцы селезенки и спленциты повторно стимулировали перекрывающимися пептидными пулами для коровой последовательности (ФИГУРА 5А и ФИГУРА 5Е), Pol (ФИГУРА 5В и ФИГУРА 5F), PreS2.S (ФИГУРА 5С и ФИГУРА 5G) и PreS1 (ФИГУРА 5D и ФИГУРА 5Н) в присутствии брэфелдина А в течение 6 часов. Продуцирование IFN γ , TNF α и IL-2 Т-клетками CD4 и CD8 измеряли путем внутриклеточного окрашивания цитокинов. График полифункциональности строят согласно определению по продуцированию 1 (IFN γ +), 2 (IFN γ + TNF α +) или 3 (IFN γ + TNF α + IL-2+) цитокинов на клетку. Графики показывают среднее значение с SD (n=5 мышей на группу).

[54] ФИГУРА 6А - ФИГУРА 6D являются графиками, показывающими результаты *in vivo* иммунизации кодирующими SMARRT-репликон антигенами ВГВ. Мышам C57BL/6 путем внутримышечной инъекции вводили кодирующие SMARRT-репликон моногенные или примешанные антигены ВГВ, бигенные антигены или тетрацистронные конструкторы. Контрольной группе вводили солевой раствор. через 14 дней после примирования собирали образцы селезенки и спленциты повторно стимулировали перекрывающимися пептидными пулами для коровой последовательности (ФИГУРА 6А), Pol (ФИГУРА 6В), PreS2.S (ФИГУРА 6С) и PreS1 (ФИГУРА 6D). Количество продуцирующих IFN γ клеток измеряли при помощи ELISpot. Графики показывают среднее значение с 95 % ДИ (n=5 мышей на группу).

[55] ФИГУРА 7А - ФИГУРА 7D являются графиками, показывающими результаты *in vivo* иммунизации и выполненной на 2-й неделе повторной стимуляции кодирующими SMARRT-репликон антигенами ВГВ. Мышам C57BL/6 путем внутримышечной инъекции вводили кодирующие SMARRT-репликон моногенные или примешанные антигены ВГВ, бигенные антигены или тетрацистронные конструкторы. Контрольной группе вводили солевой раствор. через 14 дней после примирования, собирали образцы селезенки и спленциты повторно стимулировали перекрывающимися пептидными пулами для коровой

последовательности (ФИГУРА 7А), Pol (ФИГУРА 7В), PreS2.S (ФИГУРА 7С) и PreS1 (ФИГУРА 7D) в присутствии брэфелдина А в течение 6 часов. Продуцирование IFN γ , TNF α и IL-2 Т-клетками CD4 и CD8 измеряли путем внутриклеточного окрашивания цитокинов. График полифункциональности строят согласно определению по продуцированию 1 (IFN γ +), 2 (IFN γ + TNF α +) или 3 (IFN γ + TNF α + IL-2+) цитокинов на клетку. Графики показывают среднее значение с SD (n=5 мышей на группу).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[56] Различные публикации, статьи и патенты приведены или описаны в разделе уровня техники и по всему тексту описания; каждая из этих ссылок включена в данный документ путем ссылки в полном объеме. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в данное описание имеет целью представление контекста изобретения. Такое обсуждение не означает признания того, что любые или все из этих предметов составляют часть существующего уровня техники по отношению к любым описанным или заявленным изобретениям.

[57] Если не определено иное, все применяемые авторами технические научные термины имеют значение, которое является общепринятым среди специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Или же некоторые применяемые авторами термины имеют значения, указанные в описании. Все приводимые авторами патенты, опубликованные патентные заявки и публикации включены путем ссылки в полном объеме, как если бы они были изложены в данном документе.

[58] Следует отметить, что применяемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также охватывают ссылки на множественное число, если контекст не диктует иного.

[59] Если не указано иное, любое числовое значение, такое как % идентичности последовательностей или диапазон % идентичности последовательностей, как описано авторами, следует понимать как скорректированное в любом случае термином “приблизительно”. Таким образом, числовое значение, как правило, включает ± 10 % от указанного значения. Например, доза 10 мг включает от 9 мг до 11 мг. В контексте данного описания применение числового диапазона прямо включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые

числа в пределах таких диапазонов и дробные части значений, если контекст четко не диктует иного.

[60] В контексте данного описания союзы “и/или” между множественными указываемыми элементами следует понимать как охватывающие как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, в случаях, когда два элемента соединены союзами “и/или”, первый вариант касается применимости первого элемента без второго. Второй вариант касается применимости второго элемента без первого. Третий вариант касается применимости первого и второго элементов вместе. Любой из этих вариантов следует понимать как охватываемый этим значением и, таким образом, удовлетворяет требованию термина “и/или” в контексте данного описания. Параллельное применение более чем одного из вариантов также предполагает, что они охватываются этим значением и, таким образом, удовлетворяют требованию термина “и/или”.

[61] Если не указано иное, термин “по меньшей мере”, предшествующий ряду элементов, следует понимать как касающийся каждого элемента в этом ряду. Специалисты в данной области техники, не выходя за рамки привычных экспериментов, смогут признать или убедиться в возможности наличия многих эквивалентов конкретных вариантов осуществления описанного авторами изобретения. Предусмотрено, что такие эквиваленты охватываются объемом изобретения.

[62] По всему тексту данного описания и в прилагаемой формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово “включать” и его варианты, такие как “включает” и “включающий”, предполагают включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. В контексте данного описания возможна замена термина “включающий” на термины “содержащий” или “охватывающий”, или иногда, в контексте данного описания, термином “имеющий”.

[63] В контексте данного описания термин “состоящий из” исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в заявленном элементе. В контексте данного описания термин “состоящий по сути из” не исключает материалов или этапов, существенно не влияющих на основные и новые характеристики заявленного элемента. Любой из вышеупомянутых терминов “включающий”, “содержащий”, “охватывающий” и “имеющий”, всякий раз

употребляемый в контексте аспекта или варианта осуществления изобретения, предполагает возможность замены на термин “состоящий из” или “состоящий по сути из” для внесения изменений в объем раскрытия изобретения.

5 [64] Термин “эпитоп” в контексте данного описания означает набор аминокислотных остатков, образующих сайт, распознаваемый иммуноглобулином, рецептором Т-клеток или молекулой антигена лейкоцитов человека (АЛЧ).

10 [65] Белки АЛЧ кодируются кластерами генов, которые образуют участок, расположенный на хромосоме 6, называемый главным комплексом гистосовместимости (ГКГС) в знак признания важной роли белков, кодируемых локусами ГКГС, в отторжении трансплантата. Соответственно, белки АЛЧ также указываются как белки ГКГС. Белки АЛЧ или ГКГС представляют собой гликопротеины поверхности клеток, которые связываются с пептидами во
15 внутриклеточных локациях и доставляют их на поверхность клетки, где комбинированный лиганд распознается Т-клеткой. Белки ГКГС Класса I находятся фактически на всех ядродержащих клетках организма. Белки ГКГС Класса I связываются с пептидами, присутствующими в цитозоле, и образуют комплексы пептида – белка ГКГС, представленные на поверхности клетки, где они распознаются цитотоксичными Т-клетками CD8+. Белки ГКГС Класса II, как
20 правило, находятся только на антигенпрезентирующих клетках, таких как В-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Каждый рецептор ГКГС Класса I состоит из варибельной α -цепи и относительно консервативной β 2-микроглобулиновой цепи. Было идентифицировано три разных полиморфных гена α -цепи класса I. Их называют АЛЧ-А, АЛЧ-В и АЛЧ-С. Изменения в α -цепи
25 обуславливают все различные гены ГКГС класса I в популяции.

[66] Фразы “процент (%) идентичности последовательностей” или “% идентичности” или “на % идентична”, применяемые в отношении аминокислотной последовательности, описывают число совпадений (“попаданий”) идентичных аминокислот двух или более сопоставляемых
30 аминокислотных последовательностей по сравнению с числом аминокислотных остатков, составляющих всю длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, применение выравнивания для сопоставления двух или более последовательностей позволяет определять процент одинаковых аминокислотных остатков (например, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %).

98 %, 99 % или 100 % идентичности аминокислотных последовательностей полной длины), когда последовательности выравнивают и сравнивают на максимальное соответствие, измеряемое с применением алгоритма сравнения последовательностей, известного специалистам в данной области техники, или при ручном выравнивании и визуальном осмотре. Такое же определение применимо и к нуклеотидным последовательностям. Последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, таким образом, отличаются замещением(ями), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалистам в данной области техники. Процент идентичности последовательностей белковых последовательностей определяют, например, при помощи таких программ, как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с применением алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 - 3402).

[67] В контексте данного описания термины и фразы “в комбинации”, “в комбинации с”, “совместная доставка” и “вводят вместе с” применительно к введению субъекту двух или более терапевтических средств или компонентов означают одновременное введение двух или более терапевтических средств или компонентов, таких как две молекулы нуклеиновых кислот, например, РНК-репликона или иммуногенной композиции, и адъюванта. “Одновременное введение” означает введение двух компонентов по меньшей мере в пределах одного дня. Если два компонента “вводят вместе с” или “вводят в комбинации с”, существует возможность их введения в отдельных композициях последовательно в пределах короткого периода времени, например, 24, 20, 16, 12, 8 или 4 часа, или в пределах 1 часа, или возможность их введения в одной композиции одновременно. Применение термина “в комбинации с” не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства или компоненты вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство или компонент (например, первую молекулу нуклеиновой кислоты) вводят до (например, от 5 минут до одного часа), параллельно или одновременно или после (например, от 5 минут до одного часа) введения второго терапевтического средства или компонента (например, второй молекулы нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления первое терапевтическое средство или компонент (например, первую молекулу нуклеиновой кислоты) и второе терапевтическое

средство или компонент (например, например, вторую молекулу нуклеиновой кислоты) вводят в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления первое терапевтическое средство или компонент (например, первую молекулу нуклеиновой кислоты) и второе терапевтическое средство или компонент (например, например, вторую молекулу нуклеиновой кислоты) вводят в отдельных композициях.

[68] В контексте данного описания “не встречающиеся в природе” нуклеиновая кислота или полипептид означают нуклеиновую кислоту или полипептид, которые не встречаются в природных условиях. “Не встречающиеся в природе” нуклеиновую кислоту или полипептид синтезируют, обрабатывают, изготавливают и/или подвергают другим манипуляциям в лабораторных и/или производственных условиях. В некоторых случаях к не встречающимся в природе нуклеиновой кислоте или полипептиду относятся встречающиеся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, которые были обработаны, преобразованы или подвергнуты манипуляциям, таким образом, чтобы они проявляли свойства, которые отсутствовали у встречающихся в природе нуклеиновой кислоты или полипептида до обработки. В контексте данного описания в возможном варианте “не встречающиеся в природе” нуклеиновая кислота или полипептид являются нуклеиновой кислотой или полипептидом, выделенными или отделенными от естественного источника, в котором они были обнаружены, и в них отсутствуют ковалентные связи с последовательностями, с которыми они были ассоциированы в естественном источнике. Возможно получение “не встречающихся в природе” нуклеиновой кислоты или полипептида рекомбинантным другими способами, такими как химический синтез.

[69] В контексте данного описания термин “функционально связанный” касается соединения или близкого положения, в котором описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предусмотренным образом. Например, регуляторная последовательность, функционально связанная с нужной последовательностью нуклеиновой кислоты, способна направлять транскрипцию нужной последовательности нуклеиновой кислоты, или сигнальная последовательность, функционально связанная с нужной аминокислотной последовательностью,

способна к секретированию или перемещению нужной аминокислотной последовательности через мембрану.

[70] В контексте данного описания термин “примирующая композиция” или “примирующая иммунизация” касается первичной антигенной стимуляции 5 путем применения первой композиции согласно изобретению. Конкретно термин “примирование” или “потенцирование” иммунного ответа в контексте данного описания касается первой иммунизации с применением антигена, который вызывает иммунный ответ на нужный антиген и повторно вызывает более 10 высокий уровень иммунного ответа на нужный антиген после последующей повторной иммунизации тем же антигеном. В контексте данного описания термин “бустерная композиция” или “бустерная иммунизация” касается дополнительной иммунизации, которую применяют или которая эффективна для млекопитающего после первичной иммунизации. Так, термин “бустинг” применительно к иммунному ответу в контексте данного описания означает 15 введение композиции, доставляющей тот же антиген, который был кодирован при примирующей иммунизации.

[71] В контексте данного описания “субъект” означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно – человека, подлежащее или подвергнутое лечению с применением способа в соответствии с 20 вариантом осуществления заявленного изобретения. Термин “млекопитающее” в контексте данного описания охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, помимо прочих, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, отличных от человека приматов (НПР), таких как обезьяны, включая человекообразных, человека и т. 25 п., более предпочтительно – человека. Пациент относится к субъектам, являющимся людьми.

[72] Для облегчения чтения данной заявки описание было разделено на 30 разные абзацы или разделы или направления согласно разным вариантам осуществления заявленного изобретения. Эти деления не следует рассматривать как отделяющие содержание абзаца или раздела или варианты осуществления от содержания другого абзаца или раздела или вариантов осуществления. Наоборот, специалисту в данной области техники станет понятно, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных предусмотренных разделов, абзацев и предложений. Обсуждение

любого варианта осуществления предполагается лишь как иллюстративное, но никоим образом не означает, что объем раскрытия, включая формулу изобретения, ограничивается этими примерами. Например, хотя в возможных вариантах описанные авторами варианты осуществления РНК-репликонов альфавируса согласно заявке содержат определенные компоненты, включая, помимо прочего, определенные промоторные последовательности, энхансерные или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, кодирующую последовательность антигена ВГВ, последовательности сигнала полиаденилирования и т. п., расположенные в конкретном порядке, специалистам в данной области техники станет понятно, что раскрываемые авторами идеи точно так же применимы к другим компонентам, располагаемым в другом возможном порядке в РНК-репликонах альфавируса согласно заявке. Заявка предусматривает использование любых применимых компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, используемую в репликонах альфавируса согласно заявке, независимо от того, описывается ли прямо конкретная комбинация.

Вирус гепатита В (ВГВ)

[73] В контексте данного описания “вирус гепатита В” или “ВГВ” означает вирус семейства *hepadnaviridae*. ВГВ представляет собой малый (например, 3,2 т.п.н.) гепатотропный ДНК-вирус, кодирующий четыре открытые рамки считывания и семь белков. Семь белков, кодируемых ВГВ, включают малый (S), средний (M) и большой (L) поверхностные антигены (ГВпАг) или оболочечные (Env) белки, преконовый белок, коровый белок, вирусную полимеразу (Pol) и НВх-белок. ВГВ экспрессирует три поверхностных антигена или оболочечных белка, L, M и S, причем S является наименьшим, а L является наибольшим. Дополнительные домены в белках M и L называются Pre-S2 и Pre-S1, соответственно. Коровый белок представляет собой субъединицу вирусного нуклеокапсида. Pol требуется для синтеза вирусной ДНК (обратной транскриптазы, РНКазы H и праймера), который происходит в нуклеокапсидах, локализованных в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. PreCore представляет собой коровый белок с N-концевым сигнальным пептидом и является протеолитически процессированным на его N- и C-концах перед секрецией из инфицированных клеток в виде так называемого e-антигена гепатита В (ГВеАГ). НВх-белок требуется для эффективной транскрипции

ковалентно непрерывной кольцевой ДНК (кнкДНК). НВх не является вирусным структурным белком. Все вирусные белки ВГВ имеют собственную мРНК, за исключением коровой последовательности и полимеразы, которые имеют общую мРНК. За исключением прекорового белка, ни один из вирусных белков ВГВ не подвергается посттрансляционному протеолитическому процессингу.

[74] Вирион ВГВ содержит вирусную оболочку, нуклеокапсид и одну копию генома частично двухцепочечной ДНК. Нуклеокапсид включает 120 димеров корового белка и покрыт капсидной мембраной, включенной в S, M и L вирусные оболочечные белки или белки поверхностного антигена. После вхождения в клетку вирус теряет оболочку, и содержащая капсид релаксированная кольцевая ДНК (ркДНК) с ковалентно связанной вирусной полимеразой мигрирует в ядро. Во время этого процесса фосфорилирование корового белка вызывает структурные изменения, открывая клеточный сигнал внутриядерной локализации, обеспечивающий возможность взаимодействия капсида с так называемыми импортинами. Эти импортины опосредуют связывание корового белка с комплексами ядерных пор, после чего капсид распадается, и комплекс полимеразы / ркДНК высвобождается в ядро. В пределах ядра ркДНК становится депротенизированной (удаление полимеразы) и преобразуется механизмом репарации ДНК хозяина в геном ковалентно непрерывной кольцевой ДНК (кнкДНК), из которого перекрывающиеся транскрипты кодируют ГВеАГ, ГВпАг, коровый белок, вирусную полимеразу и НВх-белок. Коровый белок, вирусная полимеразы и прегеномная РНК (пгРНК) объединяются в цитоплазме и самособираются в незрелые содержащие пгРНК капсидные частицы, которые затем преобразуются в зрелые ркДНК-капсиды и функционируют как общее промежуточное соединение, которое либо обортывается оболочкой и секретруется в форме инфекционных вирусных частиц, либо транспортируется назад в ядро для пополнения и поддержания стабильного пула кнкДНК.

[75] В настоящее время ВГВ разделяют на четыре серотипа (adr, adw, aug, ауw) в зависимости от антигенных эпитопов, присутствующих на оболочечных белках, и на восемь генотипов (А, В, С, D, Е, F, G и H) в зависимости от последовательности вирусного генома. Генотипы ВГВ распределены по разным географическим регионам. Например, наиболее преобладающими генотипами в Азии являются генотипы В и С. Генотип D доминирует в Африке, на Ближнем

Востоке и в Индии, а генотип А широко распространен в Северной Европе, субсахарной Африке и Западной Африке.

Антигены ВГВ

[76] В контексте данного описания все термины “антиген ВГВ”, “антигенный полипептид ВГВ”, “антигенный белок ВГВ”, “иммуногенный полипептид ВГВ” и “иммуноген ВГВ” касаются полипептида, способного вызывать иммунный ответ против ВГВ в организме субъекта. Вызываемый ответ бывает гуморально- и/или клеточно-опосредованным. В возможных вариантах антиген ВГВ является полипептидом ВГВ, его фрагментом или эпитопом или комбинацией множества полипептидов ВГВ, их частей или производных. Антиген ВГВ способен вызывать в организме хозяина защитный иммунный ответ, например, вызывая иммунный ответ против вирусной болезни или инфекции, и/или создавая иммунитет (т. е., вакцинируя) субъекта против вирусной болезни или инфекции, который защищает субъекта от вирусной болезни или инфекции. Например, в возможном варианте антиген ВГВ включает полипептид или его иммуногенный(е) фрагмент(ы) из любого белка ВГВ, такого как ГВеАГ, прекодовый белок, ГВпАг (белки S, M или L), коровый белок, вирусная полимераза или НВх-белок, происходящий от любого генотипа ВГВ, например, генотипа А, В, С, D, Е, F, G и/или H, или их комбинация.

(1) Коровый антиген ВГВ

[77] В контексте данного описания каждый из терминов “коровый антиген ВГВ”, “ГВкАг” и “коровый антиген” касается антигена ВГВ, способного вызывать иммунный ответ против корового белка ВГВ в организме субъекта. Вызываемый иммунный ответ бывает гуморально- и/или клеточно-опосредованным ответом. Каждый из терминов “коровая последовательность”, “коровый полипептид” и “коровый белок” относится к вирусному коровому белку ВГВ. Коровый антиген полной длины, как правило, имеет длину 183 аминокислот и включает домен сборки (аминокислоты с 1 по 149) и домен связывания нуклеиновой кислоты (аминокислоты с 150 по 183). Состоящий из 34 остатков домен связывания нуклеиновой кислоты требуется для капсидирования прегеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта. Он включает 17 аргининовых остатков и является высокоосновным, согласно его функции. Коровый белок ВГВ является димерным в растворе, с димерами, самособирающимися в икосаэдрические капсиды. Каждый димер

корового белка имеет четыре α -спиральных пучка с примыкающим с каждой стороны α -спиральным доменом. Усеченные коровые белки ВГВ без домена связывания нуклеиновой кислоты также способны образовывать капсиды.

[78] В одном варианте осуществления заявленного изобретения антиген ВГВ является усеченным коровым антигеном ВГВ. В контексте данного описания “усеченный коровый антиген ВГВ” означает антиген ВГВ, который не содержит полной длины корового белка ВГВ, но способен вызывать иммунный ответ против корового белка ВГВ в организме субъекта. Например, в возможном варианте коровый антиген ВГВ модифицируют для удаления одной или нескольких аминокислот имеющего высокий положительный заряд (богатого аргинином) С-концевого домена связывания нуклеиновой кислоты корового антигена, который, как правило, содержит семнадцать аргининовых (R) остатков. Усеченный коровый антиген ВГВ согласно заявке предпочтительно является усеченным на С-конце коровым белком ВГВ, который не включает сигнал ядерного импорта корового белка ВГВ, и/или усеченным коровым белком ВГВ, из которого был удален С-концевой сигнал ядерного импорта корового белка ВГВ. В одном варианте осуществления усеченный коровый антиген ВГВ включает делецию в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, такую как делеция от 1 до 34 аминокислотных остатков С-концевого домена связывания нуклеиновой кислоты, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислотных остатка, предпочтительно делеция 31 - 34 С-концевых аминокислотных остатков С-концевого домена связывания нуклеиновой кислоты. В предпочтительном варианте осуществления усеченный коровый антиген ВГВ включает делецию в С-концевом домене связывания нуклеиновой кислоты, предпочтительно делецию 31 С-концевого аминокислотного остатка С-концевого домена связывания нуклеиновой кислоты.

[79] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность корового антигена ВГВ функционально связана с сигнальным пептидом для секреции. Возможно применение любого подходящего сигнального пептида. В одном варианте осуществления коровый антиген ВГВ функционально связан на его N-конце с сигнальным пептидом предшественника Цистатина S для усиления секреции. В конкретном варианте осуществления сигнальный пептид предшественника Цистатина S имеет аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 77. В другом конкретном варианте осуществления кодирующая последовательность корового антигена ВГВ функционально связана с кодирующей последовательностью сигнального пептида предшественника Цистатина S, имеющей полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 90.

[80] В возможном варианте коровый антиген ВГВ согласно заявке является консенсусной последовательностью, производной от множества генотипов ВГВ (например, генотипов А, В, С, D, E, F, G и H). В контексте данного описания “консенсусная последовательность” означает искусственную последовательность аминокислот на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков согласно определению путем выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Выравнивание проводят с применением способов или алгоритмов, известных специалистам в данной области техники, например, с применением Clustal Omega. Существует возможность расчета порядка наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, находящихся в каждой позиции в выравнивании последовательностей, на основе последовательностей антигенов ВГВ (например, коровой, ро1 и т. п.) из по меньшей мере 100 естественных изолятов ВГВ. В возможном варианте консенсусная последовательность не встречается в природе и отличается от естественных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности строят путем выравнивания множества последовательностей антигенов ВГВ из разных источников с применением средства выравнивания множественных последовательностей и в меняющихся позициях выравнивания, выбирая наиболее часто встречающуюся аминокислоту. Предпочтительно консенсусная последовательность антигена ВГВ происходит от генотипов ВГВ А, В, С и D. Термин “консенсусный антиген” применяют в отношении антигена, имеющего консенсусную последовательность.

[81] Типичный усеченный коровый антиген ВГВ согласно заявке не имеет функции связывания нуклеиновых кислот и способен вызывать у млекопитающего иммунный ответ против по меньшей мере двух из генотипов ВГВ. Предпочтительно усеченный коровый антиген ВГВ способен вызывать у млекопитающего Т-клеточный ответ по меньшей мере против генотипов ВГВ А, В, С и D. В более предпочтительном варианте усеченный коровый антиген ВГВ

способен вызывать у человека ответ Т-клеток CD8 по меньшей мере против генотипов ВГВ А, В, С и D.

[82] В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ согласно заявке включает один или несколько Т-клеточных эпитопов для аллелей АЛЧ ГКС класса I. В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ 5 включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*02:01, эпитопы АЛЧ-А*А0101, и эпитопы АЛЧ-В*40:01. Предпочтительно коровый антиген ВГВ включает два или более, например, 2, 3 или 4, Т-клеточных эпитопов, 10 выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*02:01, эпитопы АЛЧ-А*А0101 и эпитопы АЛЧ-В*40:01. В более предпочтительном варианте коровый антиген ВГВ включает Т-клеточные эпитопы АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*02:01, АЛЧ-А*А0101 и АЛЧ-В*40:01. В более предпочтительном варианте коровый антиген ВГВ включает один или несколько 15 эпитопов АЛЧ-А*11:01.

[83] В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ согласно заявке является консенсусным антигеном, предпочтительно консенсусным антигеном, производным от по меньшей мере двух, предпочтительно всех, генотипов ВГВ А, В, С и D, более предпочтительно – усеченным консенсусным 20 антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. Типичный усеченный консенсусный коровый антиген ВГВ согласно заявке состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 86, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 25 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID 30 NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. SEQ ID NO: 86 представляет собой консенсусный коровый антиген, производный от генотипов ВГВ А, В, С и D. SEQ ID NO: 7 содержит 34-аминокислотную С-концевую делецию имеющего высокий положительный заряд (богатого аргинином) домена связывания

нуклеиновой кислоты естественного корового антигена. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления коровый антиген ВГВ согласно заявке сохраняет один или несколько из С-концевых аргининовых остатков и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, чтобы таким образом восстановить эпитоп АЛЧ-А*11:01 в коровом антигене ВГВ. В некоторых вариантах осуществления последние пять С-концевых аминокислот корового антигена ВГВ включают аминокислотную последовательность VVR, более конкретно – аминокислотную последовательность VVRR (SEQ ID NO: 91), более конкретно – аминокислотную последовательность VVRRR (SEQ ID NO: 92).

[84] В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения коровый антиген ВГВ является усеченным антигеном ВГВ, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В другом конкретном варианте осуществления коровый антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, соответственно. Предпочтительно коровый антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 и кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности или кодируется полинуклеотидной последовательностью, как описано в публикации Патентной заявки США № US2019/0185828, содержание которой включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

(2) Антиген ВГВ-полимеразы

[85] В контексте данного описания термин “антиген ВГВ-полимеразы”, “Pol-антиген ВГВ” или “Pol-антиген ВГВ” относится к антигену ВГВ, способному вызывать иммунный ответ против ВГВ-полимеразы в организме субъекта. Иммунный ответ бывает гуморально- и/или клеточно-опосредованным ответом. Каждый из терминов “полимераза”, “полипептид полимеразы”, “Pol” и “pol” относится к вирусной ДНК-полимеразе ВГВ. Вирусная ДНК-полимераза ВГВ имеет четыре домена, включая, от N-конца до С-конца, домен концевоего белка (КБ), который действует как праймер для синтеза ДНК "минус-цепь"; спейсер, который является несущественным для функций полимеразы; домен обратной транскриптазы (ОТ) для транскрипции; и домен РНКазы Н.

[86] В одном варианте осуществления заявленного изобретения антиген ВГВ включает pol-антиген ВГВ или любой его иммуногенный фрагмент или комбинацию. В возможном варианте Pol-антиген ВГВ содержит другие модификации, улучшающие иммуногенность антигена, например, путем введения мутаций в активные центры доменов полимеразы и/или РНКазы для снижения или по сути удаления определенных видов ферментной активности.

[87] Предпочтительно pol-антиген ВГВ согласно изобретению не обладает активностью обратной транскриптазы или активностью РНКазы Н и способен вызывать у млекопитающего иммунный ответ против по меньшей мере двух из генотипов ВГВ. Предпочтительно pol-антиген ВГВ способен вызывать у млекопитающего Т-клеточный ответ против по меньшей мере двух, предпочтительно всех, генотипов ВГВ А, В, С и D. В более предпочтительном варианте Pol-антиген ВГВ способен вызывать ответ Т-клеток CD8 у человека по меньшей мере против генотипов ВГВ А, В, С и D.

[88] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления pol-антиген ВГВ является инактивированным Pol-антигеном. В одном варианте осуществления инактивированный Pol-антиген ВГВ включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном центре домена полимеразы. В другом варианте осуществления инактивированный Pol-антиген ВГВ включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном центре домена РНКазы Н. В предпочтительном варианте осуществления инактивированный Pol-антиген ВГВ включает одну или несколько аминокислотных мутаций в активном центре как домена полимеразы, так и домена РНКазы Н. Например, мотив “YXDD” (SEQ ID NO: 74) в домене полимеразы pol-антигена ВГВ, который требуется для связывания нуклеотида / иона металла подвергают мутации, например, путем замены одного или нескольких из аспартатных остатков (D) на аспарагиновые остатки (N), удаления или снижения функция координации металлов, что снижает или по сути удаляет функцию обратной транскриптазы. В альтернативном варианте или в дополнение к мутации мотива “YXDD” (SEQ ID NO: 74) мотив “DEDD” (SEQ ID NO: 75) в домене РНКазы Н pol-антигена ВГВ, который требуется для координации Mg^{2+} , подвергают мутации, например, путем замены одного или нескольких аспартатных остатков (D) на аспарагиновые остатки (N) и/или замены глутаматного остатка (E) на глутамин (Q), что снижает или по сути удаляет функцию РНКазы Н. В конкретном

варианте осуществления pol-антиген ВГВ модифицируют путем (1) мутации аспартатных остатков (D) в аспарагиновые остатки (N) в мотиве “YXDD” (SEQ ID NO: 74) домена полимеразы; и (2) мутации первого аспартатного остатка (D) в аспарагиновый остаток (N) и первого глутаматного остатка (E) в глутаминовый остаток (N) в мотиве “DEDD” (SEQ ID NO: 75) домена РНКазы Н, что снижает или по сути удаляет функции как обратной транскриптазы, так и РНКазы Н pol-антигена.

[89] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность pol-антигена ВГВ является функционально связанной с сигнальным пептидом для секреции. Возможно применение любых подходящих сигнальных пептидов. В одном варианте осуществления pol-антиген ВГВ функционально связан на его N-конце с сигнальным пептидом предшественника Цистатина S, для усиления секреции. В конкретном варианте осуществления сигнальный пептид предшественника Цистатина S имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В другом конкретном варианте осуществления кодирующая последовательность pol-антигена ВГВ функционально связана с кодирующей последовательностью сигнального пептида предшественника Цистатина S, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 90.

[90] В некоторых вариантах осуществления pol-антиген ВГВ согласно заявке включает один или несколько Т-клеточных эпитопов для аллелей АЛЧ ГКГС класса I. В некоторых вариантах осуществления pol-антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01 и эпитопы АЛЧ-А*A0101. Предпочтительно, pol-антиген ВГВ включает два или более, например, 2, 3 или 4, Т-клеточных эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01 и АЛЧ-А*A0101. В более предпочтительном варианте pol-антиген ВГВ включает Т-клеточные эпитопы АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02, АЛЧ-А*02:01 и АЛЧ-А*A0101. В более предпочтительном варианте pol-антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*11:01.

[91] В предпочтительном варианте осуществления заявленного изобретения pol-антиген ВГВ является консенсусным антигеном, предпочтительно консенсусным антигеном, производным от по меньшей мере

двух, предпочтительно всех, генотипов ВГВ А, В, С и D, более предпочтительно – инактивированный консенсусный антиген, производный от генотипов ВГВ А, В, С и D. Типичный ВГВ консенсусный pol-антиген согласно заявке включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9, предпочтительно по меньшей мере на 98 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 9 является консенсусным pol-антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D, включающих четыре мутации, расположенных в активных центрах доменов полимеразы и РНКазы Н. В частности, четыре мутации включают мутацию аспарагиновокислотных остатков (D) в аспарагиновые остатки (N) в мотиве “YXDD” (SEQ ID NO: 74) домена полимеразы; и мутацию первого аспартатного остатка (D) в аспарагиновый остаток (N) и мутацию глутаматного остатка (E) в глутаминовый остаток (Q) в мотиве “DEDD” (SEQ ID NO: 75) домена РНКазы Н.

[92] В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения pol-антиген ВГВ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Предпочтительно pol-антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В другом конкретном варианте осуществления pol-антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления pol-антиген ВГВ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, или кодируется полинуклеотидной последовательностью, как описано в публикации Патентной заявки США № US2019/0185828, содержание которой включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

(3) Поверхностные антигены ВГВ

[93] В контексте данного описания каждый из терминов “поверхностный антиген ВГВ”, “поверхностный антиген”, “оболочечный антиген ВГВ” и “оболочечный антиген” относятся к антигену ВГВ, способному вызывать или выявлять иммунный ответ против одного или нескольких поверхностных антигенов ВГВ или оболочечных белков в организме субъекта. Иммунный ответ

бывает гуморально- и/или клеточно-опосредованным ответом. Каждый из терминов “поверхностный белок ВГВ”, “поверхностный белок”, “оболочечный белок ВГВ” и “оболочечный белок” относится к вирусным поверхностным или оболочечным белкам ВГВ. ВГВ экспрессирует три поверхностных антигена или оболочечных белка. Ген S является геном генома ВГВ, который кодирует 5 поверхностные антигены. Ген поверхностного антигена представляет собой одну длинную открытую рамку считывания, но содержит внутри рамки три “инициирующих” (ATG) кодона, которые разделяют ген на три отрезка, pre-S1, pre-S2 и S. По причине множества иницирующих кодонов продуцируются 10 полипептиды трех разных размеров, называемые большим (L) или L-поверхностным антигеном, средним (M) или M-поверхностным антигеном и малым (S) или S-поверхностным антигеном, также называемые L, M и S оболочечными белками ВГВ. Два разных промотора (PreS1 и PreS2) приводят в действие транскрипцию кодирующих последовательностей L-, M- и S-поверхностного антигена, в результате чего образуются три разных 15 транслированных белка – оболочечные белки L, M и S. Промотор PreS2 иногда называют промотором PreS2/S, поскольку он приводит в действие транскрипцию M-поверхностного антигена и S-поверхностного антигена по отдельности. Аминокислотная последовательность L-поверхностного антигена находится в 20 рамке с последовательностями M- и S-поверхностного антигена. Таким образом, L-поверхностный антиген содержит домены M- и S-поверхностного антигена, а M-поверхностный антиген включает S-домен-поверхностного антигена. L-, M- и S-поверхностный антиген совместно являются C-концевыми и имеют полностью общий S-домен. Относительно S M имеет дополнительный домен, pre-S2, на его 25 N-конце, а относительно M L имеет домен pre-S1.

[94] В некоторых вариантах осуществления антиген ВГВ является антигеном ВГВ PreS1, который кодируется отрезком гена pre-S1 и содержит только домен Pre-S1 L-антигена. В возможных вариантах антиген PreS1 имеет разную длину, например, от 99 до 109 аминокислот. Антиген ВГВ PreS1 30 согласно заявке содержит последовательность любого из встречающихся в природе доменов PreS1 и их вариантов или производных.

[95] В других вариантах осуществления антиген ВГВ является антигеном PreS2.S ВГВ, который кодируется отрезками гена pre-S2 и S и содержит домен PreS2 и S-домен. В возможном варианте домен PreS2 имеет длину около 55

аминокислот, а S-домен содержит около 226 аминокислот. Антиген PreS2.S ВГВ согласно заявке содержит последовательности любых из встречающихся в природе доменов PreS2 и S и их вариантов или производных. В некоторых вариантах осуществления внутренний сигнальный пептид PreS2.S оставляют интактным для содействия секреции белковых продуктов PreS2.S антигенов ВГВ М и ВГВ S. В одном варианте осуществления антиген PreS2.S ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ М. В другом варианте осуществления антиген PreS2.S ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ S. В еще одном варианте осуществления антиген PreS2.S ВГВ охватывает поверхностный антиген ВГВ М и поверхностный антиген ВГВ S.

[96] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность поверхностного антигена ВГВ функционально связана с сигнальным пептидом для секреции или содержит его. Возможно применение любых подходящих сигнальных пептидов. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность антигена Pre-S1 ВГВ функционально связана на его N-конце с сигнальным пептидом предшественника Цистатина S для усиления секреции. В конкретном варианте осуществления сигнальный пептид предшественника Цистатина S имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В другом конкретном варианте осуществления кодирующая последовательность антигена Pre-S1 ВГВ функционально связана с кодирующей последовательностью сигнального пептида предшественника Цистатина S, имеющего полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 90.

[97] В одном варианте осуществления заявленного изобретения антиген ВГВ включает поверхностный антиген ВГВ или любой его иммуногенный фрагмент или их комбинацию. Поверхностный антиген ВГВ способен вызывать в организме субъекта иммунный ответ против по меньшей мере одного из белков L-поверхностного антигена, M-поверхностного антигена и S-поверхностного антигена. Предпочтительно поверхностный антиген ВГВ, такой как антиген Pre-S1 или PreS2.S, является консенсусным антигеном, предпочтительно консенсусным антигеном, производным от по меньшей мере двух из генотипов ВГВ А, В, С и D, более предпочтительно – консенсусным антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D.

[98] В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ согласно заявке включает один или несколько Т-клеточных эпитопов для аллелей АЛЧ ГКГС класса I. В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ включает один или несколько Т-клеточных эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02 и эпитопы АЛЧ-А*А2402. Предпочтительно, антиген Pre-S1 ВГВ включает один или несколько Т-клеточных эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01 и эпитопы АЛЧ-А*24:02. В более предпочтительном варианте антиген Pre-S1 ВГВ включает Т-клеточные эпитопы АЛЧ-А*11:01 и АЛЧ-А*24:02. В более предпочтительном варианте антиген Pre-S1 ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*11:01. Предпочтительно, антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько Т-клеточных эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02 и эпитопы АЛЧ-А*А2402. В более предпочтительном варианте антиген PreS2.S ВГВ включает Т-клеточные эпитопы АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02 и АЛЧ-А*А2402. В более предпочтительном варианте антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*11:01.

[99] В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения поверхностный антиген ВГВ является антигеном Pre-S1. Типичный Pre-S1 антиген согласно заявке включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения поверхностный антиген ВГВ является антигеном Pre-S2.S. Типичный антиген Pre-S2.S согласно заявке включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 5.

[100] В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения поверхностный антиген ВГВ является антигеном Pre-S1, состоящим из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В другом конкретном варианте осуществления поверхностный антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В другом конкретном варианте осуществления поверхностный антиген ВГВ является антигеном Pre-S2.S, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В другом конкретном варианте осуществления поверхностный антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 6.

5 [101]В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения поверхностный антиген ВГВ является S-поверхностным антигеном. Типичный S-поверхностный антиген согласно заявке состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79. SEQ ID NO: 81 является консенсусным S-поверхностным антигеном ВГВ, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения S-поверхностный антиген состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79. В другом конкретном варианте осуществления поверхностный антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 78.

10 [102]В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ является М-поверхностным антигеном или любым его иммуногенным фрагментом или их комбинацией. Предпочтительно М-поверхностный антиген является консенсусным антигеном, предпочтительно консенсусным антигеном, производным от по меньшей мере двух, предпочтительно всех, генотипов ВГВ А, В, С и D, более предпочтительно – консенсусным антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. Предпочтительно М-поверхностный антиген способен вызывать или выявлять иммунный ответ против М-поверхностного антигена в организме субъекта.

15 [103]Типичный М-поверхностный антиген согласно заявке включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 82. SEQ ID NO: 82 является консенсусным М-поверхностным антигеном ВГВ, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения М-поверхностный антиген состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82.

5 [104] В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ является L-поверхностным антигеном или любым его иммуногенным фрагментом или их комбинацией. Предпочтительно L-поверхностный антиген является консенсусным антигеном, предпочтительно консенсусным антигеном, производным от по меньшей мере двух, предпочтительно всех, генотипов ВГВ
10 А, В, С и D, более предпочтительно – консенсусным антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. Предпочтительно L-поверхностный антиген способен вызывать или выявлять иммунный ответ против L-поверхностный антиген в организме субъекта.

[105] Типичный L-поверхностный антиген согласно заявке включает или
15 состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83. SEQ ID NO: 83 является консенсусным L-
20 поверхностным антигеном ВГВ, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения М-поверхностный антиген состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83.

[106] В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ включает часть любого из L-, М- и S-поверхностных антигенов или любую их
25 комбинацию. Например, поверхностный антиген ВГВ включает или состоит из N-концевого домена L-поверхностного антигена. В возможном варианте поверхностный антиген ВГВ также включает или состоит из домена М-поверхностного антигена. Поверхностный антиген ВГВ также включает или состоит из N-концевого домена L-поверхностного антигена и домена М-
30 поверхностного антигена. Поверхностный антиген ВГВ также включает или состоит из N-концевого домена L-поверхностного антигена, домена М-поверхностного антигена и части домена S-поверхностного антигена.

[107] Типичный пример такого поверхностного антигена согласно заявке состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98

% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81, например, по меньшей мере на 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 81, предпочтительно по меньшей мере на 98 % идентична SEQ ID NO: 81, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 81. SEQ ID NO: 81 является консенсусным антигеном, производным от генотипов ВГВ А, В, С и D, который содержит N-концевой домен L-поверхностного антигена, полный домен M-поверхностного антигена и 15-аминокислотный C-концевой хвост из домена S-поверхностного антигена. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения поверхностный антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81. В другом конкретном варианте осуществления поверхностный антиген ВГВ кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 80, которая кодирует поверхностный антиген ВГВ. В некоторых вариантах осуществления поверхностный антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности или кодируется полинуклеотидной последовательностью, описанной в Европейской патентной заявке № 19180926, содержание которой включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

20 **Полинуклеотиды и векторы**

[108] В еще одном общем аспекте заявленное изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию нуклеиновых кислот, которые включают не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ согласно заявке, и вектор, включающий не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. В возможном варианте молекула нуклеиновой кислоты включает любую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ согласно заявке, которую получают с применением способов, известных специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения. Предпочтительно не встречающийся в природе полинуклеотид кодирует по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся усеченный коровий антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы, антиген Pre-S1 ВГВ и антиген Pre-S2.S ВГВ согласно заявке. Полинуклеотид предусмотрен в форме РНК или в форме ДНК, получаемой с применением рекомбинантных технологий (например,

клонирования) или образуемой синтетически (например, путем химического синтеза). В возможном варианте ДНК является одноцепочечной или двухцепочечной или содержит части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. ДНК включает, например, геномную ДНК, кДНК или их комбинации. Также возможен вариант, в котором полинуклеотид является гибридом ДНК/РНК. Полинуклеотиды и векторы согласно заявке применяют для образования рекомбинантного белка, экспрессии белка в клетке-хозяине или образования вирусных частиц. Предпочтительно полинуклеотид представляет собой РНК.

10 **[109]**В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85
15 или SEQ ID NO: 86, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85
20 или SEQ ID NO: 86. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует усеченный коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. Предпочтительно усеченный коровый антиген ВГВ состоит из SEQ ID
25 NO: 86.

[110]Примерами полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих усеченный коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, являются, помимо прочих, полинуклеотидная последовательность,
30 которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, соответственно, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID

NO: 89, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89. Типичные не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие усеченный коровый антиген ВГВ, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89. Предпочтительно молекула, кодирующая усеченный коровый антиген ВГВ, имеет полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 89.

[111]В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, которая включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[112]Примерами полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих Pol-антиген ВГВ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, являются, помимо прочих, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 10, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 10. Типичные не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих Pol-антиген ВГВ, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10.

[113]В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из

5 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

[114]Примерами полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, являются, помимо прочих,

10 полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, соответственно, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4,

15 предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Типичные не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антиген Pre-S1 ВГВ, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 4.

[115]В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 5, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 5. В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты кодирует антиген Pre-S2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

[116]Примерами полинуклеотидных последовательностей согласно заявке, кодирующих антиген Pre-S2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, являются, помимо прочих, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 6, соответственно, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95

%, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6, предпочтительно на 98 %, 99 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6. Типичные не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антиген Pre-S2.S ВГВ, имеют полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6.

[117] В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую, от 5' конца до 3' конца: полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген ВГВ, первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ, причем по меньшей мере один из первого и второго антигенов ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ. В некоторых вариантах осуществления не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: второй элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей второй антиген ВГВ, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген ВГВ. В некоторых вариантах осуществления не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: третий элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей третий антиген ВГВ, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ.

[118] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является независимо выбранным из группы, к которой относятся: (I) первый поверхностный антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1.

99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; (II) второй поверхностный антиген ВГВ, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3; (III) третий поверхностный антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; (IV) коровый антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7; и (V) антиген ВГВ-полимеразы, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86.

30 [119] В некоторых вариантах осуществления каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, независимо является выбранной из группы, к которой относятся: (I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген PreS1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 %

идентична SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 2; (II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген PreS1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 4; (III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 6, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6; (IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 8; и (V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

[120] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы независимо включает пептидную

последовательность, выбранную из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей A (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроса 2A (BmCPV2A), вирус флашери 2A (BmIFV2A), и их комбинация.

5 Предпочтительно каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A, такую как последовательность P2A SEQ ID NO: 11. Предпочтительно полинуклеотидной последовательностью, кодирующей пептидную последовательность P2A, является SEQ ID NO: 12.

[121]В некоторых вариантах осуществления каждая из первой, второй и 10 третьей IRES является производной от вируса энцефаломиокардита (EMCV) или Энтеровируса 71 (EV71), предпочтительно каждая из первой, второй и третьей IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

[122]В одном варианте осуществления заявленного изобретения молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает не встречающуюся в природе 15 полинуклеотидную последовательность, кодирующую, от 5' конца до 3' конца: (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную 20 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; (2) полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген 25 ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, 30 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86; (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую

кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность

5 SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную

10 последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; (12) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность,

15 кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген

20 ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно

25 состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86; (13) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную

30 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ,

PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86; (17) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86; (18) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; (19) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно

5 состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; (20) полинуклеотидную последовательность, кодирующую

10 коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий,

15 предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; (21) полинуклеотидную последовательность,

20 кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной

25 последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

30 (22) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; (23) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; и (24) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления каждый антиген ВГВ является независимо функционально связанным с сигнальной пептидной последовательностью для секреции или содержит ее. Возможно применение любой подходящей сигнальной пептидной последовательности. Предпочтительно для каждого из антигенов, к которым относятся антиген ВГВ PreS1, коровый антиген ВГВ и pol-антиген ВГВ, сигнальный пептид

функционально связан с N-концом последовательности антигена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, предпочтительно сигнальный пептид кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 90.

5 [123] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или комбинация нуклеиновых кислот включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или комбинация нуклеиновых кислот включает по меньшей мере две не
10 встречающихся в природе полинуклеотидных последовательности SEQ ID NO: с 15 по 54.

[124] Заявка также касается вектора, включающего не встречающийся в природе полинуклеотид, кодирующий антиген ВГВ. В контексте данного описания “вектор” является молекулой нуклеиновой кислоты, применяемой для
15 переноса генетического материала в другую клетку, где он реплицируется и/или экспрессируется. Возможно применение любого вектора, известного специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения. Примерами векторов являются, помимо прочих, плазмиды, вирусные векторы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений),
20 космиды и искусственные хромосомы (например, искусственные хромосомы дрожжей). Предпочтительно вектор является плазмидной ДНК. Вектор бывает ДНК-вектором или РНК-вектором. Специалист в данной области техники сможет построить вектор согласно заявке путем применения стандартных рекомбинантных технологий с учетом раскрытия настоящего изобретения.

25 [125] В возможном варианте вектор согласно заявке является вектором экспрессии. В контексте данного описания термин “вектор экспрессии” относится к любому типу генетического конструкта, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную к транскрипции. Векторы экспрессии включают, помимо прочих, векторы для экспрессии рекомбинантного белка,
30 такого как плазида ДНК или вирусный вектор и векторы для доставки нуклеиновой кислоты в организм субъекта для экспрессии в ткани субъекта, такие как плазида ДНК или вирусный вектор. Специалистам в данной области техники станет понятно, что построение вектора экспрессии зависит от таких

факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, необходимый уровень экспрессии белка и т. п.

[126] Векторы согласно заявке содержат разные регуляторные последовательности. В контексте данного описания термин “регуляторная последовательность” означает любую последовательность, обеспечивающую возможность, способствующую или модулирующую функциональную регуляцию молекулы нуклеиновой кислоты, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одной из ее производных (т. е., мРНК) в клетку-хозяин или организм. В контексте раскрытия изобретения этот термин охватывает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования и элементы, влияющие на стабильность мРНК).

[127] В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения вектор является невирусным вектором. Примерами невирусных векторов являются, помимо прочих, плазмиды ДНК, бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т. п. Предпочтительно невирусным вектором является плазида ДНК. Термин “плазида ДНК”, применяемый взаимозаменяемо с терминами “вектор на основе плазмиды ДНК”, “плазмидная ДНК” или “вектор на основе плазмидной ДНК”, означает двухцепочечную, как правило, кольцевую последовательность ДНК, способную к автономной репликации в соответствующей клетке-хозяине. Плазмиды ДНК, применяемые для экспрессии кодируемого полинуклеотида, как правило, включают источник репликации, сайт множественного клонирования и селективируемый маркер, которым является, например, ген резистентности к антибиотикам. Примерами применимых плазмидных ДНК являются, помимо прочих, векторы экспрессии серийного производства для применения в общеизвестных системах экспрессии (включая как прокариотные, так и эукариотные системы), такие как pSE420 (Invitrogen, San Diego, Калифорния, США), применяемая для продуцирования и/или экспрессии белка в *Escherichia coli*; pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), применяемая для продуцирования и/или экспрессии в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; MAXBAC[®] полная бакуловирусная система экспрессии (Thermo Fisher Scientific), применяемая для продуцирования и/или экспрессии в клетках

насекомых; pcDNA™ или pcDNA3™ (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), применяемая для экспрессии конститутивного белка высокого уровня в клетках млекопитающих; и pVAX или pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), применяемая для временной экспрессии нужного белка высокого уровня в большинстве клеток млекопитающих. Остов любой плазмиды ДНК серийного производства поддается модификации для оптимизации экспрессии белка в клетке-хозяине, например, для обращения ориентации определенных элементов (например, источника репликации и/или кассеты резистентности к антибиотикам), замены промотора, эндогенного для плазмиды (например, промотора в кассете резистентности к антибиотикам), и/или замены полинуклеотидной последовательности, кодирующей транскрибированные белки (например, кодирующей последовательности гена резистентности к антибиотикам), путем применения привычных технологий и общедоступных исходных материалов (см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)).

[128] Предпочтительно плазида ДНК является вектором экспрессии, подходящим для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Векторы экспрессии, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, помимо прочих, pcDNA™, pcDNA3™, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 и т. п. Предпочтительно вектор экспрессии образуют на основе pVAX-1, который подвергают дальнейшей модификации для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. Вектор pVAX-1 представляет собой широко используемую плазмиду в ДНК-вакцинах и содержит сильный промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ-IE) человека, после которого которым располагается производная от гормона роста крупного рогатого скота (bGH) последовательность полиаденилирования (pA). Вектор pVAX-1 также содержит источник репликации pUC и ген резистентности к канамицину, приводимый в действие малым прокариотным промотором, который обеспечивает возможность распространения бактериальной плазмиды.

[129] Также возможен вариант, в котором вектор согласно заявке является вирусным вектором. В целом вирусные векторы являются подвергнутыми генной инженерии вирусами, несущими модифицированную вирусную ДНК или РНК, которая была лишена способности к инфицированию, но по-прежнему

содержит вирусные промоторы и трансгены, таким образом, обеспечивая возможность трансляции трансгена через вирусный промотор. Поскольку вирусные векторы часто лишены инфекционных последовательностей, они требуют хелперных вирусов или упаковочных линий для крупномасштабной трансфекции. В определенных вариантах осуществления описываемый авторами вектор является, например, рекомбинантным аденовирусом, рекомбинантным ретровирусом, рекомбинантным поксвирусом, таким как вирус вакцины (например, модифицированная вакцина Анкара (МВА)), рекомбинантным альфавирусом, таким как вирус леса Семлики, рекомбинантным парамиксовирусом, таким как рекомбинантный вирус кори, или другим рекомбинантным вирусом. Примерами применимых вирусных векторов, являются, помимо прочих, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, поксвирусные векторы, энтеровирусные векторы, векторы вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы вируса леса Семлики, векторы вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. п. В определенных вариантах осуществления описываемый авторами вектор является вектором МВА. Также возможен вариант, в котором вектор является невирусным вектором.

[130] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является вектором аденовируса, например, вектором рекомбинантного аденовируса. Вектор рекомбинантного аденовируса происходит, например, от человеческого аденовируса (HAdV или AdHu) или обезьяньего аденовируса, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV) или аденовирус макака-резуса (rhAd). Предпочтительно вектор аденовируса является вектором рекомбинантного аденовируса человека, например, рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 или одним из рекомбинантных аденовирусов человека серотипов 5, 4, 35, 7, 48 и т. п. В других вариантах осуществления вектор аденовируса является вектором rhAd, например, rhAd51, rhAd52 или rhAd53. Вектор рекомбинантного вируса, применимый согласно заявленному изобретению, получают с применением способов, известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, в связи с вырождением генетического кода возможно построение нескольких нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих один и тот же полипептид. Полинуклеотид, кодирующий антиген ВГВ согласно заявке,

необязательно является кодон-оптимизированным, что гарантирует надлежащую экспрессию в клетке-хозяине (например, в клетках бактерий или млекопитающих). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники, и способы получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов хорошо известны специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения.

[131] В возможных вариантах вектор согласно заявке, например, плаزمид ДНК или вирусный вектор (в частности, аденовирусный вектор), включает любые регуляторные элементы для установления обычной(ых) функции(й) вектора, включая, помимо прочих, репликацию и экспрессию антигена(ов) ВГВ, кодируемого(ых) полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, помимо прочих, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, элемент связывания рибосомы, терминатор транскрипции, селективные маркеры, источник репликации и т. п. В возможном варианте вектор включает одну или несколько экспрессионных кассет. “Экспрессионная кассета” является частью вектора, направляющего клеточный механизм для образования РНК и белка. Экспрессионная кассета, как правило, включает три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (НТО), необязательно включающую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ОРС) является рамкой считывания, которая содержит кодирующую последовательность нужного белка (например, антигена ВГВ) от иницирующего кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы экспрессионной кассеты функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей нужный антиген ВГВ. В контексте данного описания термин “функционально связанный” следует воспринимать в его максимально широком контексте в связи со связыванием полинуклеотидных элементов в функциональной взаимозависимости. Полинуклеотид является “функционально связанным”, когда он находится в функциональной взаимозависимости с другим полинуклеотидом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Возможно применение любых компонентов, подходящих для применения в описываемой авторами экспрессионной кассете, в любой комбинации и в любом порядке для получения векторов согласно заявке.

[132]В возможном варианте вектор включает промоторную последовательность, предпочтительно в пределах экспрессионной кассеты, для контроля экспрессии нужного антигена ВГВ. Термин “промотор” применяется в его традиционном значении и касается нуклеотидной последовательности, инициирующей транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор находится на той же цепи поблизости от нуклеотидной последовательности, которую он транскрибирует. Промоторы бывают конститутивными, индуцибельными или репресслируемыми. Промоторы встречаются в природе или являются синтетическими. Возможными источниками происхождения промотора являются вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомые и животные. Промоторы бывают гомологичными (т. е., взятыми из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичными (т. е., взятыми из другого вектора или генетического источника). Например, если применяемый вектор является плазмидой ДНК, промотор бывает эндогенным по отношению к плазмиде (гомологичным) или взятым из других источников (гетерологичным). Предпочтительно промотор находится перед полинуклеотидом, кодирующим антиген ВГВ, в пределах экспрессионной кассеты.

[133]Примерами применимых промоторов являются, помимо прочих, промотор из обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинного концевой повтора (ДКП) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ALV), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как немедленно-ранний промотор ЦМВ (ЦМВ-IE), промотор вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ) или промотор вируса саркомы Рауса (VCR). Дополнительными промоторами, подходящими для применения согласно заявке, являются, помимо прочих, промотор VCR, ДКП ретровируса, главный поздний промотор аденовируса и различные промоторы поксвируса, включая, помимо прочих, следующие производные от вируса вакцины или МВА и производные от FPV промоторы: промотор 30K, промотор I3, промотор PrS, PrHyb, промотор PrS5E, Pr7.5K, длинный промотор Pr13.5, промотор 40K, промотор МВА-40K, промотор FPV 40K, промотор 30k, промотор PrSynIIm, промотор PrLE1 и промотор PR1238. Также возможен вариант, в котором промотор является промотором из

человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий креатин мышц или человеческий металлотионеин. Также возможен вариант, в котором промотор является тканеспецифическим промотором, таким как специфичный к мышцам или коже промотор, естественный или синтетический. Предпочтительно промотор является субгеномным промотором 26S или промотором T7. Нуклеотидная последовательность типичного субгеномного промотора 26S показана в SEQ ID NO: 62. Нуклеотидная последовательность типичного промотора T7 показана в SEQ ID NO: 73.

10 **[134]**В возможном варианте вектор включает дополнительные полинуклеотидные последовательности, стабилизирующие экспрессируемый транскрипт, усиливающие ядерный экспорт транскрипта РНК и/или улучшающие транскрипционно-трансляционное слияние. Примерами таких последовательностей являются сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования, как правило, находится после кодирующей последовательности для нужного белка (например, антиген ВГВ) в пределах экспрессионной кассеты вектора. Энхансерные последовательности являются регуляторными последовательностями ДНК, которые, будучи связанными факторами транскрипции, усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Энхансерная последовательность предпочтительно находится перед полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген ВГВ, но после промоторной последовательности в пределах экспрессионной кассеты вектора.

25 **[135]**Возможно применение любого сигнала полиаденилирования из известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, в возможном варианте сигналом полиаденилирования является сигнал полиаденилирования SV40 (например, SEQ ID NO: 64), сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобин человека. Предпочтительно сигналом полиаденилирования является сигнал полиаденилирования SV40. Нуклеотидная последовательность типичного сигнала полиаденилирования SV40 показана в SEQ ID NO: 64.

[136] Возможно применение любой энхансерной последовательности из известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, энхансерной последовательностью является человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий креатин мышц или вирусный энхансер, например, взятый из ЦМВ, НА, ВСП или ВЭБ. Примерами конкретных энхансеров являются, помимо прочих, посттранскрипционный регуляторный элемент ВГВ североамериканского лесного сурка (WPRE), интронная / экзонная последовательность, взятая из предшественника аполипопротеина А1 человека (ApoA1), нетранслируемый домен R-U5 длинного концевой повтора (ДКП) вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (HTLV-1), энхансер сплайсинга, синтетический интрон β -глобина кролика или любая их комбинация.

[137] В возможном варианте вектор включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность. Предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальную пептидную последовательность, находится перед полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген ВГВ. Сигнальные пептиды, как правило, направляют локализацию белка, способствуют секреции белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. Сигнальный пептид присутствует на N-конце антигена ВГВ, когда экспрессируется из вектора, но расщепляется сигнальной пептидазой, например, после секреции из клетки. Экспрессируемый белок, в котором был расщеплен сигнальный пептид, часто называют “зрелым белком”. Возможно применение любого сигнального пептида из известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, в возможном варианте сигнальный пептид является сигнальным пептидом цистатина S; сигналом секреции иммуноглобулина (Ig), таким как сигнальный пептид цистатина S, сигнальный пептид тяжелой цепи гамма-иммуноглобулина SPIgG или сигнальный пептид тяжелой цепи эpsilon-иммуноглобулина SPIgE.

[138] Также возможен вариант, в котором вектор, такой как плаزمид ДНК, включает бактериальный источник репликации и экспрессионную кассету резистентности к антибиотикам для выбора и поддержания плазмиды в бактериальных клетках, например, *E. coli*. Бактериальные источники репликации

и кассеты резистентности к антибиотикам располагаются в векторе в той же ориентации, что и экспрессионная кассета, кодирующая антиген ВГВ, или в противоположной (обратной) ориентации. Источником репликации (ORI) является последовательность, в которой иницируют репликацию, что позволяет плазмиде воспроизводиться и выживать в пределах клеток. Примерами ORI, подходящих для применения согласно заявке, являются, помимо прочих, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K и 15A, предпочтительно pUC.

[139] Экспрессионные кассеты для выбора и поддержания в бактериальных клетках, как правило, включают промоторную последовательность, функционально связанную с геном резистентности к антибиотикам. Предпочтительно промоторная последовательность, функционально связанная с геном резистентности к антибиотикам, отличается от промоторной последовательности, функционально связанной с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей нужный белок, например, антиген ВГВ. В возможном варианте ген резистентности к антибиотикам является кодон-оптимизированным, и композицию последовательности гена резистентности к антибиотикам, как правило, регулируют для бактериального использования кодона, например, в *E. coli*. Возможно применение любого гена резистентности к антибиотикам, известного специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения, включая, помимо прочего, ген резистентности к канамицину (Kan^r), ген резистентности к ампициллину (Amp^r) и ген резистентности к тетрациклину (Tet^r), а также гены, обеспечивающие резистентность к хлорамфениколу, блеомицину, спектиномицину, карбенициллину и т. п.

[140] Полинуклеотиды и векторы экспрессии, кодирующие антигены ВГВ согласно заявке, получают с применением любого способа из известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген ВГВ, вводят или “клонировать” в вектор экспрессии с применением стандартных технологий молекулярной биологии, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т. п., которые общеизвестны среди специалистов в данной области техники.

Аденовирусы

[141] В одном аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный аденовирус, включающий нуклеотидную последовательность,

кодирующую антигенный антиген ВГВ. В одном аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный коровый антиген ВГВ. В другом аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный Pol-антиген ВГВ. В другом аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий одну, две, три или четыре нуклеотидных последовательности, кодирующих антигенный антиген ВГВ, каждая из которых независимо выбрана из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ.

[142] Аденовирус согласно заявке относится к семейству *Adenoviridae* и предпочтительно относится к роду *Mastadenovirus*. Он является человеческим аденовирусом, но также возможен и аденовирус, способный инфицировать другие виды, включая, помимо прочих, аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (в том числе аденовирус макак и аденовирус человекообразных обезьян, например, аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно аденовирус является человеческим аденовирусом (HadV или AdHu; в данной заявке человеческий аденовирус подразумевается, если указывается как Ad без указания вида, например, краткое обозначение “Ad5” означает то же, что и HAdV5, то есть, человеческий аденовирус серотипа 5) или аденовирусом обезьян, таким как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV).

[143] Наиболее перспективные исследования были проведены с использованием человеческих аденовирусов, и человеческим аденовирусам отдают предпочтение согласно определенным аспектам заявленного изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно заявке лежит человеческий аденовирус. В предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит человеческий аденовирус серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49

или 50. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления заявленного изобретения аденовирус является человеческим аденовирусом одного из серотипов 26 или 35.

[144] Преимущество этих серотипов состоит в низком доминировании серотипа и/или низких уже существующих титрах нейтрализующего антитела в 5 человеческой популяции. Приготовление векторов rAd26 описывается, например, в публикации WO 2007/104792 и в публикации Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654 - 63, которые включены в данный документ путем ссылки в их полном объеме. Типичные геномные последовательности Ad26 представлены в 10 GenBank под номером доступа EF 153474 и в публикации WO2007/104792 (см., например, SEQ ID NO: 1). Приготовление векторов rAd35 описывается, например, в Патенте США № 7,270,811, в публикации WO00/70071 и публикации Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263 - 71, которые включены в данный документ путем ссылки в их полном объеме. Типичные геномные 15 последовательности Ad35 представлены в GenBank под номером доступа AC_000019 и в публикации WO00/70071 (см., например, Фигуру 6).

[145] Аденовирусы обезьян в целом также имеют низкое доминирование серотипа и/или низкие уже существующие титры нейтрализующего антитела в 20 человеческой популяции, и известно о значительном количестве работ, в которых использовали векторы аденовируса шимпанзе (например, публикации 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; см. также обзор Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849 - 62; и обзор Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333 - 39). Таким образом, в других 25 предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно заявке лежит аденовирус обезьян, например, аденовирус шимпанзе. В одном варианте осуществления заявленного изобретения в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус обезьян типа 1, 3, 7, 8, 21, 22, 30 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Аденовирусные векторы rAd26 и rAd35

[146] В предпочтительном варианте осуществления заявленного изобретения аденовирусные векторы включают капсидные белки из двух редких

серотипов: Ad26 и Ad35. В типичном варианте осуществления вектор является вирусом rAd26 или rAd35.

[147] Таким образом, векторы, подходящие для применения согласно заявке, включают капсидный белок Ad26 или Ad35 (например, волоконный, пентоновый или гексоновый белок). Специалисту в данной области техники станет понятно, что нет необходимости в использовании всего капсидного белка Ad26 или Ad35 в векторах согласно заявке. Таким образом, существует возможность использования в векторах согласно заявке химерных капсидных белков, включающих по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35. Также возможен вариант, в котором векторы согласно заявке включают капсидные белки, в которых каждый из волоконных, пентоновых и гексоновых белков происходит от своего, отличного от других, серотипа при условии, что по меньшей мере один капсидный белок происходит от Ad26 или Ad35. В предпочтительных вариантах осуществления каждый из волоконных, пентоновых и гексоновых белков происходит от Ad26 или каждый от Ad35.

[148] Специалисту в данной области техники станет понятно, что существует возможность комбинации элементов, производных от множества серотипов, в одном рекомбинантном векторе аденовируса. Таким образом, обеспечивается возможность получения химерного аденовируса, сочетающего нужные свойства из разных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный аденовирус согласно заявке сочетает отсутствие уже существующего иммунитета серотипов Ad26 и Ad35 с такими характеристиками, как температуростойкость, сборка, закрепление, выход продукта, перенаправленное или улучшенное инфицирование, устойчивость ДНК в клетке-мишени и т. п.

[149] В одном варианте осуществления заявленного изобретения рекомбинантный вектор аденовируса, применяемый согласно заявке, большей частью или полностью происходит от Ad35 или от Ad26 (т. е., вектором является rAd35 или rAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус лишен способности к репликации, например, из-за содержания делеции в области E1 его генома. Для аденовирусов согласно заявке, производных от Ad26 или Ad35, типичным является замена кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса на E4-orf6 аденовируса человеческой подгруппы C, например, Ad5. Это позволяет размножать такие аденовирусы в общеизвестных дополняющих

линиях клеток, экспрессирующих гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т. п. (см., например, публикации Havenga et al, 2006, J Gen Virol 87: 2135 - 43; WO 03/104467). В одном варианте осуществления заявленного изобретения аденовирус является человеческим аденовирусом серотипа 35 с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с областью E4 orf6 Ad5. В одном варианте осуществления заявленного изобретения аденовирус является человеческим аденовирусом серотипа 26, с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, и с областью E4 orf6 Ad5. Для аденовируса Ad35 типичным является сохранение 3' конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п. о. непосредственно перед открытой рамкой считывания pIX или фрагментом, который ее включает, например, фрагментом 243 п. о. непосредственно перед иницирующим кодоном pIX, обозначенным на 5' конце сайта рестрикции Bsu36I, поскольку это повышает устойчивость аденовируса, так как промотор гена pIX частично находится на этом участке (см., например, публикацию Havenga et al, 2006, выше; публикацию WO 2004/001032).

[150] Приготовление рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно специалистам в данной области техники. Приготовление векторов rAd26 описывается, например, в публикации WO 2007/104792 и в публикации Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654 - 63. Типичные геномные последовательности Ad26 представлены в GenBank под номером доступа EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 публикации WO 2007/104792. Приготовление векторов rAd35 описывается, например, в Патенте США № 7,270,811 и в публикации Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263 - 71. Типичная геномная последовательность Ad35 представлена в GenBank под номером доступа AC_000019.

[151] В одном варианте осуществления заявленного изобретения векторы, применяемые согласно заявке, включают те, которые описаны в публикации WO2012/082918, содержание которой включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

[152] Как правило, вектор, применимый в соответствии с заявкой, получают с применением нуклеиновой кислоты, включающей полный рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмидный, космидный или бакуловирусный

вектор). Таким образом, заявка также обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют аденовирусные векторы согласно заявке. Молекулы нуклеиновых кислот согласно заявке бывают в форме РНК или в форме ДНК, получаемой путем клонирования или образуемой синтетически. ДНК бывает двухцепочечной или одноцепочечной.

[153] Векторы аденовируса, применяемые согласно заявке, как правило, лишены способности к репликации. В этих вариантах осуществления вирус лишают способности к репликации путем делеции или инактивации областей, которые являются ключевыми для репликации вируса, таких как область E1. Эти области либо по сути удаляют, либо инактивируют, например, вставляя нужный ген (обычно связанный с промотором). В некоторых вариантах осуществления векторы согласно заявке содержат делеции в других областях, таких как E2, E3 или E4, или вставок гетерологичных генов, связанных с промотором. Для E2- и/или E4-мутированных аденовирусов, как правило, используют E2- и/или E4-дополняющие линии клеток для образования рекомбинантных аденовирусов. Мутации в области E3 аденовируса не требуют дополнения линией клеток, поскольку E3 не требуется для репликации.

[154] Пакующую линию клеток, как правило, применяют для продуцирования достаточного количества векторов аденовируса согласно заявке. Пакующая клетка – это клетка, которая включает гены, которые были делетированы или инактивированы в лишенном способности к репликации векторе, что обеспечивает возможность репликации вируса в клетке. Подходящие линии клеток включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

[155] Как было отмечено выше, в векторах экспрессируются самые различные антигены вируса гепатита В (ВГВ) (например, антигены коровой последовательности ВГВ, ВГВ-полимеразы, ВГВ Pre-S1, ВГВ PreS2.S). В случае необходимости гетерологичный ген, кодирующий антиген ВГВ, кодон-оптимизируют для обеспечения надлежащей экспрессии в организме хозяина (например, человека), подвергаемого лечению. Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники. Как правило, гетерологичный ген клонируют в область E1 и/или E3 аденовирусного генома.

[156] Гетерологичный ген вируса гепатита В контролируется (т. е., функционально связан с) производным от аденовируса промотором (например,

главным поздним промотором) или контролируется гетерологичным промотором. Примерами подходящих гетерологичных промоторов являются промотор ЦМВ и промотор ВСП. Предпочтительно промотор находится перед нужным гетерологичным геном в пределах экспрессионной кассеты.

5 Векторы МВА

[157] В векторах МВА, применяемых в соответствии с заявкой, используют аттенюированный вирус, происходящий из модифицированной вакцины вируса Анкара. Векторы МВА экспрессируют самые различные антигены ВГВ (например, антигены коровой последовательности ВГВ, ВГВ-полимеразы, ВГВ Pre-S1, ВГВ PreS2.S). В одном аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный коровый антиген ВГВ. В другом аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный Pol-антиген ВГВ.

15 В другом аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный поверхностный антиген ВГВ. В одном аспекте заявленное изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор МВА, включающий одну, две, три или четыре нуклеотидных последовательности, кодирующих

20 антигенный антиген ВГВ, каждый независимо выбранный из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ.

[158] Искусственный аттенюированный модифицированный вирус вакцины Анкара ("МВА") генерировали путем 516 последовательных пассажей на фибробластах эмбриона цыпленка штамма Анкара вируса вакцины (CVA) (обзор см. в публикации Mayr, A., et al. *Infection* 3, 6 - 14 (1975)). Вследствие этих

25 долговременных пассажей геном полученного в результате вируса МВА имел делецию около 31 т.п.н. его геномной последовательности, и, таким образом, был описан как строго ограниченный в отношении репликации птичьими

30 клетками в качестве клеток-хозяев (Meyer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031 - 1038 (1991)). На разных животных моделях было продемонстрировано, что полученный в результате МВА обладал значительной авирулентностью по сравнению с полностью репликационно-компетентным исходным материалом (Mayr, A. и Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41: 225 - 34 (1978)).

[159]Вирус МВА, применимый для практического осуществления заявленного изобретения, включает, помимо прочих, МВА-572 (депонированный как ЕСАСС V94012707 27 января 1994 г.); МВА-575 (депонированный как ЕСАСС V00120707 7 декабря 2000 г.), МВА-1721 (упоминаемый в публикации Suter et al., Vaccine 2009) и АСАМ3000 (депонированный как АТСС® РТА-5095 27 марта 2003 г.).

[160]В более предпочтительном варианте МВА, используемый в соответствии с заявкой, включает МВА-BN и производные МВА-BN. МВА-BN был описан в Международной публикации РСТ WO 02/42480. “Производные” МВА-BN означают вирусы, проявляющие по сути те же характеристики репликации, что и описываемый авторами МВА-BN, но демонстрирующие отличия в одной или нескольких частях их геномов.

[161]МВА-BN, а также его производные, лишены способности к репликации, то есть, не способны репродуктивно реплицироваться *in vivo* и *in vitro*. В частности, было описано, что *in vitro* МВА-BN или его производные способны к репродуктивной репликации в фибробластах эмбриона цыпленка (CEF), но не способны к репродуктивной репликации в линии человеческих кератиноцитов HaCat (Boukamp et al (1988), J. Cell Biol. 106: 761 - 771), линии клеток костной остеосаркомы человека 143В (депонирована в ЕСАСС под номером 91112502), линии клеток почек эмбриона человека 293 (депонирована в ЕСАСС под номером 85120602) и линии клеток аденокарциномы шейки матки человека HeLa (депонирована в АТСС под номером ССL-2). Кроме того, МВА-BN или его производные имеют коэффициент амплификации вируса по меньшей мере в два раза меньше, более предпочтительно – в три раза меньше, чем МВА-575 в клетках HeLa и линии клеток HaCaT. Испытания и анализы на эти свойства МВА-BN и их производных описаны в публикации WO 02/42480 (Патентная заявка США № 2003/0206926) и публикации WO 03/048184 (Патентная заявка США № 2006/0159699).

[162]Термин “не способный к репродуктивной репликации” или “отсутствие способности к репродуктивной репликации” в линии клеток человека *in vitro*, как было описано в предыдущих абзацах, описывается, например, в публикации WO 02/42480, в которой также описан способ получения МВА, имеющего вышеупомянутые нужные свойства. Термин касается вируса, имеющего коэффициент амплификации вируса *in vitro* через 4 дня после

инфицирования менее 1, согласно анализам, описанным в публикации WO 02/42480 или в Патенте США № 6,761,893.

5 [163] Термин “неспособность к репродуктивной репликации” относится к вирусу, имеющему коэффициент амплификации вируса в линиях клеток человека *in vitro*, как описывается в предыдущих абзацах, через 4 дня после инфицирования менее 1. Анализ, описываемый в публикации WO 02/42480 или в Патенте США № 6,761,893, применимы для определения коэффициента амплификации вируса.

10 [164] Амплификацию или репликацию вируса в линиях клеток человека *in vitro*, как описывается в предыдущих абзацах, обычно выражают как соотношение вируса, продуцируемого из инфицированной клетки (выход) с количеством, первоначально используемым для инфицирования клетки (вход), которое называют “коэффициентом амплификации”. Коэффициент амплификации “1” определяет состояние амплификации, при котором
15 количество вируса, продуцируемого из инфицированных клеток, является таким же, как и количество, первоначально используемое для инфицирования клеток, что означает, что инфицированные клетки допустимы для инфицирования вирусом и воспроизводства вируса. Если же коэффициент амплификации составляет менее 1, т. е., снижение выходного уровня по сравнению с входным
20 уровнем, это означает отсутствие репродуктивной репликации, а значит, и аттенюации вируса.

[165] Преимущества вакцины на основе МВА включают их профиль безопасности, а также доступность для крупномасштабного производства вакцин. Доклинические испытания обнаружили, что МВА-ВН демонстрирует
25 превосходную аттенюацию и эффективность по сравнению с другими штаммами МВА (WO 02/42480). Дополнительным свойством штаммов МВА-ВН является способность к вызыванию по сути такого же уровня иммунитета в режимах примирования вирусом вакцины / бустер-иммунизации вирусом вакцины в сравнении с режимами ДНК-примирования / бустер-иммунизации вирусом
30 вакцины.

[166] Рекомбинантные вирусы МВА-ВН, как наиболее предпочтительный вариант осуществления данного изобретения, считают безопасными по причине их явной неспособности к репликации в клетках млекопитающих и их неизменной авирулентности. Кроме того, помимо их эффективности,

преимуществом является и возможность производства в промышленных масштабах. К тому же, вакцины на основе МВА способны доставлять множество гетерологичных антигенов и позволяют одновременно вызывать гуморальный и клеточный иммунитет.

5 **[167]** Векторы МВА, применимые с точки зрения данной заявки, приготавливают с применением способов, известных специалистам в данной области техники, таких как описываемые в публикациях WO/2002/042480 и WO/2002/24224, соответствующие описания которых включены в данный документ путем ссылки.

10 **[168]** В предпочтительном варианте осуществления заявленного изобретения вектор(ы) МВА включают нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или несколько антигенных белков, выбранных из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, Pol-антиген ВГВ и поверхностные антигены ВГВ.

15 **[169]** Белок антигена ВГВ вставляют в одну или несколько межгенных областей (IGR) МВА. В одном варианте осуществления заявленного изобретения IGR выбирают из IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и IGR 148/149. В одном варианте осуществления заявленного изобретения менее чем 5, 4, 3 или 2 IGR рекомбинантного МВА включают гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты корового антигена ВГВ и/или Pol-антигена ВГВ. Гетерологичные нуклеотидные последовательности в дополнительном или альтернативном варианте вставляют в один или несколько из встречающихся в природе сайтов делеции, в частности, в главные сайты делеции I, II, III, IV, V или VI генома МВА. В одном варианте осуществления заявленного изобретения менее чем 5, 4, 3 или 2 из встречающихся в природе сайтов делеции рекомбинантного МВА включают гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты корового антигена ВГВ и/или Pol-антигена ВГВ.

20 **[170]** Число сайтов инсерции МВА, включающих гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты белка ВГВ, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более. В одном варианте осуществления заявленного изобретения гетерологичные нуклеотидные последовательности вставляют в 4, 3, 2 или менее сайтов инсерции. Предпочтительно используют два сайта инсерции. В одном варианте

осуществления заявленного изобретения используют три сайта инсерции. Предпочтительно рекомбинантный МВА включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, вставленных в 2 или 3 сайта инсерции.

[171] Рекомбинантные вирусы МВА, обеспечиваемые согласно изобретению, вырабатывают с применением привычных способов, известных специалистам в данной области техники. Способы получения рекомбинантных поксвирусов или вставки экзогенных кодирующих последовательностей в поксвирусный геном являются общеизвестными среди специалистов в данной области техники. Например, способы стандартных технологий молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, вестерн-блоттинг, технологии RT-ПЦР и ПЦР-амплификации, описаны в публикации *Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.)* (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), а технологии обращения и манипуляций с вирусами описаны в публикации *Virology Methods Manual* (B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)). Подобным образом технологии и практическая информация, касающиеся обращения, манипуляций и генной инженерии МВА, описаны в публикациях *Molecular Virology: A Practical Approach* (A.J. Davison и R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)) и *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Son, Inc. (1998) (см., например, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)).

[172] Для генерирования различных раскрываемых авторами рекомбинантных МВА применяют разные способы. Последовательность ДНК, которая должна быть вставлена в вирус, помещают в плазмидный конструкт *E. coli*, в который была вставлена ДНК, гомологичная отрезку ДНК МВА., Подлежащую вставке последовательность ДНК отдельно пришивают к промотор. В возможном варианте сцепка промотор-ген располагается в плазмидном конструкте таким образом, чтобы по обе стороны к этой сцепке промотор-ген примыкали ДНК, гомологичные последовательности ДНК, фланкирующей по отношению к области ДНК МВА, содержащей несущественный локус. Полученный в результате плазмидный конструкт амплифицируют путем размножения в бактериях *E. coli* и выделяют. Выделенную плазмиду, содержащую генную последовательность ДНК,

подлежащую вставку, трансфицируют в культуру клеток, например, фибробластов эмбриона цыпленка (CEF), одновременно с инфицированием культуры МВА. Рекомбинация между гомологичной ДНК МВА в плазмиде и вирусном геноме, соответственно, способна генерировать МВА, модифицированный присутствием инородных последовательностей ДНК.

[173] Согласно предпочтительному варианту осуществления, клетку соответствующей культуры клеток, например, клеток CEF, инфицируют поксвирусом. Инфицированную клетку затем трансфицируют первым плазмидным вектором, включающим инородный или гетерологичный ген или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем элемент контроля экспрессии поксвируса. Как объяснялось выше, плазмидный вектор также включает последовательности, способные направлять вставку экзогенной последовательности в выбранную часть поксвирусного генома. Необязательно плазмидный вектор также содержит кассету, включающую маркерный и/или селекционный ген, функционально связанный с поксвирусным промотором.

[174] Подходящими маркерными или селекционными генами являются, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок, β -галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Применение селекционных или маркерных кассет упрощает идентификацию и выделение сгенерированного рекомбинантного поксвируса. Однако рекомбинантный поксвирус также идентифицируют путем применения технологии ПЦР. Затем следующую клетку инфицируют рекомбинантным поксвирусом, получаемым как описано выше, и трансфицируют вторым вектором, включающим второй инородный или гетерологичный ген или гены. В случае, если этот ген подлежит введению в другой сайт инсерции поксвирусного генома, второй вектор также отличается в гомологичных поксвирусу последовательностях, направляющих включение второго инородного гена или генов в геном поксвируса. После осуществления гомологичной рекомбинации рекомбинантный вирус, включающий два или более инородных или гетерологичных гена, выделяют. Для введения дополнительных инородных генов в рекомбинантный вирус этапы инфицирования и трансфекции повторяют путем использования рекомбинантного вируса, выделенного на предыдущих этапах, для инфицирования и путем использования другого вектора, включающего другой инородный ген или гены, для трансфекции.

[175] В альтернативном варианте этапы инфицирования и трансфекции, как описано выше, являются взаимозаменяемыми, т. е., подходящую клетку сначала трансфицируют плазмидным вектором, включающим инородный ген, а потом инфицируют поксвирусом. В качестве еще одной альтернативы также возможно введение каждого инородного гена в разные вирусы, совместное инфицирование клетки всеми полученными рекомбинантными вирусами и отбор на рекомбинант, включающий все инородные гены. Третья альтернатива состоит в сшивании генома ДНК и инородных последовательностей *in vitro* и воссоздание генома ДНК рекомбинированного вируса вакцины с использованием хелперного вируса. Четвертая альтернатива состоит в гомологичной рекомбинации в *E. coli* или другом бактериальном виде между геномом вируса вакцины, например, МВА, клонированном как бактериальная искусственная хромосома (БИХ), и линейной инородной последовательностью, фланкированной последовательностями ДНК, гомологичными последовательностям, фланкирующим нужный сайт введения в геном вируса вакцины.

[176] Гетерологичный ген ВГВ (например, коровый антиген ВГВ, р0-антиген ВГВ и/или поверхностный антиген ВГВ) контролируется (т. е., функционально связан с) одним или несколькими промоторами поксвируса. В одном варианте осуществления заявленного изобретения промотором поксвируса является промотор Pr7.5, гибридный ранний / поздний промотор или промотор PrS, промотор PrS5E, синтетический или естественный ранний или поздний промотор, или промотор вируса коровьей оспы ATI.

РНК-репликоны

[177] Предпочтительно вектор представляет собой самореплицирующийся РНК-репликон. В контексте данного описания термин “самореплицирующаяся молекула РНК”, применяемый взаимозаменяемо с термином “самоамплифицирующаяся молекула РНК” или “РНК-репликон” или “РНК-репликон” или “саРНК” относится к РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для направления собственной амплификации или саморепликации в пределах допустимой клетки, в возможных вариантах – клетки человека, млекопитающего или животного. Самореплицирующаяся молекула РНК напоминает мРНК. Она является одноцепочечной, 5'-кэпированной и 3'-полиаденилированной и имеющей положительную ориентацию. Для направления собственной репликации молекула РНК 1)

кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, способные взаимодействовать с вирусными или происходящими из клетки-хозяина белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами для катализа процесса амплификации РНК; и 2) содержит действующие в цис-положении последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции субгеномной кодируемой репликоном РНК. Таким образом, доставленная РНК ведет к продуцированию множества дочерних РНК. Эти дочерние РНК, а также коллинеарные субгеномные транскрипты сами способны к трансляции для обеспечения *in situ* экспрессии нужного гена или поддаются трансляции для обеспечения дополнительных транскриптов с тем же направлением, что и доставленная РНК, которые транслируются для обеспечения *in situ* экспрессии нужного гена. Общим результатом этой последовательности транскрипций является существенная амплификация во множестве введенных репликонов РНК, и, таким образом, нужный кодируемый ген становится главным полипептидным продуктом клеток.

[178] РНК-репликон 1) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, способную взаимодействовать с вирусными или происходящими из клетки-хозяина белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами для катализа процесса амплификации РНК, и неструктурными белками nsP1, nsP2, nsP3, nsP4; и 2) содержит действующие в цис-положении последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции геномных и субгеномных РНК, таких как 3'- и 5'-нетранслируемые области (НТО; нуклеотидные последовательности альфавируса для неструктурной опосредуемой белком амплификации) и/или субгеномный промотор. Эти последовательности связывают в процессе репликации с самокодирующимися белками или несамокодирующимися белками клеточного происхождения, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления модифицированная молекула РНК-репликона, как правило, содержит следующие расположенные по порядку элементы: 5' последовательность(и) вирусной РНК, необходимая(ые) в цис-положении для репликации (например, 5' НТО и 5' CSE), последовательности, кодирующие биологически активные неструктурные белки (например, nsP1234), промотор для транскрибирования субгеномной РНК, 3' вирусные последовательности, необходимые в цис-положении для репликации

(например, 3' НТО), и полиаденилатный тракт и, необязательно, последовательность (или две или более последовательностей), кодирующую гетерологичный белок или пептид после субгеномного промотора или под его контролем. Кроме того, термин "РНК-репликон" относится к положительно-полярной (или смысловой) молекуле, и РНК-репликон имеет длину, которая в некоторых вариантах отличается от длины любых известных встречающихся в природе РНК-вирусов. В возможных вариантах осуществления раскрытия настоящего изобретения РНК-репликон не имеет (или не содержит) последовательности(ей) по меньшей мере одного (или всех) из структурных вирусных белков (например, нуклеокапсидного белка С и оболочечных белков Р62, 6К и Е1). В этих возможных вариантах осуществления последовательности, кодирующие один или несколько структурных генов, замещены одной или несколькими гетерологичными последовательностями, такими как, например, кодирующая последовательность для по меньшей мере одного гетерологичного белка или пептида (или другого нужного гена (GOI)).

[179]В определенных вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: (1) 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК; (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один, предпочтительно все, из неструктурных белков вируса РНК; (3) субгеномный промотор вируса РНК; (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ; и (5) 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК.

[180]В определенных вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК кодирует ферментный комплекс для самоамплификации (полипротеин репликазы), включающий РНК-зависимую функцию РНК-полимеразы, геликазу, кэппинг и полиаденилирующую активность. Вирусные структурные гены, расположенные после репликазы, находящиеся под контролем субгеномного промотора, бывают замещены антигеном ВГВ. После трансфекции репликаза транслируется немедленно, взаимодействует с 5' и 3' концами геномной РНК и синтезирует копии комплементарной геномной РНК. Они служат матрицами для синтеза новых положительно-цепочечных, кэппированных и полиаденилированных геномных копий и субгеномных

транскриптов. Амплификация в итоге ведет к очень большому числу копий РНК, до 2×10^5 копий на клетку. Таким образом, намного меньшее количество саРНК по сравнению с традиционной мРНК является достаточным для достижения эффективного переноса генов и защитной вакцинации (Beissert et al., Hum Gene Ther. 2017, 28(12): 1138 - 1146).

[181]Субгеномная РНК является молекулой РНК, имеющей меньшую длину или размер по сравнению с геномной РНК, от которой она происходит. Вирусную субгеномную РНК транскрибируют из внутреннего промотора, последовательности которого находятся в пределах геномной РНК или ее комплемента. Транскрипция субгеномной РНК опосредуется кодируемой(ыми) вирусом полимеразой(ами), ассоциированной(ыми) с кодируемыми клеткой-хозяином белками, рибонуклеопротеином(ами) или их комбинацией. Многие РНК-вирусы генерируют субгеномные мРНК (сгРНК) для экспрессии их 3'-проксимальных генов.

[182]В некоторых вариантах осуществления раскрытия настоящего изобретения антиген ВГВ экспрессируется под контролем субгеномного промотора. В определенных вариантах осуществления вместо природного субгеномного промотора субгеномную РНК помещают под контроль сайта внутренней посадки рибосомы (IRES), происходящего из вирусов энцефаломиокардита (EMCV), вирусов диареи крупного рогатого скота (BVDV), полиовирусов, вирусов ящура (FMD), энтеровируса 71 (EV71) или вирусов гепатита С. Субгеномные промоторы насчитывают от 24 нуклеотидов (вирус Синдбис) до более чем 100 нуклеотидов (вирус некротических желтых прожилок свеклы) и обычно находятся перед стартом транскрипции.

[183]В некоторых вариантах осуществления РНК-репликация включает кодирующую последовательность для по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех неструктурных вирусных белков (например, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Геномы альфавируса кодируют неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, продуцируемые как единый предшественник полипротеина, иногда обозначаемый как P1234 (или nsP1-4 или nsP1234) и расщепляемый на зрелые белки путем протеолитического процессинга. NsP1 имеет размер около 60 кДа и в возможных вариантах обладает активностью метилтрансферазы и участвует в реакции вирусного кэппинга. NsP2 имеет размер около 90 кДа и в возможных вариантах обладает

активностью геликазы и протеазы, тогда как nsP3 имеет размер около 60 кДа и содержит три домена: макродомен, центральный (или уникальный для альфавируса) домен и гипервариабельный домен (HVD). NsP4 имеет размер около 70 кДа и содержит зависимый от коровой РНК каталитический домен РНК-полимеразы (RdRp). После инфицирования геномную РНК альфавируса транслируют для получения полипротеина P1234, который расщепляют на отдельные белки. В раскрытии нуклеиновокислотных или полипептидных последовательностей, например, последовательностей nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, также раскрываются последовательности, считающиеся построенными на основе изначальной последовательности или производными от нее.

[184] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон включает кодирующую последовательность для части по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. Например, в возможном варианте РНК-репликон включает около 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, или процент в диапазоне между любыми двумя из этих значений, кодирующей последовательности для по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон включает кодирующую последовательность для существенной части по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. В контексте данного описания “существенная часть” нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей неструктурный вирусный белок, включает достаточную часть нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей неструктурный вирусный белок, для обеспечения возможности предполагаемой идентификации этого белка, либо путем ручной оценки последовательности со стороны специалиста в данной области техники, либо путем компьютерно-автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с применением таких алгоритмов, как BLAST (см., например, “Basic Local Alignment Search Tool”; Altschul S F et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410, 1993). В некоторых возможных вариантах осуществления РНК-репликон включает полную кодирующую последовательность для по меньшей мере одного неструктурного белка. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон включает по сути всю кодирующую последовательность для естественных вирусных неструктурных белков. В определенных вариантах осуществления один или несколько неструктурных вирусных белков происходят от одного

вируса. В других вариантах осуществления один или несколько неструктурных белков происходят от разных вирусов.

[185]В возможном варианте РНК-репликон происходит от любых подходящих РНК-вирусов "плюс-цепь", таких как альфавирусы или флавивирусы. Предпочтительно РНК-репликон происходит от альфавирусов. Термином "альфавирус" описывают оболочечные одноцепочечные положительно-полярные РНК-вирусы семейства *Togaviridae*. Род альфавирусов включает приблизительно 30 представителей, способных инфицировать человека, а также других животных. Частицы альфавируса, как правило, имеют диаметр 70 нм, имеют тенденцию к сферичности или некоторой плеоморфности и имеют 40 нм изометрический нуклеокапсид. Общая длина генома альфавирусов составляет от 11 000 до 12 000 нуклеотидов и включает 5'-кэп и 3'-поли-А хвост. В геноме существует две открытые рамки считывания (ОРС): неструктурная (НС) и структурная. НС ОРС кодирует белки (nsP1-nsP4), необходимые для транскрипции и репликации вирусной РНК. Структурная ОРС кодирует три структурных белка: коровый нуклеокапсидный белок С и оболочечные белки Р62 и Е1, которые ассоциируются как гетеродимер. Закрепленные на вирусной мембране поверхностные гликопротеины отвечают за распознавание рецептора и включение в клетки-мишени через мембранное слияние. Четыре гена НС-белка кодируются генами в двух третях 5'-конца генома, тогда как три структурных белка транслируются из субгеномной мРНК, коллинеарной с одной третью 3'-конца генома.

[186]В некоторых вариантах осуществления самореплицирующейся РНК, применяемой согласно изобретению, является РНК-репликон, происходящий из видов рода альфавирусов. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон альфавируса происходит из альфавируса, относящегося к группе VEEV/EEEV или группе SF, или группе SIN. Неограничивающими примерами группы SF альфавирусов являются вирус леса Семлики, вирус о'Ньонг-ньонг, вирус лихорадки Росс-Ривер, вирус Миддлбург, вирус чикунгунья, вирус леса Барма, вирус Гета, вирус Майаро, вирус Сагияма, вирус Бебару и вирус Уна. Неограничивающими примерами группы SIN альфавирусов являются вирус Синдбис, вирус Girdwood S.A., южноафриканский арбовирус № 86, вирус Окельбо, Вирус Аура, вирус Бабанки, вирус Ватароа и вирус Кызылагач. Неограничивающими примерами группы VEEV/EEEV альфавирусов являются

вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MIDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV),
 5 вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV) и вирус Уна (UNAV).

[187] Неограничивающими примерами видов альфавирусов являются вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус
 10 леса Семлики (SFV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MIDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAUV), вирус Бабанки
 15 (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлэнд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндуму (NDUV) и вирус Багги Крик. Подходящими являются как вирулентные, так и авирулентные штаммы альфавируса. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликация альфавируса относится к вирусу Синдбис (SIN), вирусу леса
 20 Семлики (SFV), вирусу лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирусу венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) или вирусу восточного энцефалита лошадей (EEEV). В некоторых вариантах осуществления РНК-репликация альфавируса относится к вирусу венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV).

[188] В определенных вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК включает полинуклеотид, кодирующий один или несколько
 25 неструктурных белков nsP1-4, субгеномный промотор, такой как субгеномный промотор 26S, и нужный ген, кодирующий антиген ВГВ или его описанный авторами фрагмент.

[189] В возможном варианте самореплицирующаяся молекула РНК имеет 5'-
 30 кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп способен усиливать *in vivo* трансляцию РНК.

[190] 5'-нуклеотид самореплицирующейся молекулы РНК, применяемый согласно изобретению, имеет 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК он

связан с 7-метилгуанозином через мостик 5'-5'. 5'-трифосфат способен усиливать связывание RIG-I.

5 [191]В возможном варианте самореплицирующаяся молекула РНК имеет 3'-поли-А хвост. Она также включает распознающую последовательность поли-А-полимеразы (например, AAUAAA) возле 3'-конца.

10 [192]В любом из возможных вариантов осуществления раскрытия настоящего изобретения РНК-репликон бывает лишен (или не содержит) кодирующей(их) последовательности(ей) по меньшей мере одного (или всех) из структурных вирусных белков (например, нуклеокапсидного белка С и оболочечных белков Р62, 6К и Е1). В этих возможных вариантах осуществления последовательности, кодирующие один или несколько структурных генов, замещены одной или несколькими гетерологичными последовательностями, такими как, например, кодирующая последовательность для антигена ВГВ или ее фрагмент, как описано авторами.

15 [193]В определенных вариантах осуществления самореплицирующийся РНК вектор согласно заявке включает одну или несколько особенностей для обеспечения резистентности к трансляционному ингибированию со стороны врожденной иммунной системы или для повышения экспрессии GOI (например, антигена ВГВ) другим способом.

20 [194]В определенных вариантах осуществления последовательность РНК является кодон-оптимизированной для улучшения эффективности трансляции. Молекулу РНК модифицируют любым способом, известным специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения для повышения устойчивости и/или трансляции, например, путем добавления поли-
25 А хвоста, например, из по меньшей мере 30 аденозиновых остатков; и/или кэппинга 5'-конца модифицированным рибонуклеотидом, например, 7-метилгуанозиновым кэпом, который включают во время синтеза РНК или подвергают ферментной инженерии после транскрипции РНК.

30 [195]В определенных вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает, в порядке от 5'- до 3'-конца, (1) 5'-нетранслируемую область альфавируса (5'-НТО), (2) последовательность 5'-репликации неструктурного гена nsr1 альфавируса, (3) правый петлевой (DLP) мотив вида вируса, (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый пептид аутопротеазы, (5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую

неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса, (6) субгеномный промотор альфавируса, (7) не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую один или несколько антигенов ВГВ согласно заявке, (8) 3'-нетранслируемую область альфавируса (3'-НТО) и (9) необязательно последовательность полиаденозина.

[196] В определенных вариантах осуществления самореплицирующийся РНК вектор согласно заявке включает правый петлевой (DLP) мотив вида вируса. В контексте данного описания “правый петлевой” или “DLP-мотив” означает полинуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере одну шпильку РНК, которая, будучи помещенной после иницирующего кодона открытой рамки считывания (ОРС), обеспечивает повышенную трансляцию ОРС по сравнению с идентичным в других отношениях конструктом без мотива DLP. Например, представители рода альфавирусов бывают резистентными к активации активированной противовирусной РНК протеинкиназы (PKR) посредством рельефной структуры РНК, присутствующей в вирусных транскриптах 26S, что обеспечивает возможность eIF2-независимой инициации трансляции этих мРНК. Эта структура, называемая правой петлевой (DLP), располагается после AUG в SINV 26S мРНК. DLP также обнаружена в вирусе леса Семлики (SFV). Известно, что подобные структуры DLP присутствуют в по меньшей мере 14 других представителях рода альфавирусов, включая представителей Нового Света (например, MAYV, UNAV, EEEV (NA), EEEV (SA), AURAV) и Старого Света (SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV и ONNV). Прогнозируемые структуры этих 26S мРНК альфавируса строили на основе данных SHAPE (селективного ацилирования 2'-гидроксила и удлинения праймера) (см. публикацию Toribio et al., *Nucleic Acids Res.* May 19; 44(9): 4368 - 80, 2016), содержание которой включено в данный документ путем ссылки). Устойчивые шпилечные структуры обнаруживали во всех случаях, за исключением CHIKV и ONNV, тогда как MAYV и EEEV демонстрировали DLP меньшей устойчивости (Toribio et al., 2016, выше). В случае вируса Синдбис мотив DLP обнаруживают в первых 150 нуклеотидах субгеномной РНК Синдбис. Шпилька расположена после иницирующего кодона AUG капсида Синдбис (AUG находится в нуклеотиде 50 субгеномной РНК Синдбис). Предыдущие исследования со сравнением последовательностей и структурным анализом РНК обнаружили эволюционную консервативность DLP

в SINV и позволили спрогнозировать существование эквивалентных структур DLP у многих представителей рода альфавирусов (см., например, публикацию Ventoso, J. Virol. 9484 - 9494, Vol. 86, September 2012). Примеры самореплицирующегося РНК-вектора, включающего DLP-мотив, описаны в публикации Патентной заявки США US2018/0171340 и публикации Международной патентной заявки WO2018106615, содержание которых включено в данный документ путем ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает DLP-мотив, демонстрирующий по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности последовательностей с последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 57.

[197] В одном варианте осуществления самореплицирующаяся молекула РНК также содержит кодирующую последовательность для пептида аутопротеазы, функционально связанного после мотива DLP и перед кодирующими последовательностями неструктурных белков (например, одного или нескольких из nsр1-4) нужного гена (например, описанного авторами антигена ВГВ). Примерами пептида аутопротеазы являются, помимо прочих, пептидная последовательность, выбранная из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2А (P2A), вирус ящура (FMDV) 2А (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2А (E2A), вирус *Thosea asigna* 2А (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроса 2А (BmCPV2A), вирус флашери 2А (BmIFV2A) и их комбинация. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает кодирующую последовательность для P2A, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. Предпочтительно кодирующая последовательность демонстрирует по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности последовательностей с последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 12.

[198] Любые репликоны согласно изобретению в возможных вариантах также включают 5'- и 3'-нетранслируемую область (НТО). НТО бывают последовательностями НТО альфавируса дикого типа из Нового Света или Старого Света или последовательностью, производной от любой из них. В

разных возможных вариантах осуществления 5' НТО имеет любую подходящую длину, например, около 60 нуклеотидов или 50 - 70 нуклеотидов или 40 - 80 нуклеотидов. В некоторых возможных вариантах осуществления 5' НТО также имеет консервативные первичные или вторичные структуры (например, одну или несколько шпилек) и участвует в репликации альфавируса или РНК-репликона. В некоторых возможных вариантах осуществления 3' НТО насчитывает до нескольких сотен нуклеотидов, например, 50 - 900 или 100 - 900 или 50 - 800 или 100 - 700 или 200 нуклеотидов – 700 нуклеотидов. В возможных вариантах осуществления 3' НТО также имеет вторичные структуры, например, *step loop*, с последующим расположением полиаденилатного тракта или поли-А хвоста. В любом из вариантов осуществления изобретения возможна функциональная связь 5'- и 3'-нетранслируемых областей с любой из других последовательностей, кодируемых репликоном. НТО функционально связывают с промотором и/или последовательностью, кодирующей гетерологичный белок или пептид, путем обеспечения последовательностей и интервалов, необходимого для распознавания и транскрипции других кодируемых последовательностей. Возможно использование любого сигнала полиаденилирования, известного специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, в возможном варианте сигналом полиаденилирования является сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобина человека.

[199] В другом варианте осуществления самореплицирующийся РНК-репликон согласно заявке включает модифицированную 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), причем предпочтительно РНК-репликон лишен по меньшей мере части нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей вирусные структурные белки. Например, модифицированная 5'-НТО включает одно или несколько нуклеотидных замещений в позиции 1, 2, 4 или их комбинацию. Предпочтительно модифицированная 5'-НТО включает нуклеотидное замещение в позиции 2, в более предпочтительном варианте модифицированная 5'-НТО имеет замещение U->G или U->A в позиции 2. Примеры таких самореплицирующихся молекул РНК описаны в публикации Патентной заявки США US2018/0104359 и публикации Международной патентной заявки

WO2018075235, содержание которых включено в данный документ путем ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает 5'-НТО, демонстрирующую по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности последовательностей с последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 55.

[200] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает, в порядке от 5'- до 3'-конца, (1) 5'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 55, (2) последовательность 5'-репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56, (3) мотив DLP, включающий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 57, (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность P2A SEQ ID NO: 11, (5) полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные белки nsp1, nsp2, nsp3 и nsp4 альфавируса, имеющие нуклеиновокислотные последовательности SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно, (6) субгеномный промотор, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 62, (7) не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, как описано авторами, и (8) 3'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность P2A, включает SEQ ID NO: 12, не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54, и РНК-репликон также включает последовательность полиаденозина. Предпочтительно последовательность полиаденозина имеет последовательность SEQ ID NO: 64 на 3'-конце репликона.

[201] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 65 по 72.

[202] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно заявке включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную пептидную последовательность. Предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальную пептидную последовательность,

расположена перед 5'-концевой полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген ВГВ, такой как антиген PreS1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и ро1-антиген ВГВ, или на этой последовательности. Сигнальные пептиды, как правило, направляют локализацию белка, способствуют секреции белка из клетки, в которой он продуцируется, и/или улучшают экспрессию антигена и перекрестную презентацию антигенпрезентирующим клеткам. В возможных вариантах сигнальный пептид присутствует на N-конце антигена ВГВ, когда экспрессируется из репликона, но расщепляется сигнальной пептидазой, например, после секреции из клетки. Экспрессируемый белок, в котором был расщеплен сигнальный пептид, часто называют "зрелым белком". Возможно использование любого сигнального пептида, известного специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения. Например, в возможном варианте сигнальным пептидом является сигнальный пептид цистатина S; сигнал секреции иммуноглобулина (Ig), такой как сигнальный пептид цистатина S, сигнальный пептид тяжелой цепи гамма-иммуноглобулина SPIgG, сигнальный пептид тяжелой цепи эpsilon-иммуноглобулина SPIgE или короткая лидерная пептидная последовательность. Типичная аминокислотная последовательность сигнального пептида показана в SEQ ID NO: 77.

[203] В различных возможных вариантах осуществления раскрываемые авторами РНК-репликоны представляют собой подвергнутые инженерии, синтетические или рекомбинантные РНК-репликоны. В контексте данного описания термин "рекомбинантный" означает любую молекулу (например, ДНК, РНК и т. п.), которая является результатом, хотя и непрямым, манипуляций над полинуклеотидом со стороны человека. Неограничивающим примером молекулы рекомбинантной ДНК является кДНК, так же, как и любая молекула нуклеиновой кислоты, сгенерированная путем полимеразной(ых) реакции(й) *in vitro*, или к которой были прикреплены линкеры, или которая была включена в вектор, такой как клонирующий вектор или вектор экспрессии. Неограничивающими примерами рекомбинантного РНК-репликона являются один или несколько из следующих: 1) синтезированный или модифицированный *in vitro*, например, с применением химических или ферментных технологий (например, с применением химического синтеза нуклеиновых кислот или путем применения ферментов для репликации, полимеризации, экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, сшивания, обратной

транскрипции, транскрипции, основной модификации (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновых кислот; 2) соединенные нуклеотидные последовательности, которые не соединены в природе; 3) 5 подвергнутый инженерии с применением технологий молекулярного клонирования, таким образом, чтобы он был лишен одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с встречающейся в природе нуклеотидной последовательностью; и 4) подвергнутый манипуляции с применением технологий молекулярного клонирования, таким образом, чтобы он имел одно 10 или несколько изменений или перестроек последовательности по сравнению с встречающейся в природе нуклеотидной последовательностью.

[204] Возможна функциональная связь любого из компонентов или последовательностей РНК-репликона с любым другим из компонентов или последовательностей. В возможных вариантах компоненты или 15 последовательности РНК-репликона функционально связаны для экспрессии по меньшей мере одного гетерологичного белка или пептида (или биотерапевтического агента) в клетке-хозяине или подвергаемом лечению организме и/или для способности репликона к саморепликации. Термин "функционально связанный" означает функциональную связь между двумя или 20 более последовательностями, которые сконфигурированы таким образом, чтобы выполнять их обычную функцию. Таким образом, промотор или НТО, функционально связанные с кодирующей последовательностью, способны к осуществлению транскрипции и экспрессии кодирующей последовательности в присутствии соответствующих ферментов. Промотор не обязательно должен 25 примыкать к кодирующей последовательности при условии, что он выполняет функцию направления его экспрессии. Таким образом, оперативная связь между последовательностью РНК, кодирующей гетерологичный белок или пептид, и регуляторной последовательностью (например, промотором или НТО) является функциональной связью, обеспечивающей возможность экспрессии нужного 30 полинуклеотида. Функциональная связь также относится к последовательностям, когда последовательности, кодирующие nsP1-4, НТО, промоторы, и другие последовательности, кодирующие РНК-репликон, связываются таким образом, чтобы обеспечивать возможность транскрипции и трансляции биотерапевтической молекулы и/или репликации репликона. НТО

функционально связывают путем обеспечения последовательностей и интервалов, необходимого для распознавания и трансляции рибосомой других кодируемых последовательностей.

5 [205]РНК-репликоны согласно изобретению происходят от геномов альфавируса в том смысле, что они имеют некоторые из структурных характеристик геномов альфавируса или являются подобными им. В возможных вариантах РНК-репликоны согласно изобретению являются модифицированными геномами альфавируса. В некоторых вариантах осуществления раскрываемых авторами репликонов одну или несколько
10 последовательностей репликона предусмотрены “*in trans*”, т. е., последовательности репликона предусмотрены на более чем одной молекуле РНК. В других вариантах осуществления все последовательности репликона присутствуют на одной молекуле РНК, которую также вводят подлежащему лечению млекопитающему, как описано авторами.

15 [206]В контексте данного описания термины “процент идентичности” или “гомология” или “процент (%) идентичности последовательностей” по отношению к нуклеиновокислотным или полипептидным последовательностям определяют как процент нуклеотидов или аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны известным
20 полинуклеотидам или полипептидам, после выравнивания последовательностей для сопоставления на максимальный процент идентичности и включения гэпов в случае необходимости для достижения максимального процента гомологии. N-концевые или C-концевые вставки или делеции не следует рассматривать как влияющие на гомологию, а внутренние делеции и/или вставки в нуклеотид или
25 полипептидную последовательность, меньшие, чем приблизительно 30, меньшие, чем приблизительно 20, или меньшие, чем приблизительно 10, или меньшие, чем 5 аминокислотных остатком, не следует рассматривать как влияющие на гомологию. Гомологию или идентичность на уровне нуклеотидной или аминокислотной последовательности определяют при помощи BLAST-
30 анализа (Basic Local Alignment Search Tool – средство поиска основного локального выравнивания) с применением алгоритма, используемого программами blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Altschul (1997), Nucleic Acids Res. 25, 3389 - 3402, и Karlin (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264 - 2268), которые специально предназначены для поиска подобия последовательностей.

Подход, применяемый программой BLAST, состоит в том, чтобы сначала рассмотреть подобные сегменты, с гэпами и без них, между запрашиваемой последовательностью и последовательностью из базы данных, с последующей оценкой статистической значимости всех распознанных совпадений и заключительным определением только тех совпадений, которые удовлетворяют требованиям предварительно установленного порога значимости. Обсуждение основных вопросов поиска подобия в базах данных последовательностей содержится в публикации Altschul (1994), *Nature Genetics* 6, 119 - 129. Параметры поиска для гистограммы, описаний, выравниваний, прогнозирования (т. е., порога статистической значимости для сообщения о совпадениях с последовательностями из базы данных), отсечения, матрицы и фильтра (низкой сложности) устанавливаются по умолчанию. Матрицей замен по умолчанию, используемой blastp, blastx, tblastn и tblastx, является матрица BLOSUM62 (Henikoff (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 - 10919), рекомендуемая для запрашиваемых последовательностей по длине 85 (нуклеотидных оснований или аминокислот).

[207] Для программы blastn, предназначенной для сравнения нуклеотидных последовательностей, матрицу замен устанавливают по соотношению M (т. е., поощрительного балла для пары совпадающих остатков) с N (т. е., штрафного балла за несовпадающие остатки), причем значения по умолчанию для M и N составляют +5 и -4, соответственно. Четыре параметра blastn регулируют следующим образом: Q=10 (штраф за создание гэпа); R=10 (штраф за продление гэпа); *wink*=1 (генерирует совпадения слов в каждой позиции *wink* вдоль запрашиваемой последовательности); и *gapw*=16 (устанавливает ширину окна, в пределах которого генерируются сопоставляемые последовательности с гэпами). Возможны следующие установки эквивалентных параметров Blastp для сравнения аминокислотных последовательностей: Q=9; R=2; *wink*=1; и *gapw*=32. Программа сравнения между последовательностями BESTFIT®, доступная в пакете GCG версии 10.0, использует следующие параметры ДНК: GAP=50 (штраф за создание гэпа) и LEN=3 (штраф за продление гэпа) и эквивалентные установки для сравнения белков GAP=8 и LEN=2.

[208] В представленном авторами раскрытии нуклеиновокислотных или полипептидных последовательностей, например последовательностей вирусных капсидных энхансеров, пептидов аутопротеазы, субгеномных промоторов,

неструктурных белков, антигенов ВГВ, также раскрываются последовательности, считающиеся образованными на основе первоначальной последовательности или производные от нее. Раскрытые ранее последовательности включают полинуклеотидные или полипептидные последовательности, имеющие идентичность последовательностей по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 45 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 55 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 65 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 % или по меньшей мере 85 %, например, по меньшей мере 86 %, по меньшей мере 87 %, по меньшей мере 88 %, по меньшей мере 89 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % или 85 - 99 % или 85 - 95 % или 90 - 99 % или 95 - 99 % или 97 - 99 % или 98 - 99 % идентичности последовательностей с полинуклеотидной или полипептидной последовательностью полной длины любой описанной авторами полинуклеотидной или полипептидной последовательности, соответственно, такой как SEQ ID NO: 1 - 90, и их фрагментами. Также раскрываются фрагменты или части любых из раскрываемых авторами последовательностей. В возможных вариантах фрагменты или части последовательностей включают последовательности, имеющие по меньшей мере 5 или по меньшей мере 7 или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, 150 или более или 5 - 10 или 10 - 12 или 10 - 15 или 15 - 20 или 20 - 40 или 20 - 50 или 30 - 50 или 30 - 75 или 30 - 100 аминокислот или нуклеиновокислотных остатков полной последовательности, или по меньшей мере 100 или по меньшей мере 200 или по меньшей мере 300 или по меньшей мере 400 или по меньшей мере 500 или по меньшей мере 600 или по меньшей мере 700 или по меньшей мере 800 или по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 или 100 - 200 или 100 - 500 или 100 - 1000 или 500 - 1000 аминокислот или нуклеиновокислотных остатков, или любое из этих значений, но менее чем 500 или менее чем 700 или менее чем 1000 или менее чем 2000 последовательных аминокислот или нуклеиновых кислот любой из SEQ ID NO: 1 - 90 или любого раскрываемого авторами фрагмента. Также раскрываются варианты таких последовательностей, например, те, в

которых по меньшей мере один или два или три или четыре или пять аминокислотных остатков были вставлены в N- и/или C-концевой позиции и/или в пределах раскрываемой(ых) последовательности(ей), содержащей(их) вставку и замещение, нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие такие варианты. Предусмотренные варианты в дополнительном или альтернативном варианте включают те, которые содержат заданные мутации, например, путем гомологичной рекомбинации или сайт-направленного или ПЦР-мутагенеза, и соответствующие полипептиды или нуклеиновые кислоты других видов, включая, помимо прочего, описываемые авторами, аллели или другие встречающиеся в природе варианты семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, которые содержат вставку и замещение; и/или производные, в которых полипептид был ковалентно модифицирован путем замещения, с применением химических, ферментных или других приемлемых средств, компонентом, отличным от встречающейся в природе аминокислоты, которая содержит вставку и замещение (например, обнаружимым компонентом, таким как фермент). В возможных вариантах описываемые авторами нуклеиновокислотные последовательности являются последовательностями РНК.

Гетерологичные белки и пептиды

[209]РНК-репликоны согласно изобретению включают последовательность РНК, кодирующую по меньшей мере один белок или пептид, являющийся гетерологичным по отношению к альфавирусу, а также (хотя и не обязательно) гетерологичным по отношению к человеку, млекопитающему или животному, экспрессирующему последовательность РНК в организме. В любом варианте осуществления возможны репликоны, имеющие последовательность(и) РНК, кодирующую(ие) два или три или четыре или более гетерологичных белков или пептидов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок или пептид является антигеном ВГВ, как описано авторами. В любом из вариантов осуществления возможна последовательность, кодирующая гетерологичный белок или пептид, которая функционально связана с одной или несколькими другими последовательностями репликона (например, промотором или 5' или 3' последовательностями НТО) и находится под контролем субгеномного промотора, таким образом, чтобы гетерологичный белок или пептид экспрессировался в организме человека, млекопитающего или животного.

[210] В одном возможном варианте осуществления РНК-репликон согласно изобретению имеет последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид (например, моноклональное антитело или биотерапевтический белок или пептид), последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, производные от белковых последовательностей дикого типа альфавируса nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, и 5' и 3' последовательности НТО (для неструктурной опосредуемой белком амплификации). В возможных вариантах РНК-репликоны также имеют 5'-кэп и полиаденилатный (или поли-А) хвост.

10 [211] Иммуногенность гетерологичного белка или пептида определяют с применением множества анализов, известных специалистам в данной области техники, например, иммуноокрашивания внутриклеточных цитокинов или секретированных цитокинов популяциями специфичных к эпитопу Т-клеток или путем количественного определения частоты и общего числа специфичных к эпитопу Т-клеток и характеристики их дифференциации и состояния активации, например, недолговечных эффекторных и предшественников эффекторных CD8+ Т-клеток памяти. Иммуногенность также определяют путем измерения опосредованного антителом иммунного ответа, например, продуцирования антител путем измерения титров IgA или IgG в сыворотке.

20 [212] Помимо антигенов ВГВ согласно заявке, РНК-репликоны согласно заявке необязательно также кодируют один или несколько гетерологичных белков или пептидов, представляющих любой из возможных белков или пептидов, включая, помимо прочих, цитокины, факторы роста, иммуноглобулины, моноклональные антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты Fab, Fc-слитые белки), гормоны, интерфероны, интерлейкины, регуляторные пептиды и белки.

[213] В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок или пептид кодируется последовательностью РНК, включающей до 5 т.п.н. или до 6 т.п.н. или до 7 т.п.н. или до 8 т.п.н. или до 9 т.п.н. или до 10 т.п.н. или до 11 т.п.н. или до 12 т.п.н. Также возможен вариант, в котором гетерологичный белок является одноцепочечной молекулой антитела.

30 [214] Репликоны альфавируса согласно изобретению также имеют субгеномный промотор для экспрессии гетерологичного белка или пептида. Термин “субгеномный промотор” в контексте данного описания относится к

промотору субгеномной мРНК или вирусной нуклеиновой кислоты. В контексте данного описания “субгеномный промотор альфавируса” является промотором, как первоначально определено в геноме альфавируса, который направляет транскрипцию субгеномной информационной РНК как часть процесса репликации альфавируса.

[215] Термин “гетерологичный”, применяемый к полинуклеотиду, гену, нуклеиновой кислоте, полипептиду, белку или ферменту, означает полинуклеотид, ген, нуклеиновую кислоту, полипептид, белок или фермент, которые происходят не из вида хозяина. Например, “гетерологичный ген” или “гетерологичная нуклеиновокислотная последовательность” в контексте данного описания означают ген или нуклеиновокислотную последовательность из другого вида, отличного от вида организма-хозяина, в который их вводят. Также возможны варианты, в которых гетерологичные последовательности являются синтетическими, а не взятыми из организма или не встречающимися в природе.

Применительно к регуляторной последовательности гена или к дополнительной нуклеиновокислотной последовательности, применяемой для манипулирования экспрессией последовательности гена (например, 5' нетранслируемой области, 3' нетранслируемой области, добавочной последовательности поли-А, интронной последовательности, сайта сплайсинга, сайта связывания рибосомы, последовательности внутренней посадки рибосомы, области гомологии генома, сайта рекомбинации и т. п.), или к нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей домен белка, или последовательности локализации белка, “гетерологичная” означает, что регуляторная или дополнительная последовательность или последовательность, кодирующая домен белка, или последовательности локализации взята из источника, отличного от источника гена, с которым регуляторная или дополнительная нуклеиновокислотная последовательность или нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая домен белка или последовательность локализации располагается рядом в геноме, хромосоме или эписоме. Таким образом, промотор, функционально связанный с геном, с которым он не является функционально связанным в его естественном состоянии (например, в геноме не подвергнутого генной инженерии организма) указан авторами как “гетерологичный промотор”, даже если промотор может происходить из того же вида (или, в некоторых случаях, из того же организма), что и ген, с которым он связан. Подобным образом, когда речь идет о

последовательности локализации белка или домене белка подвергнутого инженерии белка, “гетерологичный” означает, что последовательность локализации или домен белка происходит из белка, отличного от того, в который его включают путем генной инженерии.

5 [216] Термин “не встречающаяся в природе”, “рекомбинантная” или “подвергнутая инженерии” молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотидная последовательность в контексте данного описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты или не встречающейся в природе
10 полинуклеотидной последовательности, которая была изменена путем вмешательства человека. В качестве неограничивающих примеров, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты: 1) была синтезирована или модифицирована *in vitro*, например, с применением химических или ферментных технологий (например, с применением химического синтеза нуклеиновых кислот, или путем применения ферментов для репликации, полимеризации,
15 экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, сшивания, обратной транскрипции, транскрипции, основной модификации (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновых кислот; 2) включает соединенные нуклеотидные последовательности, которые не
20 соединены в природе, 3) была подвергнута инженерии с применением технологий молекулярного клонирования, таким образом, чтобы она была лишена одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с встречающейся в природе последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, и/или 4) была подвергнута манипуляции с применением технологий молекулярного
25 клонирования, таким образом, чтобы она имела одно или несколько изменений или перестроек последовательности по сравнению с встречающейся в природе последовательностью нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающих примеров, кДНК является молекулой рекомбинантной ДНК, как и любая молекула нуклеиновой кислоты, сгенерированная путем *in vitro*
30 полимеразной(ых) реакции(й), или к которой были прикреплены линкеры, или которая была включена в вектор, такой как вектор клонирования или вектор экспрессии или, или была включена в РНК-репликон.

[217] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно изобретению включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: 5'-нетранслируемую

область (5'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК; полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один, предпочтительно все, из неструктурных белков вируса РНК; субгеномный промотор вируса РНК; описанную авторами не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность; и 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК.

[218]В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно изобретению включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: 5'-нетранслируемую область альфавируса (5'-НТО); последовательность 5'-репликации неструктурного гена *nsr1* альфавируса; правый петлевой (DLP) мотив вида вируса; полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый пептид аутопротеазы; полинуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурные белки *nsr1*, *nsr2*, *nsr3* и *nsr4* альфавируса; субгеномный промотор альфавируса; описанную авторами не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность; 3'-нетранслируемую область альфавируса (3'-НТО); и, необязательно, последовательность полиаденозина.

[219]В некоторых вариантах осуществления мотив DLP взят из вида вируса, выбранного из группы, к которой относятся вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MTDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлэнд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндumu (NDUV) и Вирус Багги Крик.

[220]В некоторых вариантах осуществления четвертый пептид аутопротеазы выбран из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A), вирус флашери 2A (BmIFV2A) и их комбинация. Предпочтительно четвертый пептид аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A.

В некоторых вариантах осуществления четвертый пептид аутопротеазы включает SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая четвертый пептид аутопротеазы, включает SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая четвертый пептид аутопротеазы, состоит из SEQ ID NO: 12.

[221] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно изобретению включает, в порядке от 5'- до 3'-конца: 5'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 55; последовательность 5'-репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56; мотив DLP, включающий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 57; полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность P2A SEQ ID NO: 11; полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные белки nsp1, nsp2, nsp3 и nsp4 альфавируса, такие как кодируемые нуклеиновокислотными последовательностями SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно; субгеномный промотор, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 62; раскрываемую авторами не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность; и 3'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность P2A, включает SEQ ID NO: 12, не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54, и РНК-репликон также включает последовательность полиаденозина. Предпочтительно последовательность полиаденозина имеет последовательность SEQ ID NO: 64 на 3'-конце репликона.

[222] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно изобретению включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 65 по 72.

[223] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотидную последовательность, кодирующую раскрываемы авторами РНК-репликон, также включает T7 промотор, функционально связанный с 5'-концом последовательности ДНК. В более

предпочтительном варианте Т7 промотор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 73.

5 [224] Также обеспечиваются способы продуцирования РНК-репликона согласно заявке, включающего транскрибирование молекулы нуклеиновой кислоты, включающей последовательность ДНК, кодирующую раскрываемый авторами РНК-репликон. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты транскрибируется *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты транскрибируют *in vitro*.

Клетки и полипептиды

10 [225] Заявка также обеспечивает клетки, предпочтительно выделенные клетки, включающие любые из описанных авторами полинуклеотидов и векторов. Клетки применяют, например, для продуцирования рекомбинантного белка или для продуцирования вирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления клетки применяют для продуцирования РНК-репликона.

15 [226] Клетки-хозяева, включающие РНК-репликон или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-репликон согласно заявке, также составляют часть изобретения. Антигены ВГВ продуцируют путем применения технологии рекомбинантной ДНК, включая экспрессию молекул в клетках-хозяевах, например, клетках яичника китайского хомячка (СНО), линии опухолевых
20 клеток, клетки ВНК, линии человеческих клеток, такие как клетки НЕК293, клетки PER.C6 или клетки дрожжей, грибов, насекомых и т. п., или трансгенные животные или растения. В определенных вариантах осуществления клетки берут из многоклеточного организма, в определенных вариантах осуществления их источником являются позвоночные или беспозвоночные. В
25 определенных вариантах осуществления клетки являются клетками млекопитающих клетки, такими, как клетки человека, или клетками насекомых. В целом продуцирование рекомбинантного белка, такого как антигены ВГВ согласно изобретению, в клетке-хозяине включает введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок в подходящем для
30 экспрессии формате, в клетку-хозяин, культивирование клеток в условиях, благоприятствующих экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты и позволяющих осуществлять экспрессию белка в вышеупомянутой клетке. В возможном варианте молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей белок в подходящем для экспрессии формате, существует в форме экспрессионной

кассеты и, как правило, требует последовательностей, способных вызывать экспрессию нуклеиновой кислоты, таких как энхансер(ы), промотор, сигнал полиаденилирования и т. п. Специалистам в данной области техники известно, что существует возможность использования разных промоторов для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах. Промоторы бывают конститутивными или регулируемые, и их получают из разных источников, включая вирусы, прокариотные или эукариотные источники, или конструируют искусственно. Возможно добавление дополнительных регуляторных последовательностей. Для экспрессии трансгена(ов) возможно использование многих промоторов, известных специалистам в данной области техники, например, вирусных, происходящих из организмов млекопитающих, синтетических промоторов и т. п. Неограничивающим примером подходящего промотора для достижения экспрессии в эукариотных клетках является ЦМВ-промотор (публикация US 5,385,839), например, немедленно-ранний промотор ЦМВ, например, включающий нуклеотиды от -735 до +95 из немедленно-раннего энхансера / промотора гена ЦМВ. Сигнал полиаденилирования, например, сигнал поли-А гормона роста крупного рогатого скота (публикация US 5,122,458), присутствует за трансгеном(ами). В альтернативном варианте специалистам в данной области техники доступны, в том числе из коммерческих источников, несколько широко используемых векторов экспрессии, например, серия векторов ркДНК и рEF от Invitrogen, рMSCV и рTK-Hyg от BD Sciences, рCMV-Script от Stratagene и т. п., подходящие для использования в рекомбинантной экспрессии нужного белка или при получении соответствующих последовательностей промоторов и/или терминаторов транскрипции, последовательностей поли-А и т. п.

[227] Возможна культура клеток любого типа, включая культуру прилипающих клеток, например, клеток, прикрепленных к поверхности сосуда с культурой или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Большинство крупномасштабных операций с суспензионными культурами осуществляют в периодическом процессе или процессе с подпиткой, поскольку они наиболее просты с точки зрения функциональности и масштабирования. В последнее время все чаще стали применять непрерывные процессы на основе принципов перфузии, которые также являются подходящими. Подходящие культуральные среды также хорошо известны специалистам в данной области техники, и, как правило, являются доступными из коммерческих источников в

большом количестве, или же их приготавливают по заказу в соответствии со стандартными протоколами. Культивирование осуществляют, например, в чашках, вращающихся флаконах или в биореакторах с применением систем для периодического процесса, процесса с подпиткой или непрерывного процесса и т. п. Подходящие условия для культивирования клеток известны специалистам (см., например, публикации 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)). Среды для культивирования клеток предлагаются разными поставщиками, и подходящую среду выбирают привычным способом для соответствующей клетки-хозяина с целью экспрессии нужного белка, в данном случае антигенов ВГВ. Подходящая среда необязательно содержит сыворотку.

[228] Варианты осуществления заявленного изобретения, таким образом, также касаются способа получения антигена ВГВ согласно заявке. Способ включает трансфицирование клетки-хозяина вектором экспрессии, включающим полинуклеотид, кодирующий антиген ВГВ согласно заявке, функционально связанный с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии антигена ВГВ, и, необязательно, очистку или выделение антигена ВГВ, экспрессированного в клетке. Антиген ВГВ выделяют или берут из клетки любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т. п. Технологии, применяемые для экспрессии рекомбинантного белка, общеизвестны среди специалистов в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения. Экспрессируемые антигены ВГВ также исследуют без очистки или выделения экспрессированного белка, например, путем анализа супернатанта клеток, трансфицированных вектором экспрессии, кодирующим антиген ВГВ, и выращиваемых в условиях, подходящих для экспрессии антигена ВГВ.

[229] Таким образом, также обеспечиваются не встречающиеся в природе или рекомбинантные полипептиды, включающие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, или SEQ ID NO: 9. Как описывается выше и далее, выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие эти

последовательности, векторы, включающие эти последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, включающие полипептид, полинуклеотид или вектор, также предусмотрены в данной заявке.

5 [230]В одном варианте осуществления заявленного изобретения рекомбинантный полипептид включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, или SEQ ID NO: 9, например, на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 10 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, или SEQ ID NO: 9. Предпочтительно не встречающийся в природе или рекомбинантный полипептид состоит из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 84, 85 или 86 или SEQ ID NO: 9.

15 Композиции

[231]Заявка также касается композиций, фармацевтических композиций, иммуногенных комбинаций, более конкретно – вакцин, включающих один или несколько антигенов ВГВ, полинуклеотидов и/или векторов, кодирующих один или несколько антигенов ВГВ согласно заявке. В композициях, 20 фармацевтических композициях, иммуногенных комбинациях и вакцинах согласно заявке возможно применение любых из описываемых авторами антигенов ВГВ, полинуклеотидов (включая РНК и ДНК) и/или векторов согласно заявке.

[232]Заявленное изобретение обеспечивает, например, фармацевтическую 25 композицию, включающую любую молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или РНК-репликон, как описано авторами, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным и не должен отрицательно влиять на эффективность активного ингредиента. К фармацевтически приемлемым носителям относятся одно или несколько 30 формообразующих, таких, как связующие вещества, разрыхлители, агенты, вызывающие набухание, суспендирующие агенты, эмульгаторы, смачивающие средства, скользящие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солибилизаторы и покрытия. Конкретный характер носителя или другого материала зависит от пути введения, например, внутримышечного,

внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, в
слизистую оболочку (например, кишечника), интраназального или
внутрибрюшинного. Для жидких предназначенных для инъекций препаратов,
например, суспензий и растворов, подходящими носителями или добавками
5 являются вода, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т. п. Для
твердых предназначенных для перорального введения препаратов, например,
порошков, капсул, капсуловидных таблеток, желатиновых капсул и таблеток,
подходящими носителями или добавками являются крахмалы, сахара,
разбавители, гранулирующие агенты, скользящие вещества, связующие
10 вещества, разрыхлители и т. п. Для назальных аэрозолей / ингаляционных
смесей водный раствор/суспензия включает воду, гликоли, масла, смягчительные
средства, стабилизаторы, смачивающие средства, консерванты, ароматизаторы,
вкусовые вещества и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

[233] Фармацевтические композиции согласно заявке рецептируют в любом
15 веществе, подходящем для введения субъекту с целью содействия введению и
улучшения эффективности, включая, помимо прочего, пероральное
(энтеральное) введение парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции
включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию,
внутрикожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Фармацевтические
20 композиции согласно заявке также рецептируют для других путей введения,
включая трансмукозальное, глазное, ректальное, имплантацию длительного
действия, сублингвальное введение, подъязычное введение, из слизистой
оболочки полости рта в обход кровообращения в системе воротной вены,
ингаляцию или интраназальное введение.

[234] В предпочтительном варианте осуществления заявленного
25 изобретения фармацевтические композиции согласно заявке рецептируют для
парентеральной инъекции, предпочтительно подкожной, внутрикожной
инъекции или внутримышечной инъекции, более предпочтительно
внутримышечной инъекции.

[235] В соответствии с вариантами осуществления заявленного изобретения
30 фармацевтические композиции для введения, как правило, включают буферный
раствор в фармацевтически приемлемом носителе, например, водном носителе,
таком как буферный раствор и т. п., например, фосфатно-буферный солевой
раствор (PBS). В возможных вариантах композиции и иммуногенные

комбинации также содержат фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, например, регулирующие уровень pH и буферные агенты. Например, в возможном варианте фармацевтическая композиция согласно заявке, включающая плазмиду ДНК, содержит фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Возможно присутствие плазмиды ДНК в концентрации, например, от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, например, 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, или 5 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл.

[236] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию согласно заявке, включающую РНК-репликон, вводят в концентрации, например, от приблизительно 20 мкг/мл до приблизительно 200 мкг/мл, например, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл, 110 мкг/мл, 120 мкг/мл, 130 мкг/мл, 140 мкг/мл, 150 мкг/мл, 160 мкг/мл, 170 мкг/мл, 180 мкг/мл, 190 мкг/мл, или 200 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию согласно заявке, включающую РНК-репликон, вводят в концентрации ниже 20 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию согласно заявке, включающую РНК-репликон, вводят в концентрации свыше 200 мкг/мл.

[237] Фармацевтические композиции согласно заявке рецептируют как вакцину (также называемую “иммуногенной композицией”) в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Такие композиции включают адъюванты для усиления иммунных ответов. Оптимальные соотношения каждого компонента рецептуры определяют с применением технологий, хорошо известных специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения.

[238] В конкретном варианте осуществления заявленного изобретения фармацевтическая композиция, композиция или иммуногенная комбинация представляет собой ДНК-вакцину. ДНК-вакцины, как правило, включают бактериальные плазмиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий нужный антиген под контролем сильного эукариотного промотора. Сразу после доставки плазмид в цитоплазму клетки хозяина кодируемый антиген продуцируется и обрабатывается эндогенно. Образовавшийся в результате антиген, как правило, вызывает как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунные ответы.

Преимущество ДНК-вакцин состоит хотя бы в том, что они обеспечивают улучшенную безопасность, являются термически устойчивыми, легко приспособляются для экспрессии антигенных вариантов и просты в получении. Для приготовления такой ДНК-вакцины возможно использование любых плазмид ДНК согласно заявке.

[239] В других конкретных вариантах осуществления заявленного изобретения фармацевтическая композиция, композиция или иммуногенная комбинация является РНК-вакциной. РНК-вакцины, как правило, включают по меньшей мере одну одноцепочечную молекулу РНК, кодирующую нужный антиген, например, антиген ВГВ. Сразу после доставки РНК в цитоплазму клетки хозяина кодируемый антиген продуцируется и обрабатывается эндогенно, вызывая как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунные ответы, подобно ДНК-вакцине. В возможном варианте последовательность РНК является кодон-оптимизированной для улучшения эффективности трансляции. Молекулу РНК модифицируют любым способом, известным специалистам в данной области техники, с учетом раскрытия настоящего изобретения для повышения устойчивости и/или трансляции, например, путем добавления поли-А хвоста, например, из по меньшей мере 30 аденозиновых остатков; и/или кэппинга 5'-конца модифицированным рибонуклеотидом, например, 7-метилгуанозиним кэпом, который включают во время синтеза РНК или подвергают ферментной инженерии после транскрипция РНК. Также возможен вариант, в котором РНК-вакцина является самореплицирующейся РНК-вакциной, разработанной на основе вектор экспрессии альфавируса. Самореплицирующиеся РНК-вакцины включают молекулу РНК репликазы, происходящую из вируса, относящегося к семейству альфавирусов с субгеномным промотором, контролирующим репликацию РНК антигена ВГВ, с последующим искусственным поли-А хвостом, расположенным после репликазы.

[240] В определенных вариантах осуществления адъювант включают в фармацевтическую композицию согласно заявке или вводят совместно с фармацевтической композицией согласно заявке. Применение адъюванта не обязательно, но оно позволяет дополнительно усиливать иммунные ответы при использовании композиции с целью вакцинации. Адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композиции в соответствии с заявкой,

предпочтительно должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для человека. В возможном варианте адъювант является малой молекулой или антителом, включая, помимо прочего, ингибиторы иммунной контрольной точки (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т. п.), агонисты toll-подобного рецептора (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15 (Altor Bioscience), мутантные IRF3 и генетические адъюванты IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, генетический адъювант IL-12 и IL-7-hyFc.

[241] Заявленное изобретение также обеспечивает способы получения фармацевтических композиций и иммуногенных комбинаций согласно заявке. Способ производства фармацевтической композиции или иммуногенно комбинации включает смешивание выделенного полинуклеотида, кодирующего антиген, вектор и/или полипептид ВГВ согласно заявке, с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Специалистам в данной области техники известны традиционные технологии, применяемые для приготовления таких композиций.

Способы индукции иммунного ответа

[242] Заявленное изобретение также обеспечивает способы индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, включающие введение субъекту иммуногенно эффективного количества фармацевтической композиции согласно заявке. Способы согласно заявке предусматривают возможность применения любой из описываемых авторами фармацевтических композиций согласно заявке.

[243] В контексте данного описания термин “инфекция” означает инвазию в организм хозяина вызывающего болезнь агента. Вызывающий болезнь агент считают “инфекционным”, если он способен поражать хозяина и воспроизводиться или размножаться в организме хозяина. Примерами инфекционных агентов являются вирусы, например, ВГВ и некоторые виды аденовирусов, прионов, бактерий, грибков, простейших и т. п. “Инфекция ВГВ”, в частности, касается инвазии ВГВ в организм-хозяин, например, клетки и ткани организма-хозяина.

[244] Фраза “индукция иммунного ответа” по отношению к описываемым авторами способам охватывает вызывание желаемого иммунного ответа или эффекта в организме субъекта, который в этом нуждается, против инфекции,

например, инфекции ВГВ. “Индукция иммунного ответа” также охватывает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения от патогенного агента, например, ВГВ. В контексте данного описания термин “терапевтический иммунитет” или “терапевтический иммунный ответ” означает, что

5 вакцинированный субъект способен бороться с инфекцией патогенного агента, против которой была проведена вакцинация, например, иммунитет против инфекции ВГВ, обеспечиваемый вакцинацией с применением вакцины против ВГВ. В одном варианте осуществления “индукция иммунного ответа” означает

10 выработку иммунитета в организме субъекта, который в этом нуждается, например, для обеспечения терапевтического эффекта против болезни, например, инфекции ВГВ. В определенных вариантах осуществления “индукция иммунного ответа” означает вызывание или улучшение клеточного иммунитета, например, Т-клеточного ответа, против инфекции ВГВ. В определенных вариантах осуществления “индукция иммунного ответа” означает вызывание или

15 улучшение гуморального иммунного ответа против инфекции ВГВ. В определенных вариантах осуществления “индукция иммунного ответа” означает вызывание или улучшение клеточного и гуморального иммунного ответа против инфекции ВГВ.

[245] Заявленное изобретение также обеспечивает способы вакцинирования

20 субъекта против ВГВ, включающие введение субъекту фармацевтической композиции согласно заявке. В некоторых вариантах осуществления вакцинация субъекта является профилактической вакцинацией или терапевтической вакцинацией. В более конкретном варианте вакцинация является терапевтической вакцинацией. Заявленное изобретение также обеспечивает

25 способы уменьшения инфекции и/или репликации ВГВ в организме субъекта, включающие введение субъекту фармацевтической композиции согласно заявке или вакцины согласно заявке. Способы согласно заявке предусматривают возможность применения любых из описанных авторами фармацевтических композиций или вакцин согласно заявке.

30 [246] В контексте данного описания термин “защитный иммунитет” или “защитный иммунный ответ” означает, что вакцинированный субъект способен бороться с инфекцией патогенного агента, против которой была проведена вакцинация. Как правило, субъект, выработавший “защитный иммунный ответ”, проявляет лишь от легких до умеренных клинических симптомов или вообще не

проявляет симптомов. Как правило, субъект с “защитным иммунным ответом” или “защитным иммунитетом” против определенного агента, не умирает в результате инфекции вышеупомянутого агента.

5 [247] Как правило, терапевтической целью введения фармацевтических композиций и иммуногенных комбинаций согласно заявке является выработка иммунного ответа против ВГВ после инфицирования ВГВ или проявления симптомов, характерных для инфекции ВГВ, например, для терапевтической вакцинации.

10 [248] В контексте данного описания “иммуногенно эффективное количество” или “иммунологически эффективное количество” означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для вызывания желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа в организме субъекта, который в этом нуждается. Иммуногенно эффективным количеством является количество, достаточное для индукции иммунного ответа в организме субъекта, который в этом нуждается. Иммуногенно эффективным количеством является количество, достаточное для выработки иммунитета у субъекта, который в этом нуждается, например, обеспечения терапевтического эффекта против болезни, например, инфекции ВГВ. Иммуногенно эффективное количество колеблется в зависимости от разных факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, вес, состояние здоровья и т. п.; конкретное применение, например, обеспечение защитного иммунитета или терапевтического иммунитета; и конкретное заболевание, например, вирусная инфекция, против которой требуется иммунитет. Иммуногенно эффективное количество легко определяется специалистом в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения.

20 [249] В конкретных вариантах осуществления заявленного изобретения иммуногенно эффективное количество означает количество композиции или иммуногенной комбинации, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (I) уменьшения или ослабления тяжести инфекции ВГВ или связанного с ней симптома; (II) уменьшения длительности инфекции ВГВ или связанного с ней симптома; (III) предотвращения прогрессирования инфекции ВГВ или связанного с ней симптома; (IV) вызывания регрессии инфекции ВГВ или связанного с ней симптома; (V) предотвращения развития или возникновения инфекции ВГВ или

30

связанного с ней симптома; (VI) предотвращения рецидива инфекции ВГВ или связанного с ней симптома; (VII) уменьшения госпитализации субъекта с инфекцией ВГВ; (VIII) сокращения длительности госпитализации субъекта с инфекцией ВГВ; (IX) продления выживаемости субъекта с инфекцией ВГВ; (X) устранения инфекции ВГВ в организме субъекта; (XI) подавления или уменьшения репликации ВГВ в организме субъекта; и/или (XII) усиления или улучшения профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой терапии.

[250] Иммуногенно эффективное количество также означает количество, эффективное для снижения уровня ГВпАг в соответствии с переходом к клинической сероконверсии; достижения непрерывного выведения ГвпАг, связанного с уменьшением инфицированных гепатоцитов иммунной системой субъекта; индукции популяций специфичных к ВГВ-антигену активированных Т-клеток; и/или достижения устойчивой потери ГВпАг за 12 месяцев. Примерами целевого показателя являются уменьшение ГВпАг ниже порога 500 копий международных единиц (IU) ГВпАг и/или увеличения числа CD8.

[251] Как правило, иммуногенно эффективное количество, касающееся молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона, составляет от приблизительно 1 мкг молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона до приблизительно 1 мг молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона, например, 1 мкг, 10 мкг, 20 мкг, 30 мкг, 40 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 200 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг или 1 мг. Предпочтительно иммуногенно эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона составляет от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг. Иммуногенно эффективное количество, касающееся молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона в фармацевтической композиции составляет концентрацию от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 2 мг/мл молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона в целом, например, 0,01 мг/мл, 0,02 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,04 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл или 2 мг/мл. Предпочтительно иммуногенно эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона составляет менее чем 1 мг/мл, более предпочтительно – менее чем 0,05 мг/мл. Иммуногенно

эффективное количество составляет от одной молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или РНК-репликона или от нескольких молекул нуклеиновых кислот, векторов или РНК-репликонов. Иммуногенно эффективное количество вводят в единой композиции или нескольких композициях, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 5 9 или 10 композициях (например, таблетках, капсулах или инъекционных лекарственных формах, или любой композиции, приспособленной для внутрикожной доставки, например, внутрикожной доставки с применением пластыря для внутрикожной доставки), причем введение множества капсул или инъекций вместе обеспечивает для субъекта иммуногенно эффективное 10 количество. Например, при применении двух плазмид ДНК иммуногенно эффективное количество составляет 3 - 4 мг/мл, по 1,5 - 2 мг/мл каждой плазмиды. Также возможно введение субъекту иммуногенно эффективного количества и последующее введение другой дозы иммуногенно эффективного количества тому же субъекту в так называемом режиме "прайм-буст". Эта общая 15 концепция режима "прайм-буст" хорошо известна специалистам в области вакцинирования. В случае необходимости режим дополняют необязательным бустерным введением.

[252]Иммуногенную комбинацию, включающую два вектора, например, первый вектор, кодирующий первый антиген ВГВ, и второй вектор, кодирующий 20 второй антиген ВГВ, вводят субъекту путем смешивания двух векторов и доставки смеси в единую анатомическую точку. В альтернативном варианте выполняют две отдельных иммунизации, в каждой из которых доставляют один вектор экспрессии. В таких вариантах осуществления, когда два вектора вводят в единой иммунизации как смесь двух отдельных иммунизаций, первый вектор и 25 второй вектор вводят в соотношении от 10:1 до 1:10 по массе, например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно первый и второй векторы вводят в соотношении 1:1 по массе.

[253]Предпочтительно субъект, подлежащий лечению в соответствии со 30 способами согласно заявке, является инфицированным ВГВ субъектом, в частности, субъектом, имеющим хроническую инфекцию ВГВ. Острая инфекция ВГВ характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, дополняемой последующей широкой адаптационной реакцией (например, ВГВ-специфических Т-клеток, нейтрализующих антител), что в результате обычно

приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. Наоборот, такие реакции нарушаются или ослабляются из-за высокой вирусной и антигенной нагрузки, когда, например, в большом количестве продуцируются оболочечные белки ВГВ, которые высвобождаются в субвирусных частицах в 1000-кратном избытке относительно инфекционного вируса.

[254] Хроническая инфекция ВГВ описана по фазам, характеризующимся вирусной нагрузкой, уровнем ферментов печени (некровоспалительной активностью), нагрузкой ГВеАГ или ГВпАГ или присутствием антител к этим антигенам. Уровень кнкДНК остается относительно неизменным, составляя приблизительно от 10 до 50 копий на клетку, даже при возможном колебании вiremии в широких пределах. Персистенция видов кнкДНК ведет к тому, что болезнь приобретает хронический характер. Более конкретно, фазы хронической инфекции ВГВ включают: (I) иммунотолерантную фазу, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальными или минимально повышенными ферментами печени; (II) ГВеАГ-положительную фазу иммуноактивации, в которой наблюдают пониженный или понижающийся уровень вирусной репликации со значительно повышенными ферментами печени; (III) фазу неактивного носительства ГВпАГ, представляющую низкорепликативное состояние с низкими вирусными нагрузками и нормальным уровнем ферментов печени в сыворотке вследствие возможной сероконверсии ГВеАГ; и (IV) ГВеАГ-отрицательную фазу, в которой периодически происходит вирусная репликация (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровня ферментов печени, часто встречаются мутации в прекоровом и/или основном коровом промоторе, и, таким образом ГВеАГ инфицированной клеткой не продуцируется.

[255] В контексте данного описания “хроническая инфекция ВГВ” относится к субъекту, у которого присутствие ВГВ обнаруживается на протяжении более чем 6 месяцев. У субъекта с хронической инфекцией ВГВ возможна любая фаза хронической инфекции ВГВ. Хроническую инфекцию ВГВ следует понимать в соответствии с принятым в данной области техники значением. Например, хроническая инфекция ВГВ характеризуется персистенцией ГВпАГ в течение 6 месяцев или дольше после острой инфекции ВГВ. Например, упоминаемая авторами хроническая инфекция ВГВ соответствует определению, опубликованному Центрами контроля и

профилактики заболеваний (CDC), согласно которому хроническая инфекция ВГВ характеризуется такими лабораторными критериями, как: (I) отрицательность на IgM-антитела к коровому антигену гепатита В (IgM анти-НВс) и положительность на поверхностный антиген гепатита В (ГВпАг), е-антиген гепатита В (ГВеАГ) или нуклеиновокислотный тест на ДНК вируса гепатита В или (II) положительность на ГВпАг или нуклеиновокислотный тест на ДНК ВГВ или положительность на ГВеАГ дважды с интервалом по меньшей мере 6 месяцев. Предпочтительно иммуногенно эффективное количество означает количество композиции или иммуногенной комбинации согласно заявке, которое является достаточным для лечения хронической инфекции ВГВ.

[256] В некоторых вариантах осуществления субъекта с хронической инфекцией ВГВ подвергают лечению аналогом нуклеозида (NUC), и он является NUC-супрессированным. В контексте данного описания “NUC-супрессированный” означает субъекта, имеющего необнаружимый вирусный уровень ВГВ и стабильный уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примеры лечения аналогом нуклеозида / нуклеотида включают лечение ингибиторами ВГВ-полимеразы, такими как энтекавир и тенофовир. В предпочтительном варианте субъект с хронической инфекцией ВГВ не имеет запущенного фиброза или цирроза печени. Как правило, такой субъект должен иметь показатель METAVIR менее 3 баллов для фиброза и результат фиброскана менее 9 кПа. Показатель METAVIR представляет систему балльной оценки, которую обычно применяют для определения степени воспаления и фиброза путем гистопатологической оценки в биопсии печени пациентов с гепатитом В. Система балльной оценки присваивает два стандартизированных числовых значения: одно отражает степень воспаления, а другое отражает степень фиброза.

[257] Считается, что устранение или уменьшение хронического ВГВ позволяет на ранней стадии предотвратить тяжелое заболевание печени, включая вирус-индуцированный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, также возможно применение способов согласно заявке в качестве терапии для лечения вызываемых ВГВ заболеваний. Примерами вызываемых ВГВ заболеваний являются, помимо прочих, цирроз, рак (например, гепатоцеллюлярная карцинома) и фиброз, в частности, запущенный фиброз, характеризующийся показателем METAVIR 3 балла или выше для фиброза. В

таких вариантах осуществления иммуногенно эффективным количеством является количество, эффективное для достижения устойчивой потери ГВпАг за 12 месяцев и значительного уменьшения клинического заболевания (например, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и т. п.).

5 [258] Способы в соответствии с вариантами осуществления заявленного изобретения также включают введение субъекту, который в этом нуждается, другого иммуногенного агента (такого как другой антиген ВГВ или другой антиген) или другого агента против ВГВ (такого как аналог нуклеозида или другой агент против ВГВ) в комбинации с фармацевтической композицией
10 согласно заявке. Например, в возможном варианте другим агентом против ВГВ или иммуногенным агентом является малая молекула или антитело, включая, помимо прочего, ингибиторы иммунной контрольной точки (например, анти-PD1, анти-TIM-3 и т. п.), агонисты toll-подобного рецептора (например, агонисты TLR7 и/или агонисты TLR8), агонисты RIG-1, суперагонисты IL-15
15 (Altor Bioscience), мутантные IRF3 и генетические адъюванты IRF7, агонисты STING (Aduro), генетический адъювант FLT3L, IL-12 генетический адъювант, IL-7-hyFc; CAR-T, которые связываются с геном белка оболочки ВГВ (S-CAR клетки); модуляторы сборки капсидов; ингибиторы кнкДНК, ингибиторы ВГВ-полимеразы (например, энтекавир и тенофовир). В возможных вариантах теми
20 или иными активными агентами против ВГВ являются, например, малая молекула, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, белок или нуклеиновая кислота.

Способы доставки

[259] Фармацевтические композиции и иммуногенные комбинации согласно
25 заявке вводят субъекту любым способом, известным специалистам в данной области техники с учетом раскрытия настоящего изобретения, включая, помимо прочего, парентеральное введение (например, внутримышечную, подкожную, внутривенную или внутрикожную инъекцию), пероральное введение, чрескожное введение и назальное введение. Предпочтительно фармацевтические
30 композиции и иммуногенные комбинации вводят парентерально (например, путем внутримышечной инъекции или внутрикожной инъекции) или чрескожно.

[260] В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения, в которых фармацевтическая композиция или иммуногенная комбинация включает одну или несколько плазмид ДНК, введение осуществляют путем инъекции

через кожу, например, путем внутримышечной или внутрикожной инъекции, предпочтительно внутримышечной инъекции. Внутримышечную инъекцию комбинируют с электропорацией, т. е., приложением электрического поля для облегчения доставки плазмид ДНК в клетки. В контексте данного описания термин “электропорация” означает применение импульса трансмембранного электрического поля для образования микроскопических путей (пор) в биомембране. Во время *in vivo* электропорации к клеткам прилагают электрические поля соответствующей величины и длительности, вызывая переходное состояние повышенной проницаемости клеточной мембраны и, таким образом, способствуя поглощению клетками молекул, не способных самостоятельно преодолевать клеточные мембраны. Образование таких пор путем электропорации облегчает прохождение биомолекул, таких как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства и т. п., с одной стороны клеточной мембраны на другую. Было продемонстрировано, что *in vivo* электропорация для доставки ДНК-вакцин существенно увеличивает поглощение плазмиды клетками-хозяевами, при этом также приводя к воспалению в месте инъекции, от легкого до умеренного. В результате эффективность трансфекции и иммунный ответ значительно улучшаются (например, с кратностью до 1000 раз и 100 раз, соответственно) при внутрикожной или внутримышечной электропорации по сравнению с традиционной инъекцией.

[261] В типичном варианте осуществления электропорацию комбинируют с внутримышечной инъекцией. Однако также существует возможность комбинации электропорации с другими формами парентерального введения, например, внутрикожной инъекцией, подкожной инъекцией и т. п.

[262] Введение фармацевтической композиции, иммуногенной комбинации или вакцины согласно заявке путем электропорации осуществляют с применением устройств для электропорации, которые конфигурируют для доставки в нужную ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для вызывания обратимого образования пор в клеточных мембранах. Устройство для электропорации включает электропорационный компонент и набор электродов или набор рукояток. Электропорационный компонент включает один или несколько из следующих компонентов устройства для электропорации: контроллер, генератор формы кривой тока, прибор для измерения импеданса, регистратор формы волн, элемент ввода, элемент отчетов о состоянии,

коммуникационный порт, компонент памяти, источник питания и сетевой выключатель. Электропорацию выполняют с применением устройства для *in vivo* электропорации. Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, способствующих доставке композиций и иммуногенных комбинаций согласно заявке, в частности, включающих плазмиды ДНК, являются CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, Пенсильвания, США), электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) система доставки Tri-Grid™ (Ichor Medical Systems, Inc., San Diego, Калифорния, 92121, США) и описываемые в Патенте США № 7,664,545, Патенте США № 8,209,006, Патенте США № 9,452,285, Патенте США № 5,273,525, Патенте США № 6,110,161, Патенте США № 6,261,281, Патенте США № 6,958,060 и Патенте США № 6,939,862, Патенте США № 7,328,064, Патенте США № 6,041,252, Патенте США № 5,873,849, Патенте США № 6,278,895, Патенте США № 6,319,901, Патенте США № 6,912,417, Патенте США № 8,187,249, Патенте США № 9,364,664, Патенте США № 9,802,035, Патенте США № 6,117,660 и публикации Международной патентной заявки WO2017172838, которые включены в данный документ путем ссылки в их полном объеме. Другие примеры устройств для *in vivo* электропорации описаны в Международной патентной заявке под названием “Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines”, поданной в один день с настоящей заявкой, с номером в Книге записей 688097-405WO, содержание которых включено в данный документ путем ссылки в их полном объеме. Также для доставки композиций и иммуногенных комбинаций согласно заявке заявкой предусмотрено применение импульсного электрического поля, например, как описано в Патенте США № 6,697,669, который включен в данный документ путем ссылки в полном объеме.

[263] В других вариантах осуществления заявленного изобретения, согласно которому фармацевтическая композиция или иммуногенная комбинация включает одну или несколько плазмид ДНК, способом введения является чрескожный. Чрескожное введение комбинируют с соскабливанием эпидермиса кожи для облегчения доставки плазмид ДНК в клетки. Например, для соскабливания эпидермиса кожи применяют дерматологический пластырь. После снятия дерматологического пластыря композицию или иммуногенную комбинацию наносят на соскобленную кожу.

[264] Способы доставки не ограничиваются вышеописанными вариантами осуществления, и возможно применение любых средств внутриклеточной доставки. Другие способы внутриклеточной доставки, предусмотренные способами согласно заявке, включают, помимо прочих, инкапсуляцию липосом, липоплексы, наночастицы и т. п. Например, РНК-репликон согласно заявке рецептируют в иммуногенной композиции, которая включает одну или несколько липидных молекул, предпочтительно положительно заряженных липидных молекул. В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон согласно изобретению рецептируют с применением одной или нескольких липосом, липоплексов и/или липидных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления описанные авторами рецептуры липосом или липидных наночастиц включают поликатионную композицию. В некоторых вариантах осуществления рецептуры, включающие поликатионную композицию, применяют для доставки описанного авторами РНК-репликона *in vivo* и/или *ex vitro*.

[265] В соответствии с настоящим изобретением, термин "липид" относится к любому производному жирной кислоты или другому амфифильному соединению, способному образовывать лиотропную липидную фазу или, более предпочтительно, ламеллярную лиотропную фазу. В частности, термин "липид" касается любого производного жирной кислоты, способного образовывать бислойную структуру, таким образом, чтобы гидрофобная часть липидной молекулы была ориентирована в направлении бислойной структура, тогда как гидрофильная часть ориентирована в направлении водной фазы. Термин "липид" включает нейтральные, анионные или катионные липиды. Липиды предпочтительно включают гидрофобный домен с по меньшей мере одной, предпочтительно двумя, алкильными цепями или холестеринным компонентом и полярной головной группой. Алкильные цепи жирных кислот в гидрофобном домене липида не ограничиваются конкретной длиной или количеством двойных связей. Несмотря на это, предпочтение отдают жирной кислоте, имеющей длину от 10 до 30, предпочтительно от 14 до 25 атомов углерода. В возможном варианте липид также включает две разных жирных кислоты.

[266] В контексте раскрытия настоящего изобретения носитель для доставки на липидной основе, как правило, служит для транспорта нужного РНК-репликона в клетку-мишень или ткань-мишень. В некоторых вариантах

осуществления носитель для доставки на липидной основе включает наночастицу или бислойную структуру липидных молекул и РНК-репликон согласно раскрытию настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления бислойная структура липида предпочтительно также включает нейтральный липид или полимер. Термин “нейтральный липид” означает виды липидов, которые существуют либо в неизменной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме при выбранном уровне рН. При физиологическом уровне рН такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, церамид, сфингомиелин, цефалин, холестерин, цереброзиды и диацилглицерины. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция предпочтительно включает жидкую среду. В некоторых вариантах осуществления композиция предпочтительно также инкапсулирует нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция предпочтительно также включает нуклеиновую кислоту и нейтральный липид или полимер. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция предпочтительно инкапсулирует нуклеиновую кислоту.

[267] Описание обеспечивает липидные композиции, включающие один или несколько РНК-репликонов, инкапсулированных в липидной композиции. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает липосомы. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает катионные липосомы. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает липидные наночастицы.

[268] В некоторых вариантах осуществления РНК-репликон или комбинация молекул нуклеиновых кислот полностью инкапсулированы в липидную часть липидной композиции, таким образом, что РНК-репликон или комбинация молекул нуклеиновых кислот в липидной композиции являются устойчивыми в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Термин “полностью инкапсулированный” означает, что нуклеиновая кислота (например, РНК-репликон) в частице нуклеиновой кислоты – липида не претерпевает значительного расщепления после воздействия сыворотки или нуклеазного анализа, которые в значительной мере расщепляли бы свободную РНК. При полной инкапсуляции предпочтительно расщепляется менее чем 25 % нуклеиновой кислоты в частице в условиях, в которых обычно расщеплялись бы 100 % свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно расщепляется

менее чем 10 %, наиболее предпочтительно – менее чем 5 % нуклеиновой кислоты в частице. “Полностью инкапсулированный” в контексте данного описания также означает, что частицы нуклеиновой кислоты – липида не поддаются быстрому распаду на их составные части после введения *in vivo*. В
5 других вариантах осуществления описанные авторами липидные композиции являются по сути нетоксичными для млекопитающих, таких как человек. В некоторых вариантах осуществления комбинация нуклеиновых кислот является инкапсулированной в одну липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления каждая молекула нуклеиновой кислоты в комбинации молекул
10 нуклеиновых кислот является независимо инкапсулированной в отдельные липидные наночастицы.

[269] Липидные композиции согласно раскрываемому изобретению также, как правило, имеют общее соотношение липида:РНК (соотношение масса/масса) от приблизительно 1:1 до приблизительно 100:1, от приблизительно 1:1 до
15 приблизительно 50:1, от приблизительно 2:1 до приблизительно 45:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 40:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 38:1, или от приблизительно 6:1 до приблизительно 40:1, или от приблизительно 7:1 до приблизительно 35:1, или от приблизительно 8:1 до приблизительно 30:1; или от приблизительно 10:1 до приблизительно 25:1; или
20 от приблизительно 8:1 до приблизительно 12:1; или от приблизительно 13:1 до приблизительно 17:1; или от приблизительно 18:1 до приблизительно 24:1; или от приблизительно 20:1 до приблизительно 30:1. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления общее соотношение липида:РНК (соотношение масса/масса) составляет от приблизительно 10:1 до приблизительно 25:1. Это
25 соотношение может быть любым значением или подзначением в пределах упомянутых диапазонов, включая предельные значения.

[270] Липидные композиции согласно раскрытию настоящего изобретения, как правило, имеют средний диаметр от приблизительно 30 нм до
30 приблизительно 150 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 до приблизительно 90 нм, от приблизительно 80 нм до

приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм, или приблизительно 30 нм, приблизительно 35 нм, приблизительно 40 нм, приблизительно 45 нм, приблизительно 50 нм, приблизительно 55 нм, приблизительно 60 нм, приблизительно 65 нм, приблизительно 70 нм, приблизительно 75 нм, приблизительно 80 нм, приблизительно 85 нм, приблизительно 90 нм, приблизительно 95 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 105 нм, приблизительно 110 нм, приблизительно 115 нм, приблизительно 120 нм, приблизительно 125 нм, приблизительно 130 нм, приблизительно 135 нм, приблизительно 140 нм, приблизительно 145 нм, или приблизительно 150 нм, и являются по сути нетоксичными. Диаметр может быть любым значением или подзначением в пределах упомянутых диапазонов, включая предельные значения. Кроме того, нуклеиновые кислоты, присутствующие в липидных наночастицах согласно раскрытию настоящего изобретения, в водном растворе устойчивы к расщеплению нуклеазой.

[271] В предпочтительных вариантах осуществления липидные композиции включают РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, катионный липид (например, один или несколько катионных липидов или их описанных авторами солей), фосфолипид и конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, один или несколько конъюгатов ПЭГ-липидов). Липидные композиции также включают холестерин. Термин “липидный конъюгат” означает конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию липидных частиц. К таким липидным конъюгатам относятся, помимо прочих, конъюгаты ПЭГ-липидов, такие как, например, ПЭГ, соединенный с диалкилоксипропилами (например, конъюгаты ПЭГ-ДАА), ПЭГ, соединенный с диацилглицеринами (например, конъюгаты ПЭГ-ДАГ), ПЭГ, соединенный с холестерином, ПЭГ, соединенный с фосфатидилэтаноламинами, и ПЭГ, конъюгированный с церамидами, катионные ПЭГ-липиды, конъюгаты полиоксазолина (ПОЗ) - липидов, полиамидные олигомеры и их смеси. ПЭГ или ПОЗ конъюгируют прямо с липидом или связывают с липидом через линкерный компонент. Возможно использование любого линкерного компонента, подходящего для соединения ПЭГ или ПОЗ с липидом, включая, например, не содержащие сложных эфиров линкерные компоненты и содержащие сложные эфиры линкерные компоненты. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления используют не содержащие сложных эфиров линкерные

компоненты, такие как амиды или карбаматы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ПЭГ-липидным конъюгатом является 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид (т. е., ALC-0159).

[272] Термин “катионный липид” в контексте данного описания относится к амфифильным липидам и их солям, имеющим положительную, гидрофильную головную группу; одну, две, три или более гидрофобных (т. е., имеющих неполярные группы) жирных кислот или жирных алкильных цепей; и соединитель между этими двумя доменами. Ионизируемый или протонизируемый катионный липид, как правило, является протонированным (т. е., положительно заряженным) при pH ниже его pK_a и по сути нейтральным при pH выше pK_a . Предпочтительными ионизируемыми катионными липидами являются те, которые имеют pK_a ниже, чем физиологический pH, который обычно составляет около 7.4. Катионные липиды согласно раскрываемому изобретению также называют титруемыми катионными липидами. В возможных вариантах катионными липидами являются “аминолипиды”, имеющие протонизируемую третичную аминную (например, pH-титруемую) головную группу. Некоторые типичные аминолипиды включают C_{18} алкильные цепи, причем каждая алкильная цепь независимо имеет от 0 до 3 (например, 0, 1, 2, или 3) двойных связей; и эфирные, сложноэфирные или кетальные связи между головной группой и алкильными цепями. Такие катионные липиды включают, помимо прочих, (4-гидроксибутил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканонат (также известный как ALC-0315), Lipofectin™, также известный как DOTMA (N-D-(2,3-диолеилокси) пропила N,N, N-триметиламмонийхлорид), DOTAP (1,2-бис (олеилокси)-3 (триметиламмоний) пропан), DDAB (диметилдиоктадецил-аммонийбромид), DOGS (диоктадециламидологлицил-спермин), DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (также известный как DLin-C2K-DMA, XTC2, и C2K), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (также известный как MC2), DLin-M-C3-DMA (также известный как MC3), (DLin-MP- DMA) (также известный как 1-BI 1) и производные холестерина, такие как DCChol (3 бета-(N—(N',N'-диметиламинометан)-карбамоил) холестерин). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления катионным липидом является ((4-гидроксибутил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканонат), т. е., ALC-0315.

[273] Термин “анионный липид” в контексте данного описания относится к липиду, который является отрицательно заряженным при физиологическом рН. К этим липидам относятся, помимо прочих, фосфатидилглицерины, кардиолипины, диацилфосфатидилсерины, диацилфосфатидные кислоты, N-додеканоилфосфатидилэтаноламины, N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины, лизилфосфатидилглицерины, пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG) и другие анионные модифицирующие группы, связанные с нейтральными липидами.

[274] В композициях нуклеиновых кислот – липидов возможна полная инкапсуляция РНК-репликона или комбинации молекул нуклеиновых кислот в пределах липидной части композиции, что защищает нуклеиновую кислоту от расщепления нуклеазой. В предпочтительных вариантах осуществления липидная композиция, включающая РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, полностью инкапсулирована в пределах липидной части липидной композиции, что защищает нуклеиновую кислоту от расщепления нуклеазой. В некоторых случаях РНК-репликон или комбинация молекул нуклеиновых кислот в липидной композиции не претерпевает существенного распада после воздействия на частицы нуклеазы при 37 °С в течение по меньшей мере 20, 30, 45 или 60 минут. В некоторых других случаях РНК-репликон или комбинация молекул нуклеиновых кислот в липидной композиции не претерпевает существенного распада после инкубации композиции в сыворотке при 37 °С в течение по меньшей мере 30, 45, или 60 минут или по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36 часов. В других вариантах осуществления образуют комплекс РНК-репликона или комбинации молекул нуклеиновых кислот с липидной частью композиции.

[275] В контексте нуклеиновых кислот полную инкапсуляцию определяют путем выполнения эксклюзионного анализа с не проникающим через мембрану флуоресцентным красителем, в котором используют краситель, обладающий повышенной флуоресценцией, когда он ассоциирован с нуклеиновой кислотой. Инкапсуляцию определяют путем добавления красителя к липидной композиции, измерения полученной в результате флуоресценции и ее сравнения с флуоресценцией, наблюдаемой после добавление малого количества неионного детергента. Опосредованный детергентом разрыв липидного слоя высвобождает инкапсулированную нуклеиновую кислоту, позволяя ей взаимодействовать с не

проникающим через мембрану красителем. Инкапсуляцию нуклеиновой кислоты вычисляют как $E = (I_0 - I)/I_0$, где I и I_0 представляют значения интенсивности флуоресценции до и после добавления детергента.

[276]В других вариантах осуществления раскрытие настоящего изобретения обеспечивает композицию нуклеиновой кислоты – липида, включающую множество наночастиц нуклеиновых кислот – липосом, нуклеиновых кислот – катионных липосом или нуклеиновых кислот – липидов. В некоторых вариантах осуществления композиция нуклеиновой кислоты – липида включает множество РНК-репликонов – липосом. В некоторых вариантах осуществления композиция нуклеиновой кислоты – липида включает множество РНК-репликонов – катионных липосом. В некоторых вариантах осуществления композиция нуклеиновой кислоты – липида включает множество РНК-репликонов – липидных наночастиц.

[277]В некоторых вариантах осуществления липидные композиции включают РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, которая полностью инкапсулирована в пределах липидной части композиции, таким образом, что от приблизительно 30 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 40 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 50 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 60 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 70 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 80 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 90 % до приблизительно 100 %, от приблизительно 30 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 40 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 50 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 60 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 70 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 80 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 85 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 90 % до приблизительно 95 %, от приблизительно 95 %, от приблизительно 30 % до приблизительно 90 %, от приблизительно 40 % до приблизительно 90 %, от приблизительно 50 % до приблизительно 90 %, от приблизительно 60 % до приблизительно 90 %, от приблизительно 70 % до приблизительно 90 %, от приблизительно 80 % до приблизительно 90 %, или по меньшей мере приблизительно 30 %, приблизительно 35 %, приблизительно 40 %, приблизительно 45 %, приблизительно 50 %, приблизительно 55 %, приблизительно 60 %, приблизительно 65 %, приблизительно 70 %, приблизительно 75 %,

приблизительно 80 %, приблизительно 85 %, приблизительно 90 %, приблизительно 91 %, приблизительно 92 %, приблизительно 93 %, приблизительно 94 %, приблизительно 95 %, приблизительно 96 %, приблизительно 97 %, приблизительно 98 %, или приблизительно 99 % (или любое дробное значение или диапазон в этих пределах) частиц имеют инкапсулированные в них РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот. Количество может быть любым значением или подзначением в пределах упомянутых диапазонов, включая предельные значения.

[278] В зависимости от предполагаемого применения липидной композиции пропорции компонентов колеблются, и эффективность доставки конкретной композиции измеряют с применением анализов, известных специалистам в данной области техники.

[279] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые авторами экспрессируемые полинуклеотиды и РНК-репликоны являются липидными рецептурами. Липидную композицию предпочтительно выбирают, помимо прочего, из липосом, катионных липосом и липидных наночастиц. В одном предпочтительном варианте осуществления липидная композиция является катионной липосомой или липидной наночастицей (LNP), включающей:

- (а) РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот согласно раскрытию настоящего изобретения,
- (б) катионный липид,
- (в) уменьшающий агрегацию агент (такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ) – липид или ПЭГ-модифицированный липид),
- (г) необязательно некаатионный липид (такой как нейтральный липид) и
- (д) необязательно стерин.

[280] Предпочтительно липидная наночастица, инкапсулирующая РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, включает катионный липид и по меньшей мере один другой липид, выбранный из группы, к которой относятся анионные липиды, цвиттер-ионные липиды, нейтральные липиды, стероиды, конъюгированные с полимерами липиды, фосфолипиды, гликолипиды и их комбинации.

[281] В некоторых вариантах осуществления катионный липид является ионизируемым катионным липидом. В одном варианте осуществления липидная

наночастичная композиция состоит из (I) по меньшей мере одного катионного липида; (II) хелперного липида; (III) стерина (например, холестерина); и (IV) ПЭГ-липидов в молярном отношении от приблизительно 30 % до приблизительно 60 % ионизируемого катионного липида: от приблизительно 5 % до приблизительно 20 % хелперного липида: от приблизительно 35 % до приблизительно 50 % стерина: приблизительно 0,5 - 5 % ПЭГ-липидов. Примеры катионных липидов (включая ионизируемые катионные липиды), хелперных липидов (например, нейтральных липидов), стерина и лигандсодержащих липидов (например, ПЭГ-липидов) описаны авторами ниже.

10 [282]Выбор конкретных липидов и их относительный процентный состав зависит от нескольких факторов, включая желаемый терапевтический эффект, предусмотренный целевой объектом *in vivo* доставки и запланированные режим дозирования и частота введения доз. В целом наиболее предпочтительны липиды, соответствующие требованиям высокой эффективности (т. е.,
15 терапевтическому эффекту, такому как нокдаун-активность или эффективность трансляции) и способности к биологическому разложению. В результате которого обеспечивается быстрый тканевый клиренс. Однако способность к биологическому разложению бывает менее важна для композиций, предназначенных только для одного или двух введений одному субъекту. Кроме
20 того, липидная композиция требует тщательной инженерии для того, чтобы липидная композиция сохраняла свою морфологию во время *in vivo* введение и ее перемещения к предназначенной цели, но затем могла высвободить активный агент после поглощения клетками-мишенями. Таким образом, как правило, требуется оценка нескольких композиций для определения наилучшей
25 из возможных комбинаций липидов в наилучшем из возможных молярных соотношений липидов, а также соотношений общего количества липида с активным ингредиентом.

[283]Подходящие липидные компоненты и способы производства липидных наночастиц хорошо известны специалистам в данной области техники и
30 описаны, например, в публикациях PCT/US2020/023442, U.S. 8,058,069, U.S. 8,822,668, U.S. 9,738,593, U.S. 9,139,554, PCT/US2014/066242, PCT/US2015/030218, PCT/2017/015886 и PCT/US2017/067756, содержание которых включено в данный документ путем ссылки.

Катионные липиды

[284] Липидная композиция предпочтительно включает катионный липид, подходящий для образования катионной липосомы или липидной наночастицы. Катионные липиды широко изучают с точки зрения доставки нуклеиновых кислот, поскольку они способны связываться с отрицательно заряженными мембранами и вызывать поглощение. В целом катионные липиды являются амфифильными веществами, содержащими положительную гидрофильную головную группу, два (или более) липофильных хвоста или стероидную часть и соединитель между этими двумя доменами. Предпочтительно катионный липид несет положительный суммарный заряд при приблизительно физиологическом рН. Катионные липосомы традиционно являются наиболее часто применяемыми невирусными системами доставки для олигонуклеотидов, включая плазмидные ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК / малые шпилечные РНК – мшРНК. Катионные липиды, такие как DOTAP, (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан) и DOTMA (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний метилсульфат) образуют комплексы или липоплексы с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами путем электростатического взаимодействия, обеспечивая высокую эффективность *in vitro* трансфекции.

[285] В раскрываемых авторами липидных композициях катионный липид в возможных вариантах представляет собой, например, ((4-гидроксibuтил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканонат) (также известный как ALC-0315), N,N-диолеил-N,N-диметиламмонийхлорид (DODAC), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмонийбромид (DDAB), 1,2-диолеоилтриметиламмонийпропанхлорид (DOTAP) (также известный как N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорид и хлоридную соль 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорид (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-Дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 1,2-ди-γ-линоленилокси-N,N-диметиламинопропан (γ-DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-

диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлоридную соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлоридную соль 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ), или 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или их аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (C12-200), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-K-C2-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино) бутаноат (DLin-M-C3-DMA), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илокси)-N,N-диметилпропан-1-амин (MC3 эфир), 4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илокси)-N,N-диметилбутан-1-амин (MC4 эфир) или любую их комбинацию. К другим катионным липидам относятся, помимо прочих, N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид (DDAB), 3P-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Choi), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(сперминкарбоксамидо)этил)-N,N-диметиламмоний трифторацетат (DOSPA), диоктадециламидоглицилкарбокиспермин (DOGS), 1,2-диолеил-sn-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний пропан (DODAP), N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмонийбромид (DMRIE) и 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС). Кроме того, существует возможность применения препаратов катионных липидов промышленного производства, например, LIPOFECTIN (содержащий DOTMA и DOPE, производимые GIBCO/BRL), и Липофектамин (содержащий DOSPA и DOPE, производимые GIBCO/BRL).

[286] Другие подходящие катионные липиды раскрываются в международных публикациях №№ WO 09/086558, WO 09/127060, WO 10/048536,

WO 10/054406, WO 10/088537, WO 10/129709 и WO 2011/153493; публикациях Патентов США №№ 2011/0256175, 2012/0128760 и 2012/0027803; Патенте США № 8,158,601; и публикации Love *et al.*, PNAS, 107(5), 1864 - 69, 2010, содержание которых включено в данный документ путем ссылки.

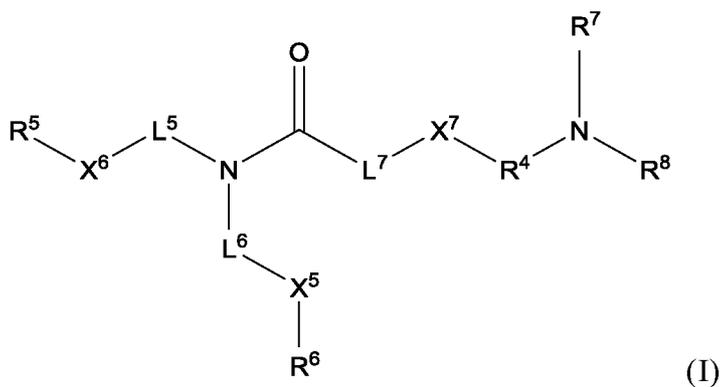
5 [287]К другим подходящим катионным липидам относятся имеющие альтернативные жирнокислотные группы и другие диалкиламиногруппы, включая те, в которых алкильные заместители отличаются друг от друга (например, N-этил-N-метиламино- и N-пропил-N-этиламино-). Эти липиды составляют часть подкатегории катионных липидов, называемых
10 аминολипидами. В некоторых вариантах осуществления описываемых авторами липидных композиций катионным липидом является аминολипид. В целом аминολипиды, имеющие менее насыщенные ацильные цепи, легче поддаются установлению размера, в частности, в случаях, когда размеры комплексов должны быть меньше, чем приблизительно 0,3 микрона, что целесообразно с
15 точки зрения стерилизации фильтрованием. Возможно использование аминολипидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи в диапазоне от C₁₄ до C₂₂. Также возможно использование других остовов для отделения аминогруппы и жирной кислоты или жирного алкила аминολипида.

20 [288]В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает катионный липид Формулы I в соответствии с патентной заявкой PCT/EP2017/064066. В этом контексте раскрытие заявки PCT/EP2017/064066 также включено в данный документ путем ссылки.

[289] В некоторых вариантах осуществления амино или катионные липиды
25 согласно раскрытию настоящего изобретения являются ионизируемыми и имеют по меньшей мере одну протонизируемую или депротонизируемую группу, таким образом, чтобы липид был положительно заряженным при рН на уровне или ниже физиологического рН (например, рН 7,4) и нейтральным при втором рН, предпочтительно на уровне или выше физиологического рН. Конечно, следует
30 понимать, что добавление или удаление протонов в зависимости от уровня рН представляет собой равновесный процесс, и ссылка на заряженный или нейтральный липид касается характера преобладающего вида и не требует, чтобы весь липид присутствовал в заряженной или нейтральной форме. Согласно раскрытию изобретения, не исключено использование липидов,

имеющих больше одной протонируемой или депротонируемой группы, или являющихся цвиттер-ионными. В определенных вариантах осуществления протонируемые липиды имеют рКа протонируемой группы в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 11. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый катионный липид имеет рКа от приблизительно 5 до приблизительно 7. В некоторых вариантах осуществления рКа ионизируемого катионного липида составляет от приблизительно 6 до приблизительно 7.

[290] В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает ионизируемый катионный липид Формулы I:



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, причем R^5 и R^6 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся линейный или разветвленный $\text{C}_1\text{-C}_{31}$ алкил, $\text{C}_2\text{-C}_{31}$ алкенил или $\text{C}_2\text{-C}_{31}$ алкинил и холестерил; L^5 и L^6 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся линейный $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкил и $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенил; X^5 является -C(O)O- , в соответствии с чем образуется -C(O)O-R^6 , или -OC(O)- , в соответствии с чем образуется -OC(O)-R^6 ; X^6 является -C(O)O- , в соответствии с чем образуется -C(O)O-R^5 , или -OC(O)- , в соответствии с чем образуется -OC(O)-R^5 ; X^7 является S или O; L^7 отсутствует или является нижним алкилом; R^4 является линейным или разветвленным $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкилом; и R^7 и R^8 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся водород и линейный или разветвленный $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил.

[291] В некоторых вариантах осуществления X^7 является S.

[292] В некоторых вариантах осуществления X^5 является -C(O)O- , в соответствии с чем образуется -C(O)O-R^6 , и X^6 является -C(O)O- , в соответствии с чем образуется -C(O)O-R^5 .

[293] В некоторых вариантах осуществления R^7 и R^8 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся метил, этил и изопропил.

[294] В некоторых вариантах осуществления L^5 и L^6 каждый независимо друг от друга являются C_1 - C_{10} алкилом. В некоторых вариантах осуществления L^5 является C_1 - C_3 алкилом, и L^6 является C_1 - C_5 алкилом. В некоторых вариантах осуществления L^6 является C_1 - C_2 алкилом. В некоторых вариантах осуществления каждый из L^5 и L^6 является линейным C_7 алкилом. В некоторых вариантах осуществления каждый из L^5 и L^6 является линейным C_9 алкилом.

[295] В некоторых вариантах осуществления R^5 и R^6 каждый независимо друг от друга являются алкенилом. В некоторых вариантах осуществления R^6 является алкенилом. В некоторых вариантах осуществления R^6 является C_2 - C_9 алкенилом. В некоторых вариантах осуществления алкенил включает одну двойную связь. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^5 и R^6 является алкилом. В некоторых вариантах осуществления R^5 является разветвленным алкилом. В некоторых вариантах осуществления R^5 и R^6 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся C_9 алкил, C_9 алкенил и C_9 алкинил. В некоторых вариантах осуществления R^5 и R^6 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся C_{11} алкил, C_{11} алкенил и C_{11} алкинил. В некоторых вариантах осуществления R^5 и R^6 , каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся C_7 алкил, C_7 алкенил и C_7 алкинил. В некоторых вариантах осуществления R^5 является $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)_2$ или $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, причем p равняется 4-8. В некоторых вариантах осуществления p равняется 5, и L^5 является C_1 - C_3 алкилом. В некоторых вариантах осуществления p равняется 6, и L^5 является C_3 алкилом. В некоторых вариантах осуществления p равняется 7. В некоторых вариантах осуществления p равняется 8, и L^5 является C_1 - C_3 алкилом. В некоторых вариантах осуществления R^5 состоит из $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, причем p равняется 7 или 8.

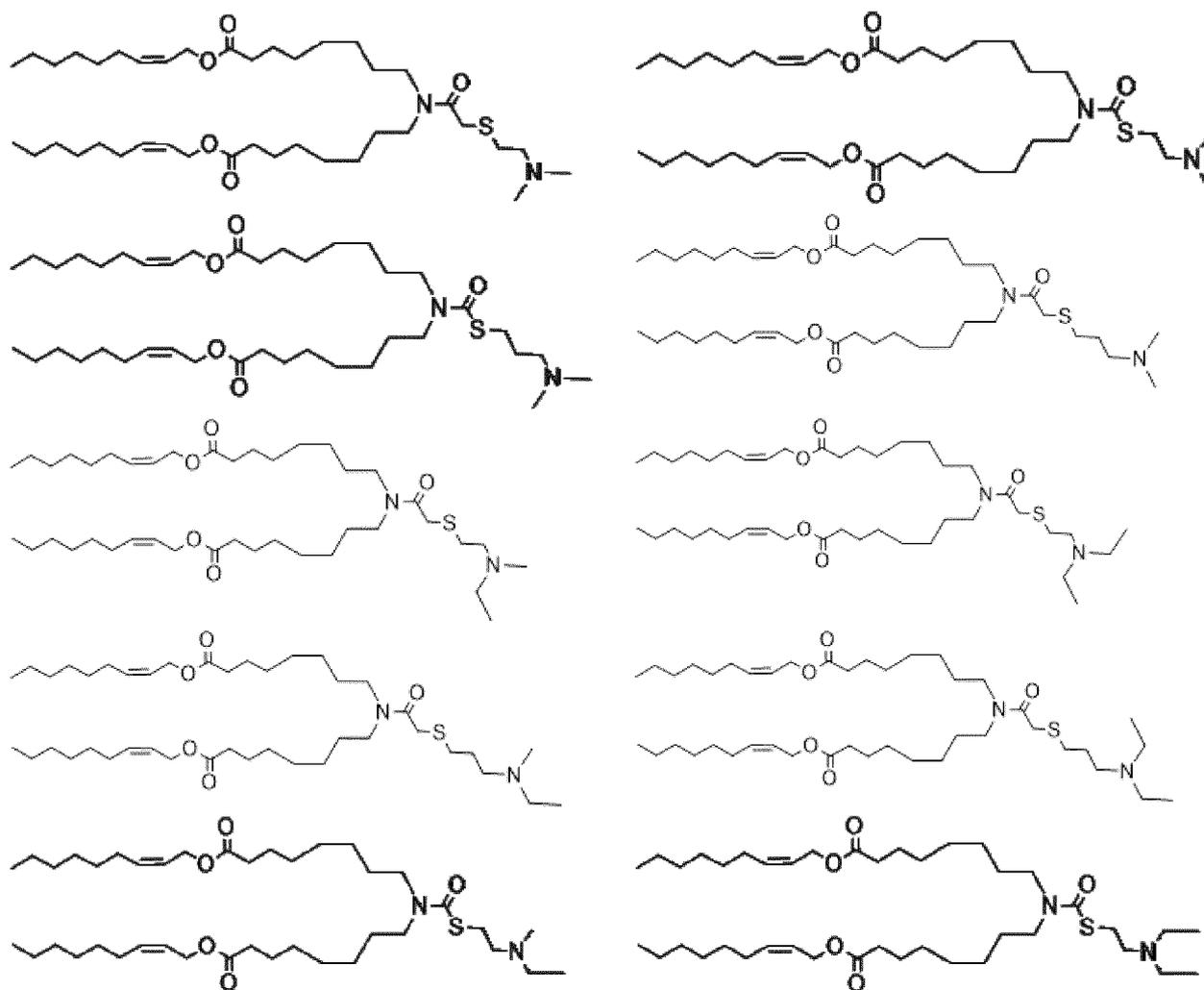
[296] В некоторых вариантах осуществления R^4 является этиленом или пропиленом. В некоторых вариантах осуществления R^4 является n -пропиленом или изобутиленом.

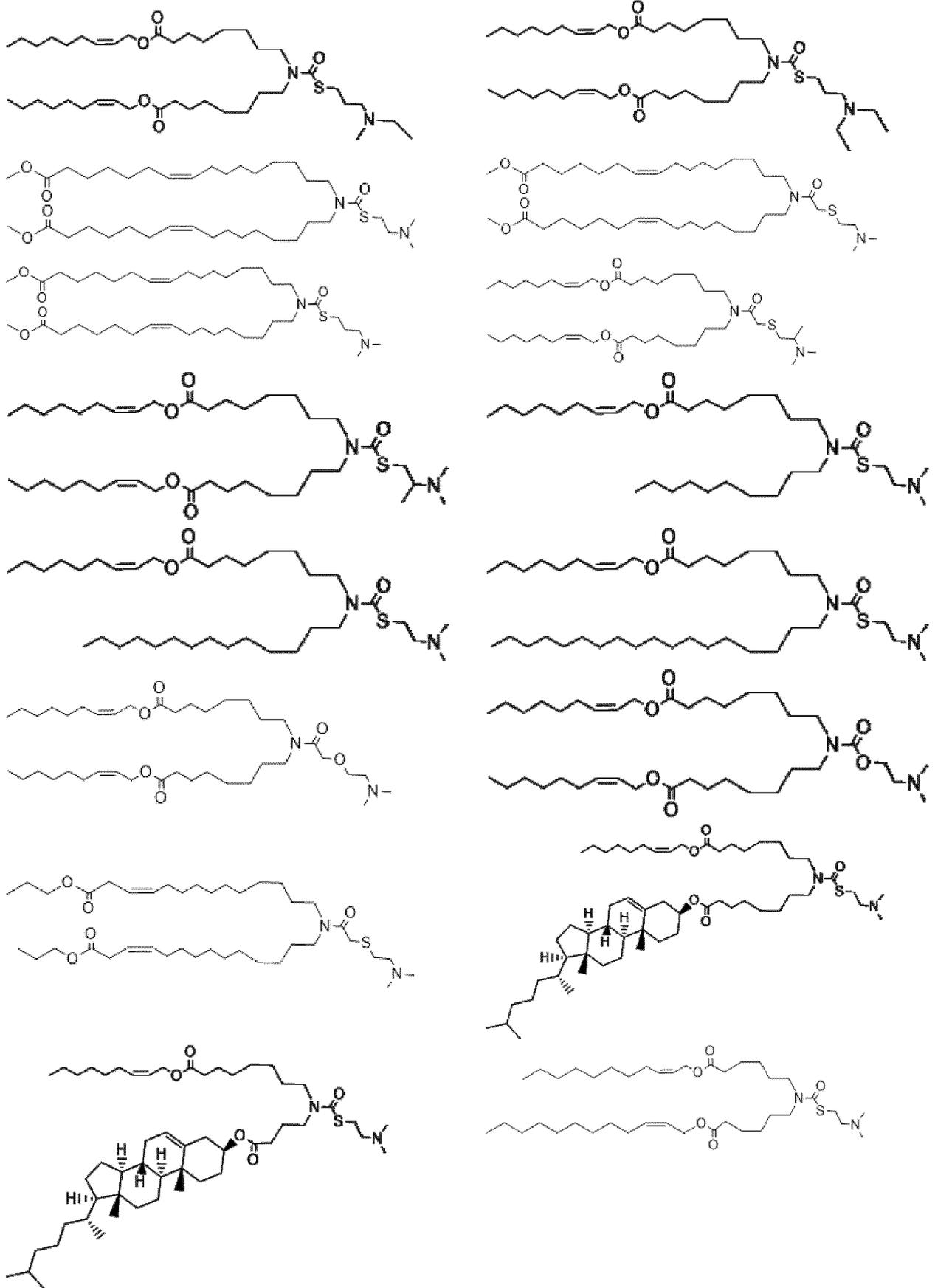
[297] В некоторых вариантах осуществления L^7 отсутствует, R^4 является этиленом, X^7 является S, и каждый из R^7 и R^8 является метилом. В некоторых вариантах осуществления L^7 отсутствует, R^4 является n -пропиленом, X^7 является

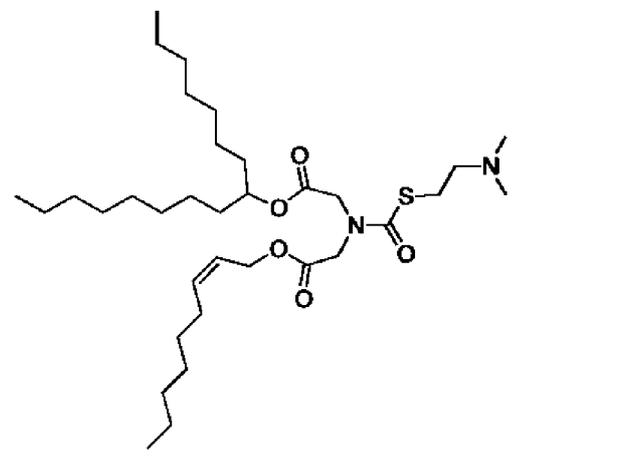
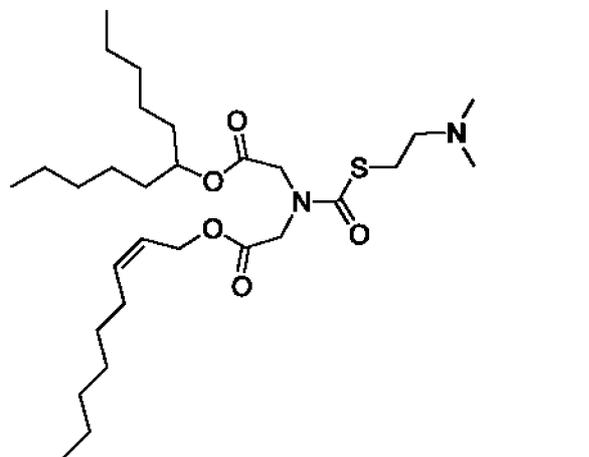
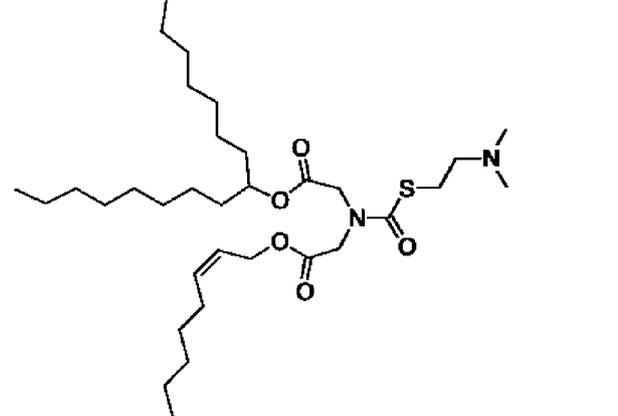
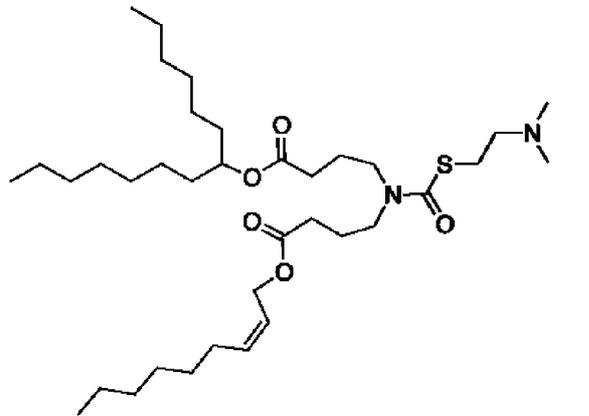
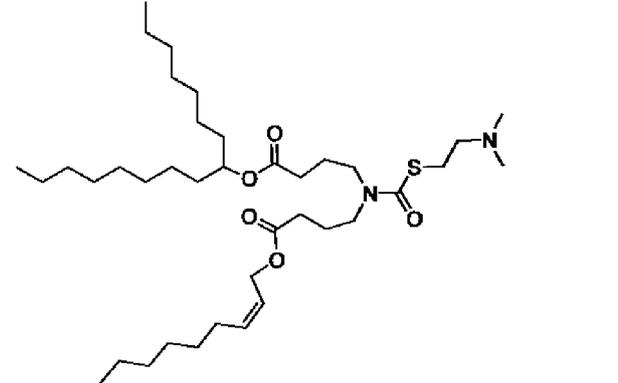
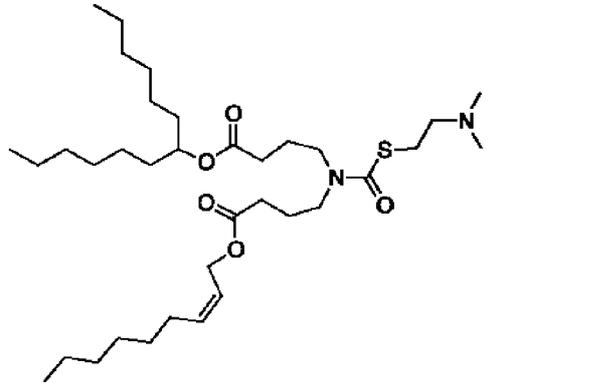
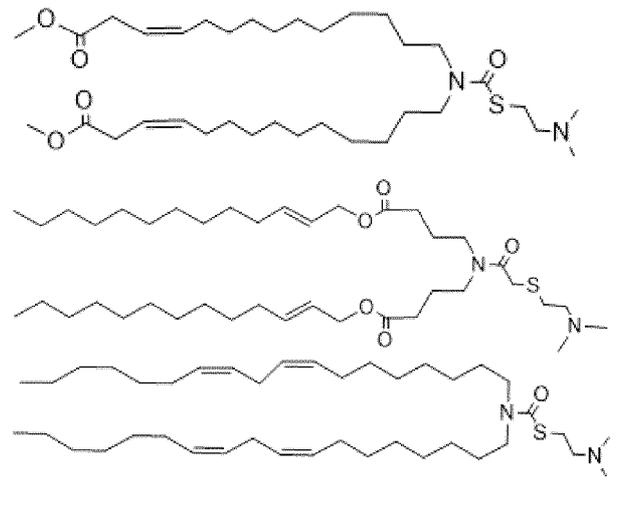
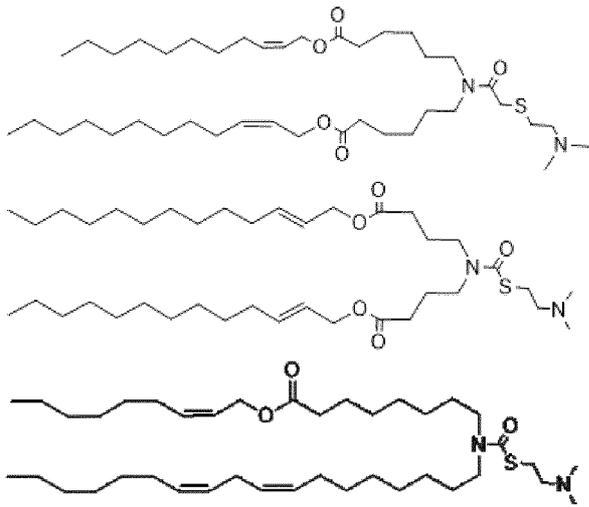
S, и каждый из R⁷ и R⁸ является метилом. В некоторых вариантах осуществления L⁷ отсутствует, R⁴ является этиленом, X⁷ является S, и каждый из R⁷ и R⁸ является этилом.

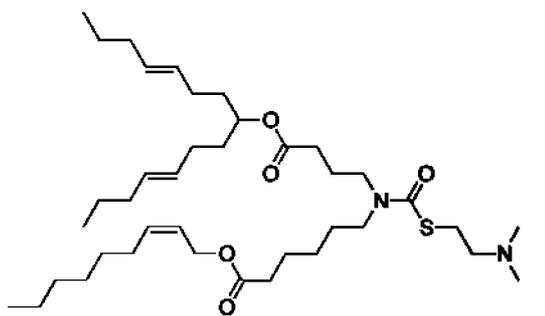
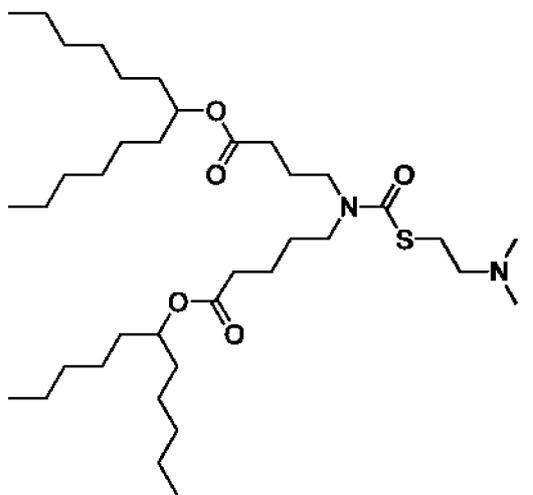
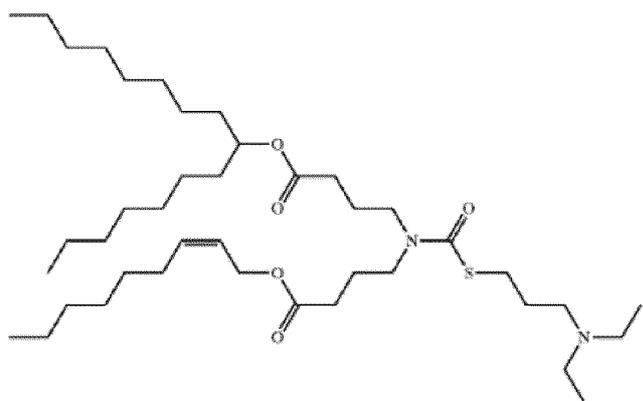
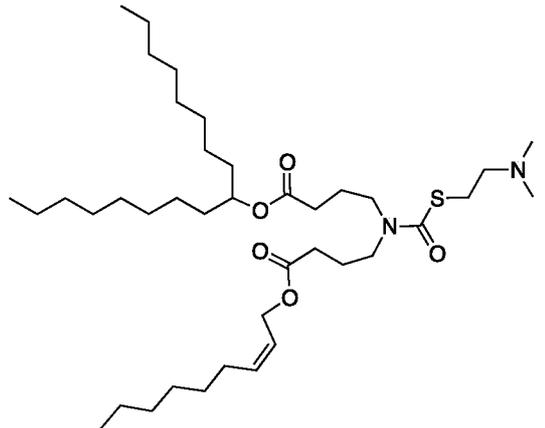
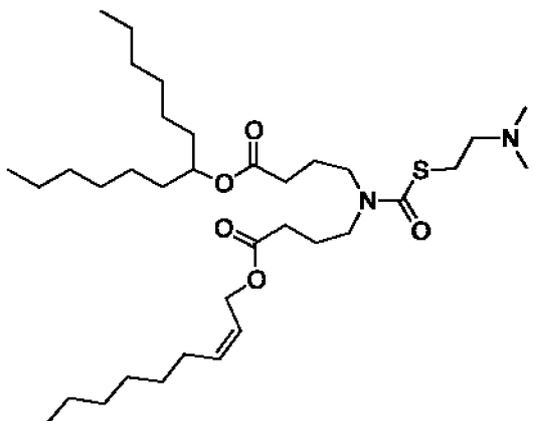
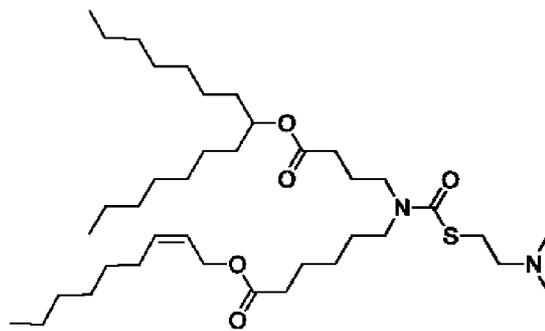
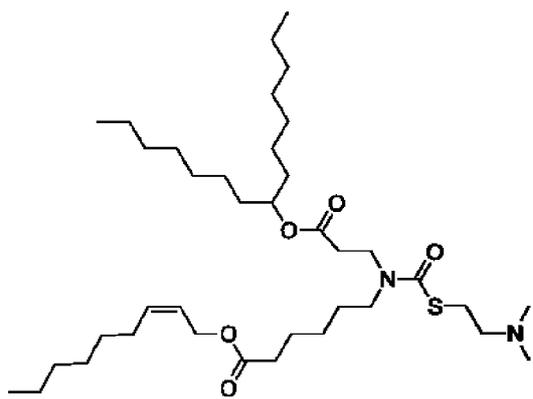
5 [298] В некоторых вариантах осуществления X⁷ является S, X⁵ является -C(O)O-, в соответствии с чем образуется -C(O)O-R⁶, X⁶ является -C(O)O-, в соответствии с чем образуется -C(O)O-R⁵, L⁵ и L⁶ каждый независимо друг от друга являются линейным C₃-C₇ алкилом, L⁷ отсутствует, R⁵ является -CH((CH₂)_pCH₃)₂, и R⁶ является C₇-C₁₂ алкенилом. В некоторых других вариантах осуществления r равняется 6, и R⁶ является C₉ алкенилом.

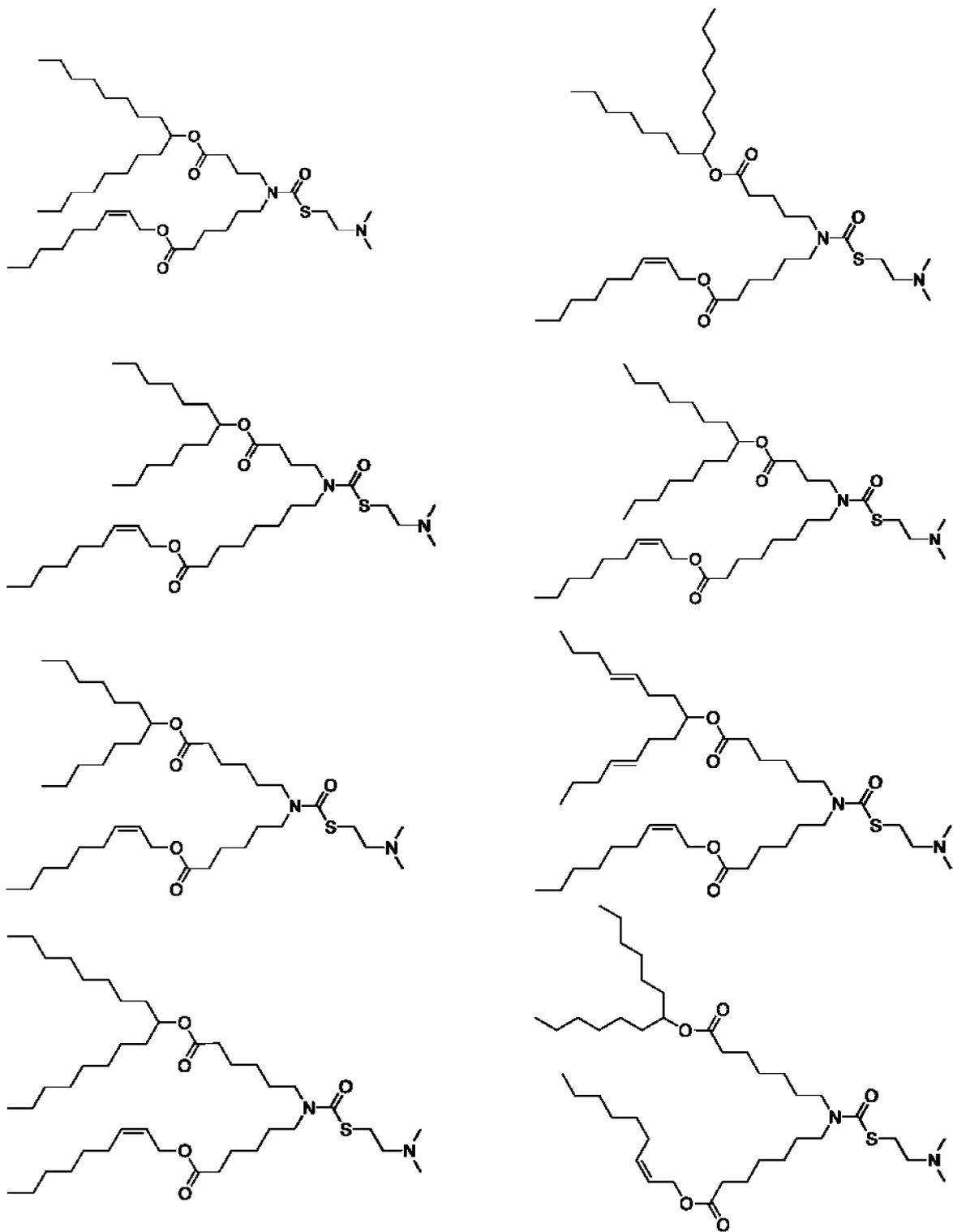
10 [299] В некоторых вариантах осуществления липидная композиция включает ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, к которой относятся

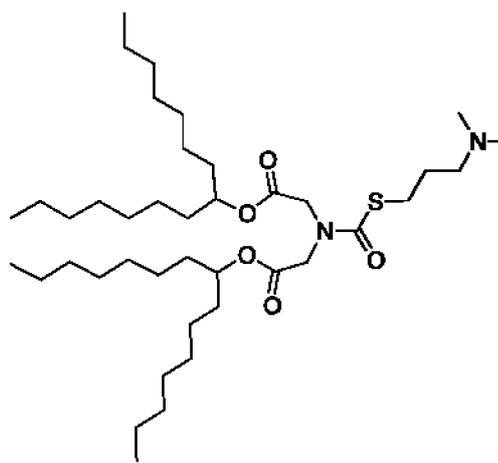
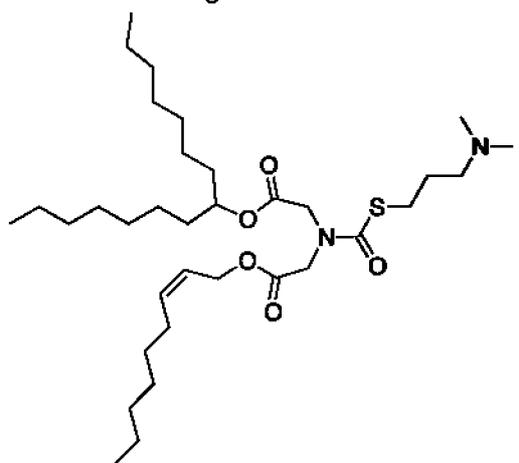
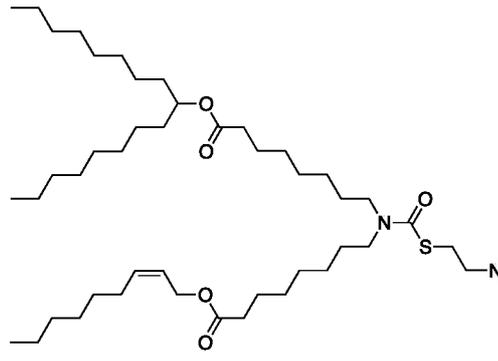
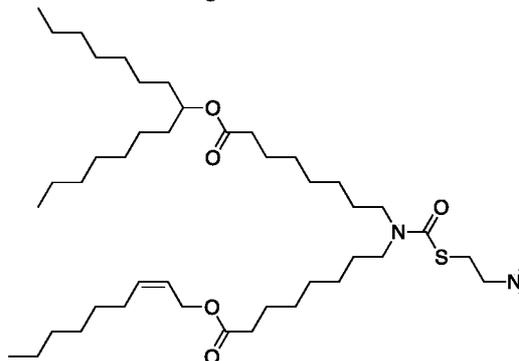
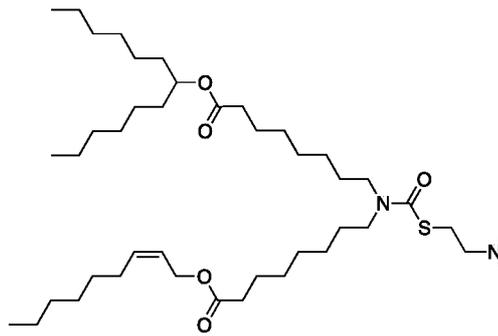
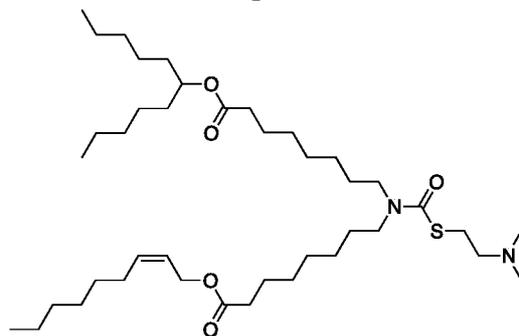
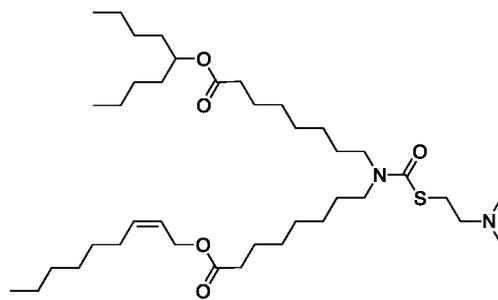
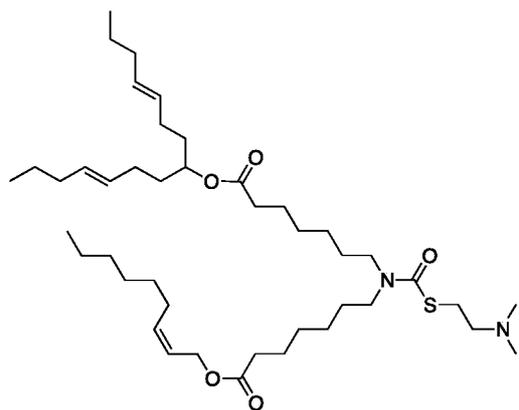


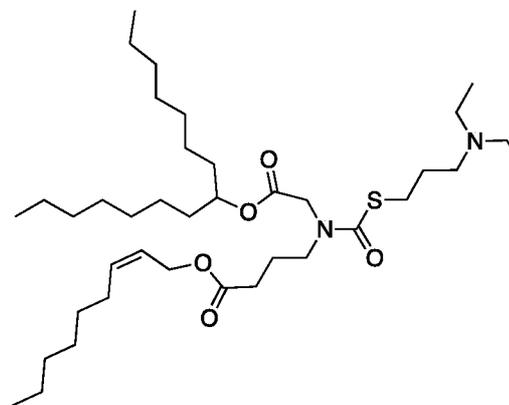
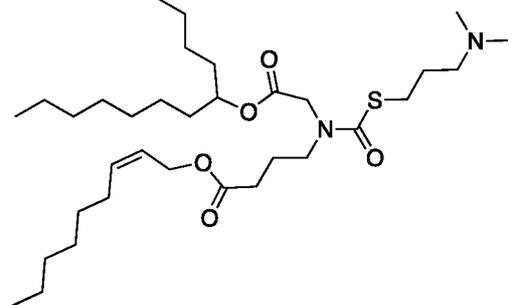
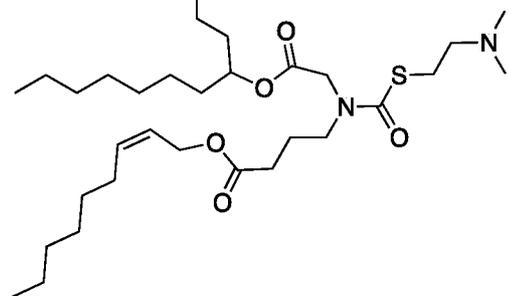
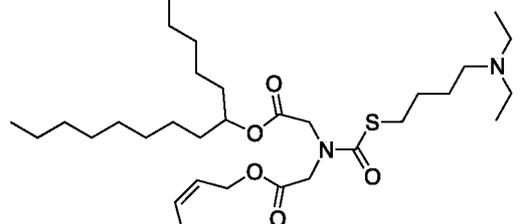
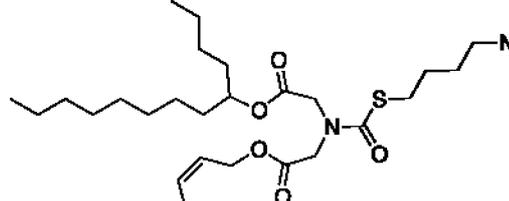
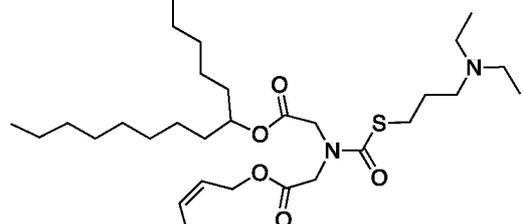
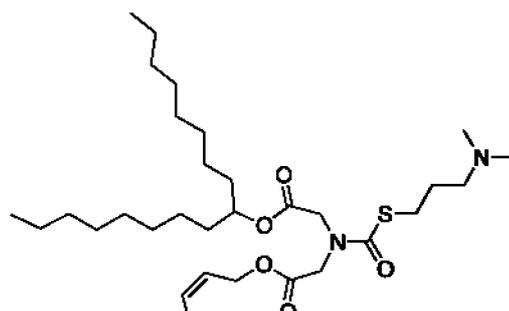
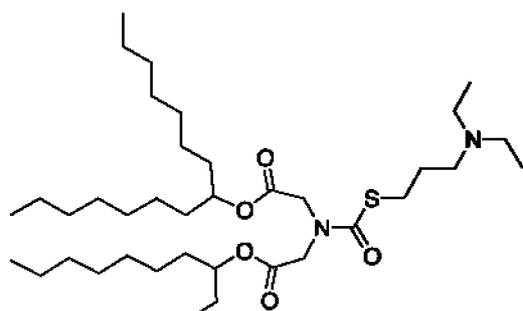


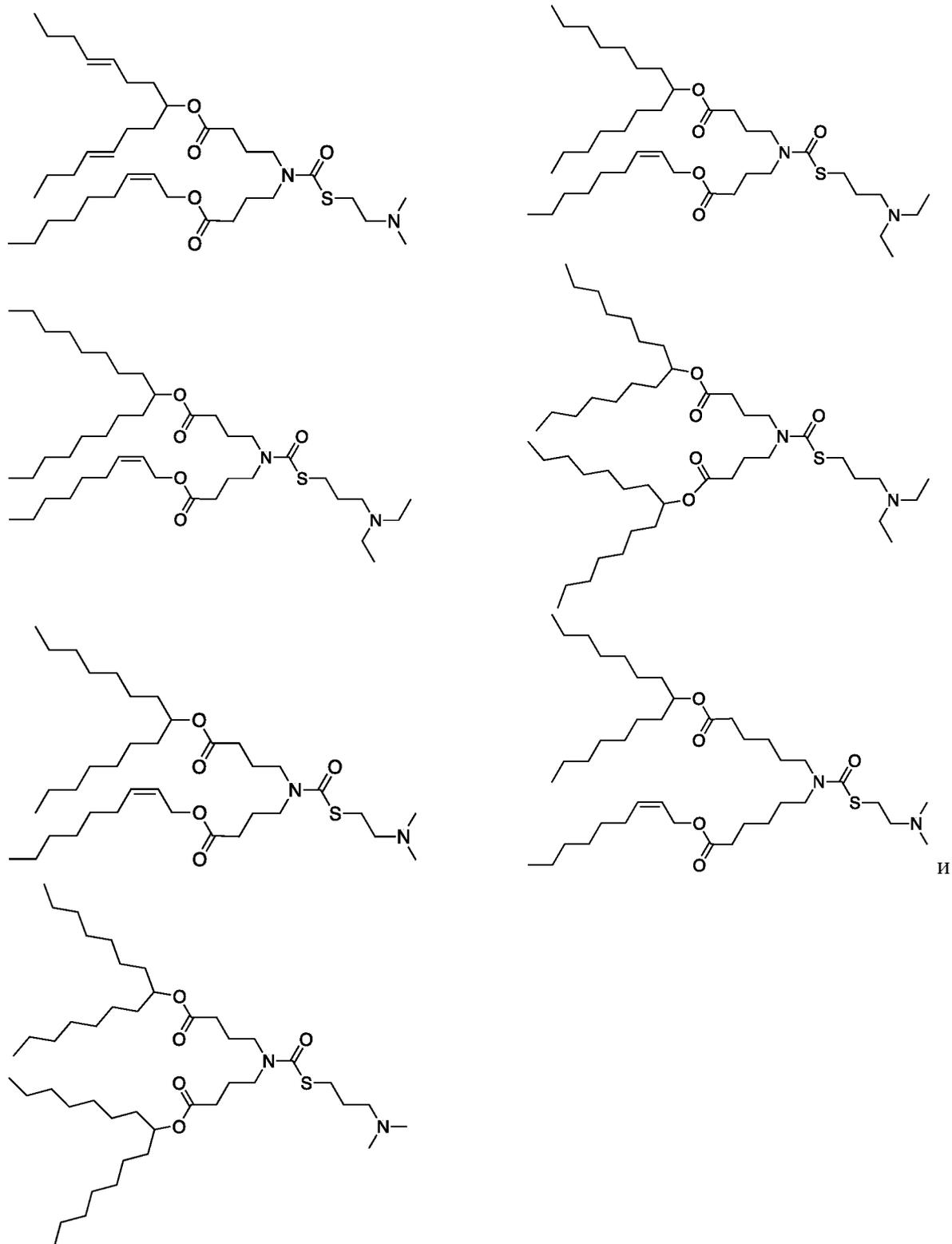












[300] В некоторых вариантах осуществления возможно прямое исключение любых одного или нескольких упомянутых авторами липидов.

Хелперные липиды и стерины

[301]Композиции РНК-репликон – липид согласно раскрытию настоящего изобретения в возможных вариантах включают хелперный липид, который называют нейтральным липидом, нейтральным хелперным липидом, некаатионным липидом, некаатионным хелперным липидом, анионным липидом, анионным хелперным липидом или цвиттер-ионным липидом. Было обнаружено, что липидные композиции, в частности, катионные липосомы и липидные наночастицы имеют повышенное клеточное поглощение, если в композиции присутствуют хелперные липиды. (Curr. Drug Metab. 2014; 15(9): 882 - 92).
 5 Например, некоторые исследования показали, что нейтральные и цвиттер-ионные липиды, такие как 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DOPC), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), будучи более фузогенными (т. е., способствующими слиянию), чем катионные липиды, способны влиять на полиморфные особенности комплексов липидов – нуклеиновых кислот, что способствует переходу от ламеллярной к гексагональной фазе и, таким образом, вызывает слияние и разрыв клеточной мембраны (Nanomedicine (Lond). 2014 Jan; 9(1): 105 - 20). Кроме того, применение хелперных липидов помогает снизить любые возможные неблагоприятные эффекты от применения многих распространенных катионных липидов, такие как токсичность и иммуногенность.
 10
 15
 20

[302]Неограничивающими примерами некаатионных липидов, подходящих для липидных композиций согласно раскрытию настоящего изобретения, являются фосфолипиды, такие как лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилмнозит, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидная кислота, цереброзиды, дицетилфосфат, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоил-фосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоил-фосфатидилэтаноламин (POPE), пальмитоилолеоил-фосфатидилглицерин (POPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоил-фосфатидилэтаноламин (DMPE), дистеароил-

25
 30

фосфатидилэтаноламин (DSPE), монометил-фосфатидилэтаноламин, диметил-фосфатидилэтаноламин, диэлаидоил-фосфатидилэтаноламин (DEPE), стеароилолеоил-фосфатидилэтаноламин (SOPE), лизофосфатидилхолин, дилинолеоилфосфатидилхолин и их смеси. Также возможно применение других

5 диацилфосфатидилхолин- и диацилфосфатидилэтаноламинфосфолипидов. Ацильные группы в этих липидах предпочтительно являются ацильными группами, происходящими из жирных кислот, которые имеют C₁₀-C₂₄ углеродные цепи, например, лауроил, миристоил, пальмитоил, стеароил или олеоил.

10 [303]Дополнительными примерами некатионных липидов являются стеринны, такие как холестерин и его производные. Одно исследование позволило прийти к выводу о том, что в качестве хелперного липида холестерин увеличивает интервал между зарядами липидного слоя, контактирующего с нуклеиновой кислотой, что делает распределение зарядов ближе

15 соответствующим наблюдаемому у нуклеиновой кислоты. (J. R. Soc. Interface. 2012 Mar 7; 9(68): 548 - 561). Неограничивающими примерами производных холестерина являются полярные аналоги, такие как 5 α -холестанол, 5 α -копростанол, холестерил-(2'-гидрокси)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как

20 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 α -холестанон и холестерилдеканоат; и их смеси. В предпочтительных вариантах осуществления производная холестерина является полярным аналогом, таким как холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир.

[304]В некоторых вариантах осуществления хелперный липид, присутствующий в липидной композиции, включает или состоит из смеси

25 одного или нескольких фосфолипидов и холестерина или его производного. В других вариантах осуществления хелперный липид, присутствующий в липидной композиции, включает или состоит из одного или нескольких фосфолипидов, например, бесхолестериновой липидной композиции. В других

30 вариантах осуществления хелперный липид, присутствующий в липидной композиции, включает или состоит из холестерина или его производного, например, не содержащей фосфолипида липидной композиции.

[305]Другими примерами хелперных липидов являются не содержащие фосфора липиды, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин,

ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, изопропилмиристат, амфотерные акриловые полимеры, триэтаноламин-лаурилсульфат, амиды алкиларилсульфатполиэтилоксилированных жирных кислот, диоктадецилдиметиламмонийбромид, церамид и сфингомиелин.

5 **[306]**В некоторых вариантах осуществления хелперный липид включает от приблизительно 30 мол. % до приблизительно 60 мол. %, от приблизительно 32 мол. % до приблизительно 58 мол. %, от приблизительно 34 мол. % до приблизительно 56 мол. %, приблизительно 35 мол. % до приблизительно 54 мол. %, от приблизительно 36 мол. % до приблизительно 52 мол. %, от
10 приблизительно 37 мол. % до приблизительно 51 мол. %, от приблизительно 38 мол. % до приблизительно 50 мол. %, или приблизительно 39 мол. %, приблизительно 50 мол. %, приблизительно 41 мол. %, приблизительно 42 мол. %, приблизительно 43 мол. %, приблизительно 44 мол. %, приблизительно 45 мол. %, приблизительно 46 мол. %, приблизительно 47 мол. %, приблизительно
15 48 мол. %, или приблизительно 49 мол. % (или любое дробное значение или диапазон в этих пределах) от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции.

[307]В некоторых вариантах осуществления общий хелперный липид в композиции включает два или более хелперных липидов, и общее количество
20 хелперного липида включает от приблизительно 30 мол. % до приблизительно 60 мол. %, от приблизительно 32 мол. % до приблизительно 58 мол. %, от приблизительно 34 мол. % до приблизительно 56 мол. %, приблизительно 35 мол. % до приблизительно 54 мол. %, от приблизительно 36 мол. % до приблизительно 52 мол. %, от приблизительно 37 мол. % до приблизительно 51
25 мол. %, от приблизительно 38 мол. % до приблизительно 50 мол. %, или приблизительно 39 мол. %, приблизительно 50 мол. %, приблизительно 41 мол. %, приблизительно 42 мол. %, приблизительно 43 мол. %, приблизительно 44 мол. %, приблизительно 45 мол. %, приблизительно 46 мол. %, приблизительно 47 мол. %, приблизительно 48 мол. %, или приблизительно 49 мол. % (или любое
30 дробное значение или диапазон в этих пределах) от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции. В некоторых вариантах осуществления хелперные липиды представляют собой комбинацию DSPC и DOTAP. В некоторых вариантах осуществления хелперные липиды представляют собой комбинацию DSPC и DOTMA.

[308] Холестерин или производное холестерина в липидной композиции составляют до приблизительно 50 мол. %, приблизительно 35 мол. %, приблизительно 40 мол. %, приблизительно 45 мол. % или приблизительно 50 мол. % от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции.

5 В некоторых вариантах осуществления холестерин или производное холестерина включает от приблизительно 15 мол. % до приблизительно 45 мол. %, приблизительно 20 мол. % до приблизительно 45 мол. %, приблизительно 30 мол. % до приблизительно 45 мол. %, или приблизительно 35 мол. %, приблизительно 36 мол. %, приблизительно 37 мол. %, приблизительно 38 мол. 10 %, приблизительно 39 мол. %, приблизительно 40 мол. %, приблизительно 41 мол. %, приблизительно 42 мол. %, приблизительно 43 мол. %, приблизительно 44 мол. % или приблизительно 45 мол. % от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции.

[309] Процент хелперного липида, присутствующего в липидной 15 композиции, является целевым количеством, и фактическое количество хелперного липида, присутствующего в композиции колеблется, например, в пределах ± 5 мол. %.

[310] В возможных вариантах липидная композиция, содержащая катионное липидное соединение или ионизируемое катионное липидное соединение, 20 включает в молярном выражении приблизительно 30 - 60 % катионного липидного соединения, приблизительно 35 - 50 % холестерина, приблизительно 5 - 20 % хелперного липида и приблизительно 0,5 - 5 % полиэтиленгликоля (ПЭГ) – липида, причем процент указан от общего количества липида, присутствующего в композиции. В некоторых вариантах осуществления состав 25 композиции включает приблизительно 40 - 50 % катионного липидного соединения, приблизительно 35 - 45 % холестерина, приблизительно 5 - 15 % хелперного липида и приблизительно 0,5 - 3 % ПЭГ-липидов, причем процент указан от общего количества липида, присутствующего в композиции.

Липидные конъюгаты

30 [311] Описываемые авторами липидные композиции в возможных вариантах также включают липидный конъюгат. Конъюгированный липид применяют для предотвращения агрегации частиц. К подходящим конъюгированным липидам относятся, помимо прочих, конъюгаты ПЭГ-липидов, конъюгаты катионных полимеров – липидов и их смеси. Кроме того, носители для доставки липида

применяют для специфического нацеливания путем прикрепления лигандов (например, антител, пептидов и углеводов) к его поверхности или к концевой области прикрепляемых цепей ПЭГ (Front. Pharmacol. 2015 Dec 1; 6: 286).

[312] В предпочтительном варианте осуществления липидным конъюгатом является ПЭГ-липид. Технология включения полиэтиленгликоля (ПЭГ) в липидную композицию в качестве покрытия или поверхностного лиганда, называемая пегилированием, способствует защите наночастиц от иммунной системы и их помогает избежать поглощения RES (Nanomedicine (Lond). 2011 Jun; 6(4): 715 - 28). Пегилирование широко применяют для стабилизации липидных композиций и их полезных нагрузок через физические, химические и биологические механизмы. Детергентоподобные ПЭГ-липиды (например, ПЭГ-DSPE) способны проникать в липидную композицию для образования гидратированного слоя и стерического барьера на поверхности. В зависимости от степени пегилирования поверхностные слои разделяют на два общих типа: кисточковидные и грибовидные слои. Для ПЭГ-DSPE-стабилизированных композиций ПЭГ приобретает грибовидную конформацию при низкой степени пегилирования (как правило, менее 5 мол. %) и переходит к кисточковидной конформации, когда содержание ПЭГ-DSPE превышает определенный уровень (J. Nanomaterials. 2011; 2011: 12). Было продемонстрировано, что повышенное пегилирование ведет к значительному увеличению периода системного полувыведения липидных композиций (Annu. Rev. Biomed. Eng. 2011 Aug 15; 13: 507 - 30; J. Control Release. 2010 Aug 3; 145(3): 178 - 81).

[313] Подходящими примерами ПЭГ-липидов являются, помимо прочих, ПЭГ, соединенный с диалкилоксипропилами (ПЭГ-ДАА), ПЭГ, соединенный с диацилглицерином (ПЭГ-ДАГ), ПЭГ, соединенный с фосфолипидами, например, фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-РЕ), ПЭГ, конъюгированный с церамидами, ПЭГ, конъюгированный с холестерином или его производным, и их смеси.

[314] ПЭГ представляет собой линейный водорастворимый полимер из повторяющихся звеньев этилена ПЭГ с двумя концевыми гидроксильными группами. ПЭГ классифицируют по их молекулярной массе, включая следующие:

монометоксиполиэтиленгликоль	(MePEG-OH),
монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинат	(MePEG-S),
монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинимидил-сукцинат	(MePEG-S-NHS),
монометоксиполиэтиленгликоль-амин	(MePEG-NH ₂),

монометоксиполиэтиленгликоль-трезилат (MePEG-TRES),
 монометоксиполиэтиленгликоль-имидазол-карбонил (MePEG-IM), а также
 такие соединения, содержащие концевую гидроксильную группу вместо
 концевой метоксигруппы (например, HO-ПЭГ-S, HO-ПЭГ-S-NHS, HO-ПЭГ-
 5 NH₂).

[315] Компонент ПЭГ в описываемых авторами конъюгатах ПЭГ-липидов
 имеет среднюю молекулярную массу от приблизительно 550 Дальтон до
 приблизительно 10 000 Дальтон. В некоторых случаях компонент ПЭГ имеет
 среднюю молекулярную массу от приблизительно 750 Дальтон до
 10 приблизительно 5 000 Дальтон (например, от приблизительно 1 000 Дальтон до
 приблизительно 5 000 Дальтон, от приблизительно 1 500 Дальтон до
 приблизительно 3 000 Дальтон, от приблизительно 750 Дальтон до
 приблизительно 3 000 Дальтон, от приблизительно 750 Дальтон до
 приблизительно 2 000 Дальтон). В предпочтительных вариантах осуществления
 15 компонент ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу приблизительно 2 000
 Дальтон или приблизительно 750 Дальтон. Средняя молекулярная масса может
 быть любым значением или подзначением в пределах упомянутых диапазонов,
 включая предельные значения.

[316] В некоторых случаях ПЭГ мономеры необязательно замещены
 20 алкильной, алкокси, ацильной или арильной группой. ПЭГ бывает
 конъюгированным непосредственно с липидом или связанным с липидом через
 линкерный компонент. Возможно применение любого линкерного компонента,
 подходящего для соединения ПЭГ с липидом, включая, например, не
 содержащие сложных эфиров линкерные компоненты и содержащие сложные
 25 эфиры линкерные компоненты. В предпочтительном варианте осуществления
 линкерный компонент является не содержащим сложных эфиров линкерным
 компонентом. Подходящими не содержащими сложных эфиров линкерными
 компонентами являются, помимо прочих, амидо (-C(O)NH-), amino (-NR-),
 карбонил (-C(O)-), карбамат (-NHС(O)O-), мочевины (-NHС(O)NH-), дисульфид
 30 (-S-S-), эфир (-O-), сукцинил (-O)CCH₂CH₂C(O)-, сукцинамидил (-
 NHС(O)CH₂CH₂C(O)NH-), эфир, а также их комбинации (такие как линкер,
 содержащий как карбаматный линкерный компонент, так и амидный линкерный
 компонент). В предпочтительном варианте осуществления для соединения ПЭГ с
 липидом применяют карбаматный линкер.

[317] В других вариантах осуществления для соединения ПЭГ с липидом применяют содержащий сложные эфиры линкерный компонент. Подходящими содержащими сложные эфиры линкерными компонентами являются, например, карбонат (-OC(O)O-), сукциноил, фосфатные сложные эфиры (-O-(O)POH-O-), сульфонатные сложные эфиры и их комбинации.

[318] В возможных вариантах фосфатидилэтаноламины, имеющие различные группы ацильных цепей разной длины цепи и степени насыщения конъюгируют с ПЭГ для образования липидного конъюгата. Такие фосфатидилэтаноламины получают из коммерческих источников или выделяют или синтезируют с применением традиционных технологий, известных специалистам в данной области техники. Предпочтение отдают фосфатидилэтаноламинам, содержащим насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи в диапазоне от C₁₀ до C₂₀. Также применяют фосфатидилэтаноламины с моно- или диненасыщенными жирными кислотами и смесями насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Подходящими фосфатидилэтаноламинами являются, помимо прочих, димиристоил-фосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин (DPPE), диолеоил-фосфатидилэтаноламин (DOPE) и дистеароил-фосфатидилэтаноламин (DSPE).

[319] В некоторых вариантах осуществления конъюгат ПЭГ-ДАА представляет собой конъюгат ПЭГ-дидецилоксипропила (C₁₀), конъюгат ПЭГ-дилаурилоксипропила (C₁₂), конъюгат ПЭГ-димиристилоксипропила (C₁₄), конъюгат ПЭГ-дипальмитилоксипропила (C₁₆), или конъюгат ПЭГ-дистеарилоксипропила (C₁₈). В этих варианты осуществления ПЭГ предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу от приблизительно 750 до приблизительно 2,000 Дальтон. В конкретных вариантах осуществления концевую гидроксильную группу ПЭГ замещают метильной группой.

[320] В добавление к вышесказанному, существует возможность использования других гидрофильных полимеров вместо ПЭГ. Примерами подходящих для использования вместо ПЭГ полимеров являются, помимо прочих, поливинилпирролидон, полиметилоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропил, метакриламид, полиметакриламид и полидиметилакриламид, полимолочная кислота, полигликолевая кислота и

дериватизированные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза или гидроксиэтилцеллюлоза.

[321] В некоторых вариантах осуществления липидный конъюгат (например, ПЭГ-липид) включает от приблизительно 0,1 мол. % до приблизительно 2 мол. %, от приблизительно 0,5 мол. % до приблизительно 2 мол. %, от приблизительно 1 мол. % до приблизительно 2 мол. %, от приблизительно 0,6 мол. % до приблизительно 1,9 мол. %, от приблизительно 0,7 мол. % до приблизительно 1,8 мол. %, от приблизительно 0,8 мол. % до приблизительно 1,7 мол. %, от приблизительно 0,9 мол. % до приблизительно 1,6 мол. %, от приблизительно 0,9 мол. % до приблизительно 1,8 мол. %, от приблизительно 1 мол. % до приблизительно 1,8 мол. %, от приблизительно 1 мол. % до приблизительно 1,7 мол. %, от приблизительно 1,2 мол. % до приблизительно 1,8 мол. %, от приблизительно 1,2 мол. % до приблизительно 1,7 мол. %, от приблизительно 1,3 мол. % до приблизительно 1,6 мол. %, или от приблизительно 1,4 мол. % до приблизительно 1,6 мол. % (или любое дробное значение или диапазон в этих пределах) от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции. В других вариантах осуществления липидный конъюгат (например, ПЭГ-липид) включает приблизительно 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 % или 5 %, (или любое дробное значение или диапазон в этих пределах) от общего количества липида, присутствующего в липидной композиции. Количество может быть любым значением или подзначением в пределах упомянутых диапазонов, включая предельные значения.

[322] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой PEG550-PE. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой PEG750-PE. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой PEG2000-DMG. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид (также известный как ALC-0159).

[323] Процент липидного конъюгата (например, ПЭГ-липида), присутствующего в липидных композициях согласно раскрытию изобретения, является целевым количеством, и фактическое количество липидного конъюгата, присутствующего в композиции, колеблется, например, в пределах $\pm 0,5$ мол. %.

Специалисту в данной области техники станет понятно, что концентрация липидного конъюгата колеблется в зависимости от применяемого липидного конъюгата и скорости, с которой липидная композиция становится фузогенной.

Механизм действия клеточного поглощения липидных композиций

5 [324] Липидные композиции для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот, в частности, липосом, катионных липосом и липидных наночастиц, предназначены для клеточного поглощения путем проникновения в клетки-мишени через использование внутриклеточных механизмов клеток-мишеней, при которых содержимое носителя для доставки липида доставляется в цитозоль

10 клетки-мишени. (Nucleic Acid Therapeutics, 28(3): 146 - 157, 2018). Так, в случае композиции РНК-реплика-липид, нацеленной на гепатоциты, как описано авторами, мРНК-липидная композиция проникает в гепатоциты через опосредованный рецепторами эндоцитоз. Перед эндоцитозом функционализированные лиганды, такие как ПЭГ-липид на поверхности носителя

15 для доставки липида, опадают с поверхности, таким образом, запуская интернализацию в клетку-мишень. Во время эндоцитоза определенная часть плазменной мембраны клетки окружает вектор и поглощает его в везикулу, которая затем отщипывается от клеточной мембраны, проникает в цитозоль и в конечном счете проходит эндолизосомальный путь. Для содержащих

20 ионизируемые катионные липиды носителей для доставки результатом повышения кислотности со старением эндосомы является носитель с сильным положительным зарядом на поверхности. Затем в результате взаимодействия между носителем для доставки и эндосомальной мембраной происходит мембранное слияние, ведущее к цитозольной доставке полезной нагрузки. Для

25 полезных нагрузок РНК собственные внутренние трансляционные процессы клетки затем транслируют РНК-реплика или комбинацию молекул нуклеиновых кислот в кодированный белок (например, антиген ВГВ). Кодированный белок затем подвергается посттрансляционной обработке, включая транспорт в заданную органеллу или место в пределах клетки.

30 [325] Контролирование состава и концентрации липидного конъюгата позволяет контролировать скорость, с которой липидный конъюгат путем обмена выводится из липидной композиции и, в свою очередь, скорость, с которой липидная композиция становится фузогенной. Кроме того, для регулирования и/или контроля скорости, с которой липидная композиция

становится фузогенной возможно использование и других переменных, включая, например, уровень рН, температуру или ионную силу. Другие способы, применяемые для контроля скорости, с которой липидная композиция становится фузогенной, станут очевидны специалистам в данной области техники по ознакомлении с раскрытием изобретения. Кроме того, контролирование состава и концентрации липидного конъюгата позволяет контролировать размер липосомальных или липидных частиц.

Производство липидной композиции

[326] Существует множество различных способов приготовления липидных композиций, включающих нуклеиновую кислоту, например, РНК-репликон или комбинацию молекул нуклеиновых кислот. (Curr. Drug Metabol. 2014, 15, 882 - 892; Chem. Phys. Lipids 2014, 177, 8 - 18; Int. J. Pharm. Stud. Res. 2012, 3, 14 - 20). Технологии тонкопленочной гидратации, двойной эмульсии, обращенно-фазового выпаривания, микрофлюидных препаратов, двойного асимметричного центрифугирования, инъекции этанола, диализа детергента, спонтанного образования везикул путем разведения этанолом и инкапсуляции в предварительно образованные липосомы вкратце описываются авторами.

Тонкопленочная гидратация

[327] При выполнении тонкопленочной гидратации (TFH) или способа Бенгхна липиды растворяют в органическом растворителе, затем выпаривают путем применения роторного испарителя, что ведет к образованию тонкого липидного слоя. После гидратации слоя путем добавления водного буферного раствора, содержащего загружаемое соединение, образуются мультиламеллярные везикулы (MLV), которые поддаются уменьшению размера для образования малых и больших моноламеллярных везикул (LUV и SUV) путем экструзии сквозь мембраны или ультразвуковой обработки исходных MLV.

Двойная эмульсия

[328] Липидные композиции также приготавливают с применением технологии двойной эмульсии, которая включает растворение липидов в смеси воды / органического растворителя. Органический раствор, содержащий капельки воды, смешивают с избыточным количеством водной среды, что ведет к образованию двойной эмульсии вода-в-масле-в-воде (W/O/W). После

интенсивного механического взбалтывания часть капелек воды разрушается, образуя большие моноламеллярные везикулы (LUV).

Обращенно-фазовое выпаривание

[329] Способ обращенно-фазового выпаривания (REV) также позволяет достигать LUV, нагруженных нуклеиновой кислотой. Согласно этой технологии, 5 двухфазную систему образуют путем растворения фосфолипидов в органических растворителях и водном буфере. Образовавшуюся в результате суспензию затем подвергают кратковременной ультразвуковой обработке, пока смесь не станет прозрачной однофазной дисперсией. Липидную композицию получают после 10 выпаривания органического растворителя под сниженным давлением. Эту технологию применяют для инкапсуляции различных больших и малых гидрофильных молекул, включая нуклеиновые кислоты.

Микрофлюидные препараты

[330] Микрофлюидный способ, в отличие от других массовых технологий, 15 обеспечивает возможность контролирования процесса гидратации липида. Способ классифицируют как проточный микрофлюидный и капельный микрофлюидный, в соответствии со способом управления потоком. Согласно способу микрофлюидной гидродинамической фокусировки (MHF), функционирующему в режиме непрерывного потока, липиды растворяют в 20 изопропиловом спирте, который гидродинамически фокусируют в пересечение микроканалов между двумя потоками буфера. Размер везикул контролируют путем модулирования скорости потока, таким образом, контролируя процесс растворения липидов / разведения буфером. Способ применяют для получения олигонуклеотидных (ON) липидных композиций путем применения 25 микрофлюидного устройства, состоящего из трех входных и одного выходного порта.

Двойное асимметричное центрифугирование

[331] Двойного асимметричного центрифугирования (DAC) отличается от более распространенного центрифугирования тем, что в нем применяют 30 дополнительное вращение вокруг собственной вертикальной оси. Эффективной гомогенизации достигают благодаря наложению двух генерируемых движений: образец выталкивается наружу, как в нормальной центрифуге, а затем стремится к центру флакона под действием дополнительного вращения. Путем смешивания липидов и раствора NaCl получают вязкий фосфолипидный гель (VPC), который

затем разводят для получения дисперсии липидной композиции. Размер липидной композиции регулируют путем оптимизации скорости ДАС, концентрации липида и времени гомогенизации.

Инъекции этанола

5 [332] Способ инъекций этанола (EI) применяют для инкапсуляции нуклеиновой кислоты. Этот способ предусматривает быстрое впрыскивание этанольного раствора, в котором растворены липиды, в водную среду, содержащую нуклеиновые кислоты, подлежащие инкапсуляции, путем применения иглы. Везикулы спонтанно образуются при диспергировании
10 фосфолипидов по среде.

Диализ детергента

[333] Способ диализа детергента применяют для инкапсуляции нуклеиновых кислот. В общих чертах, липид и плазмиду солюбилизируют в растворе детергента соответствующей ионной силы, и после удаления
15 детергента путем диализа образуется стабилизированная липидная композиция. Затем неинкапсулированную нуклеиновую кислоту удаляют путем ионообменной хроматографии, а пустые везикулы – путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Эта технология очень чувствительна к содержанию катионного липида и к концентрации солей в диализном буфере, и
20 способ также трудно поддается масштабированию.

Спонтанное образование везикул путем разведения этанолом

[334] Стабильные липидные композиции также образуют, применяя способ спонтанного образования везикул путем разведения этанолом, согласно
25 которому пошаговое или капельное разведение этанолом обеспечивает мгновенное образование везикул, нагруженных нуклеиновой кислотой, путем контролируемого добавления липида, растворенного в этаноле, к быстро перемешиваемому водному буферу, содержащему нуклеиновую кислоту.

Инкапсуляция в предварительно образованные липосомы

[335] Захват нуклеиновых кислот также обеспечивают на основе исходных
30 предварительно образованных липосом двумя разными способами: (1) простым смешиванием катионных липосом с нуклеиновыми кислотами результате чего получают электростатические комплексы, называемые “липоплексами”, которые успешно используют для трансфекции культур клеток, однако они характеризуются низкой эффективностью инкапсуляции и низкими

показателями *in vivo*; и (2) путем липосомальной дестабилизации с медленным добавлением абсолютного этанола к суспензии катионных везикул до концентрации 40 % (объем/объем) с последующим капельным добавлением нуклеиновых кислот с получением нагруженных везикул; однако два главных
5 этапа, характеризующие процесс инкапсуляции, являются слишком чувствительными, и частицы требуют уменьшения размеров.

[336]В определенных вариантах осуществления примеры липидов и
липидных наночастиц, фармацевтических композиций, включающих липиды,
способов получения липидов или рецептирования фармацевтических
10 композиций, включающих липиды и молекулы нуклеиновых кислот, и способы
применения фармацевтических композиций для лечения или профилактики
заболеваний описаны в публикациях Патентных заявок США или
Международных патентных заявок, таких как US2017/0190661, US2006/0008910,
US2015/0064242, US2005/0064595, WO2019/036030, US2019/0022247,
15 WO2019/036028, WO2019/036008, WO2019/036000, US2016/0376224,
US2017/0119904, WO2018/200943, WO2018/191657, WO2018/118102,
US2018/0169268, WO2018/118102, WO2018/119163, US2014/0255472, и
US2013/0195968, соответствующее содержание каждой из которых включено в
данный документ путем ссылки в полном объеме.

20 Способы примирующей / бустерной иммунизации

[337]Варианты осуществления заявленного изобретения также
предусматривают введение иммуногенно эффективного количества
фармацевтической композиции или иммуногенной комбинации субъекту и
последующее введение еще одной дозы иммуногенно эффективного количества
25 фармацевтической композиции или иммуногенной комбинации тому же
субъекту в так называемом режиме "прайм-буст". Таким образом, в одном
варианте осуществления фармацевтическая композиция или иммуногенная
комбинация согласно заявке является праймерной вакциной, применяемой для
примирования иммунного ответа. В другом варианте осуществления
30 фармацевтическая композиция или иммуногенная комбинация согласно заявке
является бустерной вакциной, применяемой для усиления иммунного ответа.
Примирующие и бустерные вакцины согласно заявке применяют в соответствии
с описываемыми авторами способами согласно заявке. Эта общая концепция
режима "прайм-буст" хорошо известна специалистам в области вакцинирования.

Возможно применение любых описываемых авторами фармацевтических композиций и иммуногенных комбинаций согласно заявке в качестве примирующих и/или бустерных вакцин для примирования и/или усиления иммунного ответа против ВГВ. Предпочтительно способы вакцинирования субъекта включают введение субъекту фармацевтической композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, комбинацию нуклеиновых кислот, вектор или РНК-репликон согласно заявке, и введение субъекту второй композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один идентичный антиген ВГВ, в режиме "прайм-буст".

5 [338] В некоторых вариантах осуществления заявленного изобретения фармацевтическую композицию или иммуногенная комбинация согласно заявке вводят для примирующей иммунизации. Фармацевтическую композицию или иммуногенную комбинацию повторно вводят для бустерной иммунизации. Режим предусматривает возможность дополнительных бустерных введений фармацевтической композиции или вакцинной комбинации, по мере необходимости. Возможно присутствие адъюванта в фармацевтической композиции согласно заявке, которую применяют для бустерной иммунизации, присутствие в отдельной композиции, предназначенной для введения вместе с фармацевтической композицией или иммуногенной комбинацией согласно заявке для бустерной иммунизации, или его отдельное введение в качестве бустерной иммунизации. В этих вариантах осуществления, в которых режим включает применение адъюванта, адъювант предпочтительно применяют для бустерной иммунизации.

15 [339] Пояснительный и неограничивающий пример режима "прайм-буст" включает введение одной дозы иммуногенно эффективного количества фармацевтической композиции или иммуногенной комбинации согласно заявке субъекту для примирования иммунного ответа; и последующее введение еще одной дозы иммуногенно эффективного количества фармацевтической композиции или иммуногенной комбинации согласно заявке для усиления иммунного ответа, причем первую бустерную иммунизацию осуществляют через период приблизительно от двух до шести недель, предпочтительно через четыре недели после первоначальной примирующей иммунизации. Необязательно приблизительно через 10 - 14 недель, предпочтительно 12 недель, после первоначальной примирующей иммунизации осуществляют последующую

бустерную иммунизацию с введением фармацевтической композиции или иммуногенной комбинации или другого адъюванта.

[340] Антигены в примирующей и бустерной композициях не обязательно должны быть идентичными, но композиции должны иметь общие антигены или
5 быть в значительной мере подобными между собой. В определенных вариантах осуществления вектор бустерной композиции отличается от примирующей композиции, например, вектор аденовируса, вектор модифицированной вакцины Анкара (МВА), ДНК или белок. Примирующая и бустерная композиции согласно изобретению включают одну, две, три или более доз.

10 Варианты осуществления

[341] Вариант осуществления 1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию, которая включает не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-
конца:

15 (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и

20 полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ, причем по меньшей мере один из первого и второго антигенов ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ.

[342] Вариант осуществления 1a включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 1, причем первый и второй
25 антигены ВГВ независимо выбраны из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ.

[343] Вариант осуществления 1b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 1 или 1a, причем по меньшей мере один из первого и второго антигенов ВГВ является антигеном Pre-S1 ВГВ
30 или антигеном PreS2.S ВГВ.

[344] Вариант осуществления 2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1-1b, причем один из первого или второго антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ или Pol-антигеном ВГВ.

[345] Вариант осуществления 3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1-2, причем не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5' - до 3'-конца:

5 (1) второй элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей второй антиген ВГВ, и

10 (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген ВГВ.

[346] Вариант осуществления 3а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 3, причем третий антиген ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ.

15 **[347]** Вариант осуществления 4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 3 или 3а, причем не встречающаяся в природе полинуклеотидная последовательность также включает, в порядке от 5' - до 3'-конца:

20 (1) третий элемент IRES или полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий пептид аутопротеазы, функционально связанный с 3' концом полинуклеотидной последовательности, кодирующей третий антиген ВГВ, и

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ.

25 **[348]** Вариант осуществления 4а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 4, причем третий антиген ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ.

30 **[349]** Вариант осуществления 4b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 1-2, которая включает первую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5' - до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и

5 (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ, и

вторую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген вируса гепатита В (ВГВ),

10 (2) второй элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, и

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ,

15 причем первая и вторая не встречающиеся в природе полинуклеотидные последовательности связаны третьим элементом последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей третий пептид аутопротеазы, или присутствуют в отдельных молекулах нуклеиновых кислот, и

20 первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ, и по меньшей мере один из первого, второго, третьего и четвертого антигенов ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ, выбранным из антигена Pre-S1 ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98 % идентичную

25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и антигена PreS2.S ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, предпочтительно один из первого, второго, третьего или четвертого

30 антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ или pol-антигеном ВГВ.

[350] Вариант осуществления 5 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 1 - 4b, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является отличным от других.

[351] Вариант осуществления 6 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 5, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

5 (I) первый антиген PreS1 ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO: 1;

(II) второй антиген PreS1 ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6
15 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

(III) антиген PreS2 ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6
20 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(IV) коровый антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2
25 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7; и

(V) антиген ВГВ-полимеразы, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2
30 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9.

[352] Вариант осуществления ба включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления б, причем коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 86, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 86.

[353] Вариант осуществления бb включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления б, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

- (1) первый антиген Pre-S1 ВГВ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- (2) второй антиген Pre-S1 ВГВ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- (3) антиген PreS2.S ВГВ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (4) коровый антиген ВГВ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и
- (5) антиген ВГВ-полимеразы, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[354] Вариант осуществления бb1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления бb, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

- (1) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;
- (2) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;
- (3) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;
- (4) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86; и

(5) антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

5 [355] Вариант осуществления 6b2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6b, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(1) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

10 (2) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

(3) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(4) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84; и

15 (5) антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

20 [356] Вариант осуществления 6b3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6b, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(1) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(2) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

25 (3) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(4) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85; и

30 (5) антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[357] Вариант осуществления 6b4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6b, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(1) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(2) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

5 (3) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(4) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и

10 (5) антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[358] Вариант осуществления 6с включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления с 1 по 6b4, причем молекула нуклеиновой кислоты включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один из антигенов, к
15 которым относятся первый антиген Pre-S1 ВГВ, второй антиген Pre-S1 ВГВ и антиген PreS2.S ВГВ, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы.

[359] Вариант осуществления 6с1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1-6с, причем
20 каждый из антигенов, к которым относятся первый и второй антигены Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и pol-антиген ВГВ, независимо является функционально связанным с сигнальным пептидом, и антиген PreS2.S ВГВ включает внутренний сигнальный пептид.

[360] Вариант осуществления 6с2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6с1, причем сигнальный пептид является сигнальным пептидом цистатина S, сигнальным пептидом тяжелой цепи гамма-иммуноглобулина SPIgG, сигнальным пептидом тяжелой цепи эpsilon-иммуноглобулина SPIgE или короткой лидерной пептидной последовательностью коронавируса.

30 [361] Вариант осуществления 6с3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6с2, причем сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 и функционально связан с N-концом антигенов Pre-S1 ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ.

[362] Вариант осуществления 6d включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления с 1 по 6c3, причем молекула нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере один элемент IRES.

5 **[363]** Вариант осуществления 6d1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6d, причем элемент IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13.

10 **[364]** Вариант осуществления 6d2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6d1, причем элемент IRES состоит из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13.

[365] Вариант осуществления 6d3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6d, причем элемент IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

15 **[366]** Вариант осуществления 6d4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6d3, причем элемент IRES состоит из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14.

20 **[367]** Вариант осуществления 6e включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления с 1 по 6d4, причем молекула нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую пептид аутопротеазы.

[368] Вариант осуществления 6e1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6e, причем пептид аутопротеазы включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

25 **[369]** Вариант осуществления 6e2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6e1, причем пептид аутопротеазы состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

30 **[370]** Вариант осуществления 6e3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6e, причем пептид аутопротеазы кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей последовательность SEQ ID NO: 12.

[371] Вариант осуществления 6e4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 6e, причем пептид аутопротеазы кодируется полинуклеотидной последовательностью, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 12.

[372] Вариант осуществления 7 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 6с - 6е4, причем коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 84, 85 или 86.

[373] Вариант осуществления 7а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию варианта осуществления 7, причем коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86.

[374] Вариант осуществления 7b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию варианта осуществления 7а, причем коровый антиген ВГВ состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86.

[375] Вариант осуществления 8 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 7b, причем последние пять С-концевых аминокислот корового антигена ВГВ включают аминокислотную последовательность VVR, более конкретно – аминокислотную последовательность VVRR (SEQ ID NO: 91), более конкретно – аминокислотную последовательность VVRRR (SEQ ID NO: 92).

[376] Вариант осуществления 9 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 8, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает:

(I) консенсусную последовательность для двух или более, предпочтительно всех, генотипов ВГВ А, В, С и D; и/или

(II) один или несколько эпитопов для АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02, АЛЧ-А*02:01, АЛЧ-А*A2402, АЛЧ-А*A0101 или АЛЧ-В*40:01.

[377] Вариант осуществления 9а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает один или несколько

эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01 и эпитопы АЛЧ-А*А2402.

5 [378] Вариант осуществления 9a1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9 или 9a, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02 и эпитопы АЛЧ-А*02:01.

10 [379] Вариант осуществления 9a2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 9 - 9a1, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает один или несколько эпитопов для АЛЧ-А*11:01.

15 [380] Вариант осуществления 9a3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 9 - 9a2, причем каждый из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает один или несколько эпитопов для АЛЧ-А*11:01.

20 [381] Вариант осуществления 9a4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 9 - 9a3, причем каждый из preS1 ВГВ, preS2.S ВГВ, корового антигена ВГВ и антигена ВГВ-полимеразы включает один или несколько эпитопов для АЛЧ-А*11:01.

25 [382] Вариант осуществления 9b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 9 - 9a4, причем каждый из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает консенсусную последовательность для генотипов ВГВ А, В, С и D.

30 [383] Вариант осуществления 9c включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся антиген ВГВ-полимеразы, антиген Pre-S1 ВГВ и антиген PreS2.S ВГВ, включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*24:02.

[384] Вариант осуществления 9c1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9 или 9c, причем каждый

антиген ВГВ-полимеразы, антиген Pre-S1 ВГВ и антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*24:02.

5 [385] Вариант осуществления 9c2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 9 - 9c1, причем антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*24:02.

[386] Вариант осуществления 9d включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся антиген ВГВ-полимеразы и коровый антиген ВГВ, включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*02:01.

10 [387] Вариант осуществления 9d1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9d, причем каждый антиген ВГВ-полимеразы и коровый антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*02:01.

15 [388] Вариант осуществления 9e включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*А2402.

20 [389] Вариант осуществления 9f включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем по меньшей мере один из антигенов, к которым относятся антиген ВГВ-полимеразы и коровый антиген ВГВ, включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*А0101.

[390] Вариант осуществления 9f1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9f, причем каждый антиген ВГВ-полимеразы и коровый антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-А*А0101.

25 [391] Вариант осуществления 9g включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем коровый антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов АЛЧ-В*40:01.

30 [392] Вариант осуществления 9h включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем коровый антиген ВГВ включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*02:01, эпитопы АЛЧ-А*А0101 и эпитопы АЛЧ-В*40:01.

[393] Вариант осуществления 9i включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем антиген ВГВ-

полимеразы включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01 и эпитопы АЛЧ-А*А0101.

5 [394] Вариант осуществления 9j включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем антиген Pre-S1 ВГВ включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01 и эпитопы АЛЧ-А*24:02.

10 [395] Вариант осуществления 9к включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем антиген PreS2.S ВГВ включает один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02 и эпитопы АЛЧ-А*А2402.

15 [396] Вариант осуществления 9l включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 9, причем каждый из антигенов, к которым относятся поверхностный антиген ВГВ, коровый антиген ВГВ и антиген ВГВ-полимеразы, включает:

(I) консенсусную последовательность для генотипов ВГВ А, В, С и D; и

(II) один или несколько эпитопов для АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02, АЛЧ-А*02:01, АЛЧ-А*А0201, АЛЧ-А*А2402 и АЛЧ-А*А0101.

20 [397] Вариант осуществления 10 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 9l, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

25 (I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична
30 SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2

%, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 %
5 идентична SEQ ID NO: 6, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген
10 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 8; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-
15 полимеразы, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 %
20 идентична SEQ ID NO: 10,

предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая
каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и роl-
антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной
последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, и антиген PreS2.S ВГВ
25 включает внутренний сигнальный пептид.

[398] Вариант осуществления 10а включает молекулу нуклеиновой кислоты
или комбинацию согласно варианту осуществления 10, причем каждая из
полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и
четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой
30 относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген
Pre-S1 ВГВ, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген
Pre-S1 ВГВ, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 89; и

5 (V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10.

[399] Вариант осуществления 10b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 10, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и
10 четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген
15 Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 87; и

20 (V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

[400] Вариант осуществления 10c включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 10, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и
25 четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген
30 Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 88; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

5 [401] Вариант осуществления 10d включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 10, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

10 (II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6;

15 (IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 89; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

20 [402] Вариант осуществления 11 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 10, причем полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, включает, предпочтительно состоит из, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

30 [403] Вариант осуществления 11a включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 11, причем полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, включает, предпочтительно состоит из, одной из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

[404] Вариант осуществления 11b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 11 или 11a, причем

полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоит из SEQ ID NO: 89.

[405] Вариант осуществления 11с включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 10 - 11b, причем
5 полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из антигенов, к которым относятся первый и второй антигены Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и ро1-антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид цистатина S, сигнальный пептид тяжелой цепи гамма-иммуноглобулина SPIgG, сигнальный
10 пептид тяжелой цепи эpsilon-иммуноглобулина SPIgE или короткая лидерная пептидная последовательность коронавируса.

[406] Вариант осуществления 11d включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 11с, причем полинуклеотид, кодирующий сигнальный пептид, включает нуклеотидную последовательность
15 SEQ ID NO: 90.

[407] Вариант осуществления 12 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 11d, причем каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы независимо
20 включает пептидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A), вирус флашерии 2A (BmIFV2A) и их комбинация.

[408] Вариант осуществления 12а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 12, причем каждый из
25 первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A, такую как последовательность P2A SEQ ID NO: 11.

[409] Вариант осуществления 13 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 12а, причем
30 каждая из первой, второй и третьей IRES взята из вируса энцефаломиокардита (EMCV) или Энтеровируса 71 (EV71).

[410] Вариант осуществления 13а включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 13, причем каждая из

первой, второй и третьей IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

[411] Вариант осуществления 14 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 3а, которая
5 включает не встречающуюся в природе полинуклеотидная последовательность, имеющую, в порядке от 5' - до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную
10 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-
15 полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ,
20 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую
25 полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,
30 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий
5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(8) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную
10 последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9,
15 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

(9) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый
20 антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую
25 полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген
30 Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(10) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную

полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и

(24) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

[412] Вариант осуществления 14a1 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14, которая включает не встречающуюся в природе полинуклеотидная последовательность, имеющую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ,

состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86;

5 (5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из 10 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(6) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из 20 аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

30 (7) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из

(10) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(11) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(12) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86;

(13) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(14) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(15) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную

последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(16) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86;

(17) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86;

(18) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, IRES,

имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(19) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(20) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(21) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый

антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86;

(22) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(23) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; и

(24) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 7, 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

[413] Вариант осуществления 14a2 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14, которая

включает не встречающуюся в природе полинуклеотидная последовательность, имеющую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

- (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86,
5 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;
- 10 (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и
15 полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86;
- (3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную
20 последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;
- (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S
25 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ,
30 состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;
- (5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную

последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(8) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5,
5 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A
10 SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из
15 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86;

(9) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную
20 последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную
25 последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(10) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-
30 полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, IRES, имеющую

полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3;

(11) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(12) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86;

последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(19) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9,
5 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и
10 полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(20) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86,
15 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и
20 полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(21) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5,
25 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
30 86;

(22) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5,
35 полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную

последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

(23) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; и

(24) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

[414] Вариант осуществления 14a3 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14, 14a1 или 14a2, причем полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из антигенов, к которым относятся первый и второй антигены Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и pol-антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид.

[415] Вариант осуществления 14a4 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14a3, причем сигнальный пептид является сигнальным пептидом цистатина S, сигнальным

пептидом тяжелой цепи гамма-иммуноглобулина SPIgG, сигнальным пептидом тяжелой цепи эpsilon-иммуноглобулина SPIgE или короткой лидерной пептидной последовательностью коронавируса.

5 [416] Вариант осуществления 14a5 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14a4, причем сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

10 [417] Вариант осуществления 14a6 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14a5, причем полинуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 90.

15 [418] Вариант осуществления 14b включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления с 14 по 14a6, включающую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность согласно одному из вариантов осуществления с 14(3) по 14(24), с 14a1(5) по 14a1(24) или с 14a2(3) по 14a2(24).

20 [419] Вариант осуществления 14c включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14b, включающую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 21 по 54.

25 [420] Вариант осуществления 14d включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14b или 14c, в комбинации с одной из не встречающихся в природе полинуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, к которой относятся варианты осуществления 14(1), 14(2), 14a1(1), 14a1(2), 14a2(1) и 14a2(2).

[421] Вариант осуществления 14e включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14b или 14c, в комбинации с одной из не встречающихся в природе полинуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, к которой относятся SEQ ID NO: с 15 по 20.

30 [422] Вариант осуществления 15 включает молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно варианту осуществления 14, включающую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54.

[423] Вариант осуществления 16 включает вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15.

5 [424] Вариант осуществления 17 включает вектор согласно варианту осуществления 16, который является плазмидой ДНК.

[425] Вариант осуществления 18 включает вектор согласно варианту осуществления 16, который является вирусным вектором ДНК.

[426] Вариант осуществления 18a включает вектор согласно варианту осуществления 16, который является вирусным вектором РНК.

10 [427] Вариант осуществления 18b включает вектор согласно варианту осуществления 18a, который является РНК-репликоном.

[428] Вариант осуществления 18c включает вектор согласно варианту осуществления 16, который является вектором модифицированной вакцины Анкара (МВА) или вектором аденовируса.

15 [429] Вариант осуществления 18c1 включает вектор согласно варианту осуществления 18c, который является вектором МВА-BN.

[430] Вариант осуществления 18c2 включает вектор согласно варианту осуществления 18c, который является вектором Ad26 или Ad35.

20 [431] Вариант осуществления 19 включает РНК-репликон, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК;

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один, предпочтительно все, из неструктурных белков вируса РНК;

25 (3) субгеномный промотор вируса РНК;

(4) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинация согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15; и

(5) 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК.

30 [432] Вариант осуществления 20 включает РНК-репликон, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца,

(1) 5'-нетранслируемую область альфавируса (5'-НТО),

(2) последовательность 5'-репликации неструктурного гена nsp1 альфавируса,

(3) правый петлевой (DLP) мотив вида вируса,

(4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый пептид аутопротеазы,

(5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса,

(6) субгеномный промотор альфавируса,

(7) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15,

(8) 3'-нетранслируемая область альфавируса (3'-НТО) и

(9) необязательно последовательность полиаденозина.

[433] Вариант осуществления 21 включает РНК-репликон согласно варианту осуществления 20, причем мотив DLP взят из вида вируса, выбранного из группы, к которой относятся вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MTDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлэнд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндуму (NDUV) и вирус Багги Крик.

[434] Вариант осуществления 22 включает РНК-репликон согласно варианту осуществления 21, причем четвертый пептид аутопротеазы выбран из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2А (P2A), вирус ящура (FMDV) 2А (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2А (E2A), вирус *Thosea asigna* 2А (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2А (BmCPV2A), вирус флашерии 2А (BmIFV2A) и их комбинация.

[435] Вариант осуществления 22а включает РНК-репликон согласно варианту осуществления 22, причем четвертый пептид аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A.

[436] Вариант осуществления 22b включает РНК-репликон согласно варианту осуществления 22 или 22а, причем четвертый пептид аутопротеазы включает пептидную последовательность SEQ ID NO: 11.

[437] Вариант осуществления 23 включает РНК-репликон, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца,

(1) 5'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 55,

5 (2) последовательность 5'-репликации, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56,

(3) мотив DLP, включающий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 57,

10 (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность P2A SEQ ID NO: 11,

(5) полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные белки nsp1, nsp2, nsp3 и nsp4 альфавируса, кодируемые нуклеиновокислотными последовательностями SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно,

15 (6) субгеномный промотор, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 62,

(7) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15 и

20 (8) 3'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 63.

[438] Вариант осуществления 24 включает РНК-репликон согласно варианту осуществления 23, причем:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность P2A, включает SEQ ID NO: 12,

25 (II) полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные белки nsp1, nsp2, nsp3 и nsp4 альфавируса, имеют нуклеиновокислотные последовательности SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно;

30 (III) молекула нуклеиновой кислоты или комбинация включает полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54, и

(IV) РНК-репликон также включает последовательность полиаденозина, предпочтительно последовательность полиаденозина имеет последовательность SEQ ID NO: 64 на 3'-конце репликона.

[439] Вариант осуществления 25 включает РНК-репликон, включающий полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 65 по 72.

[440] Вариант осуществления 26 включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую полинуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-репликон согласно одному из вариантов осуществления 19 - 25, предпочтительно нуклеиновая кислота также включает Т7 промотор, функционально связанный с 5'-концом последовательности ДНК, в более предпочтительном варианте Т7 промотор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 73.

[441] Вариант осуществления 27 включает фармацевтическую композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15 и 26, вектор согласно одному из вариантов осуществления 16 - 18с2 или РНК-репликон согласно одному из вариантов осуществления 19 - 25 и фармацевтически приемлемый носитель.

[442] Вариант осуществления 28 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 27, причем фармацевтически приемлемый носитель включает один или несколько липидов.

[443] Вариант осуществления 28а включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28, причем один или несколько липидов включают катионный липид.

[444] Вариант осуществления 28а1 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28а, причем катионный липид является ионизируемым катионным липидом.

[445] Вариант осуществления 28а2 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28а, причем катионный липид выбран из группы, к которой относятся ALC-0315 (((4-гидроксипентил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoат)), DOTMA (N-D-(2,3-диолеилокси) пропила N,N, N-триметиламмонийхлорид), DOTAP (1,2-бис (олеилокси)-3 (триметиламмоний) пропан), DDAB (диметилдиоктадециламмоний бромид), DOGS (диоктадециламидологлицил-спермин), DOPE (1,2-диолеил-sn-3-фосфоэтанолламин), DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA, DLin-M-C3-DMA, DLin-

MP-DMA и DCChol (3 бета-(N—(N',N'-диметиламинометан)-карбамоил) холестерин) и их комбинации.

5 [446] Вариант осуществления 28a3 включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28a - 28a2, причем катионный липид представляет собой ALC-0315.

10 [447] Вариант осуществления 28b включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28a - 28a3, которая также включает один или несколько из следующих компонентов: (а) полиэтиленгликоль (ПЭГ) – липид или ПЭГ-модифицированный липид, (б) хелперный липид и (в) стерин.

15 [448] Вариант осуществления 28b1 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28b, причем ПЭГ-липид или ПЭГ-модифицированный липид выбран из группы, к которой относятся 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид (ALC-0159), PEG550-PE, PEG750-PE, PEG2000-DMG, ПЭГ-DSPE, ПЭГ-ДАА, ПЭГ-ДАГ, ПЭГ-РЕ, монометоксиполиэтиленгликоль (MePEG-OH), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинат (MePEG-S), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинимидил сукцинат (MePEG-S-NHS), монометоксиполиэтиленгликоль-амин (MePEG-NH₂), монометоксиполиэтиленгликоль-трезилат (MePEG-TRES),
20 монометоксиполиэтиленгликоль-имидазолил-карбонил (MePEG-IM) и их комбинации.

[449] Вариант осуществления 28b2 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28b или 28b1, причем ПЭГ липид представляет собой ALC-0159.

25 [450] Вариант осуществления 28c включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28b - 28b2, причем хелперный липид выбран из группы, к которой относятся нейтральный липид, нейтральный хелперный липид, некатионный липид, некатионный хелперный липид, анионный липид, анионный хелперный липид или цвиттер-ионный липид, или
30 их комбинации.

[451] Вариант осуществления 28c1 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28c, причем хелперный липид выбран из группы, к которой относятся дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин,

фосфатидилсерин, фосфатидилмнозит, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидная кислота, цереброзиды, дицетилфосфат, диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), 5 дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеил-фосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеил-фосфатидилэтанолламин (POPE), пальмитоилолеил-фосфатидилглицерин (POPG), диолеилфосфатидилэтанолламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), 10 дипальмитоил-фосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоил-фосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароил-фосфатидилэтанолламин (DSPE), монометил-фосфатидилэтанолламин, диметил-фосфатидилэтанолламин, диэлаидоил-фосфатидилэтанолламин (DEPE), стеароилолеил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), лизофосфатидилхолин, дилинолеилфосфатидилхолин и их комбинации.

15 [452] Вариант осуществления 28с2 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28с или 28с1, причем хелперный липид представляет собой дистеароилфосфатидилхолин (DSPC).

[453] Вариант осуществления 28d включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28b - 28с2, причем стерин выбран 20 из группы, к которой относятся холестерин, 5 α -холестанол, 5 α -копростанол, холестерил-(2'-гидрокси)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир, 6-кетохолестанол, 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 α -холестанон, холестерил деканоат и их комбинации.

25 [454] Вариант осуществления 28d1 включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 28d, причем стерин представляет собой холестерин.

[455] Вариант осуществления 28е включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28 - 28d1, причем один или несколько липидов включают ALC-0315, ALC-0159, DSPC и холестерин.

30 [456] Вариант осуществления 28f включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 28 - 28е, причем фармацевтически приемлемый носитель включает липидную наночастицу.

[457] Вариант осуществления 29 включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f, которая также включает:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую
5 полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-
10 полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ,
15 имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86.

[458] Вариант осуществления 30 включает способ вакцинирования субъекта против ВГВ, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f, и субъект
20 предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ.

[459] Вариант осуществления 30a включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f для применения в вакцинировании субъекта против ВГВ, и субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ.

[460] Вариант осуществления 30b включает фармацевтическую композицию для применения согласно варианту осуществления 30a, включающую вторую композицию, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один идентичный эпитоп ВГВ, такой как по меньшей мере один идентичный эпитоп АЛЧ, предпочтительно по меньшей мере один идентичный
30 антиген, для применения в режиме "прайм-буст".

[461] Вариант осуществления 30c включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f для применения в лечении инфекции ВГВ.

[462] Вариант осуществления 31 включает способ согласно варианту осуществления 30, также включающий введение субъекту второй композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один идентичный эпитоп ВГВ, такой как по меньшей мере один идентичный эпитоп АЛЧ, предпочтительно по меньшей мере один идентичный антиген, в режиме "прайм-буст".

[463] Вариант осуществления 32 включает способ согласно варианту осуществления 31, причем режим "прайм-буст" включает первую композицию, включающую РНК-репликон согласно одному из вариантов осуществления 19 - 25, и вторую композицию, включающую вектор, не являющийся РНК-репликоном и кодирующий по меньшей мере один идентичный эпитоп ВГВ, такой как по меньшей мере один идентичный эпитоп АЛЧ, предпочтительно по меньшей мере один идентичный антиген в качестве примирующей композиции.

[464] Вариант осуществления 32a включает способ согласно варианту осуществления 32, причем первую композицию применяют для примирующей иммунизации, а вторую композицию применяют для бустерной иммунизации в режиме "прайм-буст".

[465] Вариант осуществления 32b включает способ согласно варианту осуществления 32, причем вторую композицию применяют для примирующей иммунизации, а первую композицию применяют для бустерной иммунизации в режиме "прайм-буст".

[466] Вариант осуществления 33 включает способ согласно одному из вариантов осуществления 32 - 32b, причем вторая композиция включает вектор модифицированной вакцины Анкара (МВА), вектор аденовируса или плазмиду.

[467] Вариант осуществления 33a включает способ согласно варианту осуществления 33, причем вторая композиция включает вектор МВА-BN.

[468] Вариант осуществления 33b включает способ согласно варианту осуществления 33, причем вторая композиция включает вектор Ad26 или Ad35.

[469] Вариант осуществления 34 включает способ уменьшения инфекции и/или репликации ВГВ в организме субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f, или вакцинирование субъекта согласно одному из вариантов осуществления 30 или 31 - 33b.

[470] Вариант осуществления 34а включает способ согласно одному из вариантов осуществления 30 или 31 - 34, причем субъект выбран из группы, к которой относятся субъекты АЛЧ-А*11:01, субъекты АЛЧ-А*24:02, субъекты АЛЧ-А*02:01, субъекты АЛЧ-А*А2402, субъекты АЛЧ-А*А0101 и субъекты АЛЧ-В*40:01.

[471] Вариант осуществления 34а1 включает способ согласно варианту осуществления 34а, причем субъект выбран из группы, к которой относятся субъекты АЛЧ-А*11:01, субъекты АЛЧ-А*24:02, субъекты АЛЧ-А*02:01 и субъекты АЛЧ-А*А2402.

[472] Вариант осуществления 34а2 включает способ согласно варианту осуществления 34а или 34а1, причем субъект выбран из группы, к которой относятся субъекты АЛЧ-А*11:01, субъекты АЛЧ-А*24:02 и субъекты АЛЧ-А*02:01.

[473] Вариант осуществления 34а3 включает способ согласно одному из вариантов осуществления 34а - 34а2, причем субъект является субъектом АЛЧ-А*11:01.

[474] Вариант осуществления 34а4 включает способ согласно одному из вариантов осуществления 34а - 34а3, причем субъект является человеком.

[475] Вариант осуществления 34b включает способ согласно одному из вариантов осуществления 30 или 31 - 34, причем субъект включает по меньшей мере один антиген ВГВ, содержащий один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01, эпитопы АЛЧ-А*А2402, эпитопы АЛЧ-А*А0101 и эпитопы АЛЧ-В*40:01.

[476] Вариант осуществления 34b1 включает способ согласно варианту осуществления 34b, причем субъект включает по меньшей мере один антиген ВГВ, содержащий один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02, эпитопы АЛЧ-А*02:01 и эпитопы АЛЧ-А*А2402.

[477] Вариант осуществления 34b2 включает способ согласно варианту осуществления 34b или 34b1, причем субъект включает по меньшей мере один антиген ВГВ, содержащий один или несколько эпитопов, выбранных из группы, к которой относятся эпитопы АЛЧ-А*11:01, эпитопы АЛЧ-А*24:02 и эпитопы АЛЧ-А*02:01.

[478] Вариант осуществления 34b3 включает способ согласно одному из вариантов осуществления 34b - 34b2, причем субъект включает по меньшей мере один антиген ВГВ, содержащий один или несколько эпитопов АЛЧ-А*11:01.

5 [479] Вариант осуществления 34b4 включает способ согласно одному из вариантов осуществления 34b - 34b3, причем субъект является человеком.

10 [480] Вариант осуществления 35 включает выделенную клетку-хозяин, включающую молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию согласно одному из вариантов осуществления 1 - 15 и 26, вектор согласно одному из вариантов осуществления 16 - 18с2, или РНК-репликон согласно одному из вариантов осуществления 19 - 25.

[481] Вариант осуществления 36 включает способ продуцирования РНК-репликона, включающий транскрибирование нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 26 *in vivo* или *in vitro*.

15 [482] Вариант осуществления 36а включает способ согласно варианту осуществления 36, причем нуклеиновую кислоту транскрибируют *in vivo* в организме отличного от человека животного.

[483] Вариант осуществления 36b включает способ согласно варианту осуществления 36, причем нуклеиновую кислоту транскрибируют *in vivo* в организме человека.

20 [484] Вариант осуществления 37 включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f для применения в индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, необязательно в комбинации с другим иммуногенным агентом или другим агентом против ВГВ.

[485] Вариант осуществления 37а включает фармацевтическую композицию для применения согласно варианту осуществления 37, причем агент против ВГВ является малой молекулой, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом, белком или нуклеиновой кислотой.

30 [486] Вариант осуществления 37b включает способ индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f, причем способ необязательно также включает введение субъекту другого иммуногенного агента

и/или другого агента против ВГВ, и субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ.

5 [487] Вариант осуществления 38 включает фармацевтическую композицию согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f для применения в лечении вызываемого вирусом гепатита В (ВГВ) заболевания у субъекта, который в этом нуждается, субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, и вызываемое ВГВ заболевание выбрано из группы, к которой относятся запущенный фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК),
10 необязательно в комбинации с другим терапевтическим агентом, предпочтительно другим агентом против ВГВ.

[488] Вариант осуществления 38a включает способ лечения вызываемого вирусом гепатита В (ВГВ) заболевания у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно одному из вариантов осуществления 27 - 28f, причем способ необязательно
15 также включает введение субъекту другого терапевтического агента, предпочтительно другого агента против ВГВ, субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, и вызываемое ВГВ заболевание выбрано из группы, к которой относятся запущенный фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК).

20 [489] Вариант осуществления 39 включает выделенный антиген ВГВ, включающий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 9, 84, 85 или 86.

[490] Вариант осуществления 39a включает выделенный антиген ВГВ согласно варианту осуществления 39, причем антиген ВГВ включает
25 консенсусную последовательность для генотипов ВГВ А, В, С и D.

[491] Вариант осуществления 39b включает выделенный антиген ВГВ согласно варианту осуществления 39 или 39a, причем антиген ВГВ включает по меньшей мере два, три, четыре, пять или все из эпитопов для АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02, АЛЧ-А*02:01, АЛЧ-А*A2402, АЛЧ-А*A0101 и АЛЧ-В*40:01.

30 [492] Вариант осуществления 39c включает выделенный антиген ВГВ согласно одному из вариантов осуществления 39 - 39b, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 9, 84, 85 или 86.

[493] Вариант осуществления 40 включает выделенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ согласно одному из вариантов осуществления 39 - 39с.

5 [494] Вариант осуществления 40а включает выделенную полинуклеотидную последовательность согласно варианту осуществления 40, состоящую из нуклеотидной последовательности одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 10, 87, 88 или 89.

10 [495] Вариант осуществления 40b включает выделенную полинуклеотидную последовательность согласно варианту осуществления 40а, состоящую из нуклеотидной последовательности одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 10, 87, 88 или 89.

[496] Вариант осуществления 41 является вектором, включающим полинуклеотидную последовательность согласно одному из вариантов осуществления 40 - 40b.

15 [497] Вариант осуществления 41а является вектором согласно варианту осуществления 41, который является плазмидой.

[498] Вариант осуществления 41b является вектором согласно варианту осуществления 41, который является вирусным вектором.

20 [499] Вариант осуществления 41b1 является вектором согласно варианту осуществления 41b, который является вектором МВА, предпочтительно МВА-ВН.

[500] Вариант осуществления 41b2 является вектором согласно варианту осуществления 41b, который является аденовирусным вектором, предпочтительно Ad26 или Ad35.

25 [501] Вариант осуществления 41с является вектором согласно варианту осуществления 41, который является РНК-репликоном.

[502] Вариант осуществления 42 является фармацевтической композицией, состоящей из выделенного антигена ВГВ согласно одному из вариантов осуществления 39 - 39с, выделенной полинуклеотидной последовательностью согласно одному из вариантов осуществления 40 - 40b или вектором согласно
30 одному из вариантов осуществления 41 - 41с.

[503] Вариант осуществления 43 является способом индукции иммунного ответа в организме субъекта, который в этом нуждается, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 42.

[504] Вариант осуществления 43а включает фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 42 для применения в индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, необязательно в комбинации с другим иммуногенным агентом, предпочтительно другим агентом против ВГВ.

[505] Вариант осуществления 44 включает выделенную клетку-хозяин, включающую молекулу нуклеиновой кислоты согласно одному из вариантов осуществления 40 - 40b, вектор согласно одному из вариантов осуществления 41 - 41с.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Выбор антигена, проектирование и *in vitro* оценка репликонных кандидатных вакцин

[506] Каждый из высокоиммуногенных белков ВГВ Core, Pol, домены PreS2.S и PreS1 из поверхностного антигена L отбирали на включение в репликонную терапевтическую вакцину ВГВ. Для сосредоточения иммуногенности консенсусную последовательность генерировали на основе выравнивания уникальных последовательностей каждого антигена из генотипов А, В, С и D. Включение этих четырех генотипов, которые составляют > 78 % от всех инфекций хронического гепатита В (СНВ) в мире, позволяет достигать максимального размера поддающейся лечению целевой популяции. Известные человеческие Т-клеточные эпитопы для 3-х наиболее распространенных аллелей АЛЧ ГКГС класса I в Китае, в США и Европе (включая АЛЧ-А*11:01, АЛЧ-А*24:02, АЛЧ-А*02:01, АЛЧ-А*А0201, АЛЧ-А*А2402, АЛЧ-А* А0101 и АЛЧ-В*40:01) картировали на каждой консенсусной последовательности. Если обнаруживали, что известный эпитоп изменяется, консенсусную последовательность регулировали для восстановления эпитопа. Например, Arg 149, 150 и 151 С-конца включали в коровую последовательность ВГВ, кодируемую в терапевтической вакцине ВГВ. Последовательность Pol дополнительно оптимизировали для инактивации ее обратной транскриптазы и РНКазы Н. Сигнальный пептид предшественника Цистатина S добавляли к Core, Pol и домену PreS1 для усиления секреции, тогда как внутренний сигнальный пептид PreS2.S оставляли без изменений для содействия секреции PreS2.S белковых продуктов М и S. И наконец, аминокислотные последовательности для

каждого антигена подвергали обратной трансляции и кодон-оптимизации для обеспечения максимальной экспрессии у человека (Фигура 1А).

[507] Эти антигены кодировали либо только в репликоне, либо в полицистронных конфигурациях, с разным позиционированием каждого антигена в пределах репликона, каждый из которых связан элементом рибосомального пропуска Р2А или последовательностью внутренней посадки рибосомы (IRES) из EMCV или EV71 (Фигура 1В). С использованием плазмидной матрицы РНК для каждой конструкции репликона продуцировали путем реакции *in vitro* транскрипции и электропорировали в клетки Веро. Через 24 - 48 часов после электропорации экспрессию и секрецию каждого антигена измеряли путем проточной цитометрии, вестерн-блоттинга и ELISA. Частоту двухцепочечных РНК (дцРНК) и антиген-положительных клеток также анализировали в качестве индикатора эффективности амплификации репликона. Для каждого конструкта, каждому антигену присваивали балл в зависимости от относительного уровня 1) экспрессии, 2) секреции и 3) частоты положительных на антиген/дцРНК клеток относительно репликона, экспрессирующего один антиген. Балльные показатели антигенов взвешивали и комбинировали для получения общего балла репликонового конструкта (см. Таблицу 1 ниже). Каждый конструкт ранжировали на основе этих баллов и отбирали 4 первых бицистронных и 4 первых тетрацистронных конструкта для дальнейшей *in vivo* оценки (Фигура 2). В случае равных показателей конструктов приоритетность балльных показателей генов определяли в следующем порядке, применяемом для ранжирования этих конструктов: Core > Pol > PreS2.S > PreS1. Кроме того, конструкту с более близким уровнем относительной экспрессии каждого антигена отдавали приоритет перед конструктом, имеющим высокую экспрессию одного антигена и низкую экспрессию других антигенов.

Таблица 1

	Балл Score	Балл Pol	Балл PreS2.S	Балл PreS1	Общ. балл конструкта	Макс. балл
Расчетный средневзвешенный показатель	0.40	0.25	0.20	0.15	1	
Core	(1x 0.4) = 0.4	0	0	0	0.4	0.4
Pol	0	0.25	0	0	0.25	0.25
preS2.S	0	0	0.20	0	0.20	0.20
preS1	0	0	0	0.1	0.1	0.1
Core-2A-Pol	0.22	0.16	--	--	0.39*	0.65
Pol-2A-Core	0.17	0.24	--	--	0.41	0.65
preS2.S-2A-preS1	--	--	0.145	0.150	0.295	0.35
preS1-2A-preS2.S	--	--	0.188	0.150	0.338	0.35
Core-IRES-Pol (EMCV IRES)	0.18	0.20	--	--	0.39	0.65
Pol-IRES-Core (EMCV IRES)	0.32	0.17	--	--	0.50	0.65
Core-IRES-Pol (EV71 IRES)	0.19	0.20	--	--	0.38	0.65
Pol-IRES-Core (EV71 IRES)	0.28	0.18	--	--	0.46	0.65
preS2.S-IRES-preS1 (EMCV IRES)	--	--	0.189	0.150	0.339	0.35
preS1-IRES-preS2.S (EMCV IRES)	--	--	0.119	0.150	0.269	0.35
preS2.S-IRES-preS1 (EV71 IRES)	--	--	0.191	0.150	0.341	0.35
preS1-IRES-preS2.S (EV71 IRES)	--	--	0.158	0.150	0.308	0.35
Core-2A-Pol-2A-preS2.S-2A-preS1	0.305	0.137	0.057	0.013	0.51	1
Pol-2A-Core-2A-preS2.S-2A-preS1	0.281	0.232	0.062	0.016	0.59	1
preS2.S-2A-preS1-2A-Core-2A-Pol	0.282	0.171	0.093	0.042	0.59	1
preS2.S-2A-preS1-2A-Pol-2A-Core	0.287	0.196	0.099	0.052	0.63	1
Core-2A-Pol-IRES-preS2.S-2A-preS1 (EMCV IRES)	0.290	0.170	0.126	0.096	0.68	1
Pol-2A-Core-IRES-preS2.S-2A-preS1 (EMCV IRES)	0.276	0.242	0.121	0.079	0.72	1
preS2.S-2A-preS1-IRES-Core-2A-Pol (EMCV IRES)	0.272	0.218	0.104	0.029	0.62	1
preS2.S-2A-preS1-IRES-Pol-2A-Core (EMCV IRES)	0.287	0.250	0.112	0.037	0.69	1
Core-2A-Pol-IRES-preS2.S-2A-preS1 (EV71 IRES)	0.259	0.128	0.118	0.069	0.57	1
Pol-2A-Core-IRES-preS2.S-2A-preS1 (EV71 IRES)	0.258	0.233	0.121	0.069	0.68*	1
preS2.S-2A-preS1-IRES-Core-2A-Pol (EV71 IRES)	0.286	0.243	0.103	0.029	0.66	1
preS2.S-2A-preS1-IRES-Pol-2A-Core (EV71 IRES)	0.265	0.249	0.101	0.030	0.65	1

[508] Фигура 2 показывает экспрессию каждого антигена из первых 8 репликонов относительно моногенных контрольных образцов. Все конструкторы были способны к поддержанию относительно высокого уровня экспрессии каждого антигена. Однако, когда core и pol экспрессировались из одного бицистронного РНК-репликона, наблюдали уменьшение экспрессии Core. В отличие от него, тетрацистронные репликоны, экспрессирующие Core, Pol, PreS2.S и PreS1 из одного репликона, неизменно демонстрировали 2-3-кратное увеличение экспрессии Core относительно моногенного контроля. Результатом экспрессии Core, Pol и PreS2.S из трицистронного РНК-репликона также было увеличение уровня экспрессии Core (Фигура 3), хотя увеличение не было столь заметным, как при экспрессии PreS1 из того же РНК-репликона.

Пример 2: SMARRT-платформа РНК-репликона индуцирует клеточные ответы у мышей на ВГВ-мишени

[509] Цель этих исследований состояла в том, чтобы определить, способна ли технология синтетического модифицированного альфа-РНК-репликона (SMARRT), кодирующая антигены ВГВ, примировать иммунные ответы у мышей C57BL/6. моногенные SMARRT-конструкторы ВГВ вводили в дозе 15 мкг, а группа, которой вводили примешанные антигены, получала 4 моногенных SMARRT-репликона в дозе 15 мкг каждого репликона (всего 60 мкг РНК на мышь). В 0-ю неделю мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции указанным(и) SMARRT-конструктором(ами), а контрольной группе вводили инъекцию солевого раствора. На 2-ю неделю всех мышей умерщвляли и спленоциты стимулировали 15-мерными перекрывающимися пептидными пулами, покрывающими последовательность антигена во вставке (для SMARRT.Pol перекрывающуюся библиотеку расщепляли на 2 пула). Индукцию продуцирующих IFN- γ клеток измеряли при помощи IFN- γ ELISpot. Ответы полифункциональных Т-клеток CD8 и CD4 определяли путем измерения продуцирования IFN- γ , TNF α и IL-2 путем проточной цитометрии. Ниже в Таблице 2 показаны разные экспериментальные группы.

Таблица 2

Группа	Кол-во животных	Описание групп
1	5	Солевой раствор
2	5	SMARRT.Core
3	5	SMARRT.Pol
4	5	SMARRT.PreS2.S

Группа	Кол-во животных	Описание групп
5	5	SMARTT.PreS1
6	5	SMARTT.примешанные монотопы

[510]У всех животных, иммунизированных кодирующими SMARTT-репликон антигенами ВГВ, развивались IFN- γ -продуцирующие клетки после стимуляции пептидами, покрывающими соответствующую антигенную последовательность (Фигура 4). Кроме того, примешивание 4 SMARTT репликонов индуцировало продуцирующие IFN γ клетки для всех 4-х антигенов. В идентичном, но проводимом отдельно эксперименте продуцирование полифункционального Т-клеточного цитокина измеряли при помощи внутриклеточной проточной цитометрии (Фигура 5). Этот эксперимент показал, что иммунизация мышей SMARTT.Core или SMARTT.PreS1 индуцирует полифункциональные CD4 Т-клетки у мышей C57BL/6. Результатом иммунизации с применением SMARTT.Pol и SMARTT.PreS2.S был ответ полифункциональных Т-клеток CD4 и CD8 у мышей.

Пример 3: Отсеивающий отбор кандидатных терапевтических SMARTT-вакцин против ВГВ на мышах

[511]После *in vitro* скрининга выбрали 8 конструкторов для *in vivo* анализа иммуногенности на мышах, включая 4 тетрацистронных конструктора и 4 бигенных конструктора, которые примешивали в 4-х комбинациях для доставки всех 4 антигенов ВГВ. Мышей C57BL/6 иммунизировали в 0-ю неделю, затем на 2-ю неделю собирали образцы селезенки для анализа иммуногенности в соответствии с планом эксперимента, как показано ниже в Таблице 3. *Ex vivo* исследования включали IFN γ ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов.

Таблица 3

Группа	Кол-во животных	Описание групп (2-15 все SMARTT)
1	5	Солевой раствор
2	5	SMARTT.Core
3	5	SMARTT.Pol
4	5	SMARTT.PreS2.S
5	5	SMARTT.PreS1
6	5	SMARTT.примешанные моногенные
7	5	PreS2.S-IRES-PreS1 (EV71 IRES) + примешивание Pol-IRES-Core (EMCV IRES)
8	5	PreS2.S-IRES-PreS1 (EV71 IRES) + примешивание Core-2A-Pol
9	5	PreS1-2A-PreS.S + примешивание Pol-IRES-Core (EMCV IRES)

Группа	Кол-во животных	Описание групп (2-15 все SMARTT)
10	5	PreS1-2A-PreS.S + примешивание Core-2A-Pol
11	5	PreS1-2A-PreS.S-2A-Core-Pol
12	5	PreS1-2A-PreS.S-2A-Pol-2A-Core
13	5	Pol-2A-Core-IRES-PreS2.S-2A-PreS1 (EMCV IRES)
14	5	Pol2A-Core-IRES-PreS2.S-2A-PreS1 (EV71 IRES)
15	5	SMARTT.Core + примешивание Pol

[512] Все бигенные и тетрацистронные конструкторы вызывали сильный Т-клеточный ответ против ВГВ Core (Фигура 6A), Pol (Фигура 6B) и PreS2.S (Фигура 6C), согласно измерениям при помощи IFN γ ELISpot. Все бигенные и тетрацистронные конструкторы вызывали Т-клеточный ответ против PreS1 (Фигура 6D), с определенными колебаниями в зависимости от конструктора. Наиболее сильные ответы против PreS1 были индуцированы путем примешивания бигенных 2 и 3 (Группа 9), бигенных 2 и 4 (Группа 10) и тетрацистронных конструкторов (Группы 11 - 14).

[513] Все бигенные и тетрацистронные конструкторы вызывали ответ полифункциональных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ против Core (Фигура 7A), Pol (Фигура 7B), PreS2.S (Фигура 7C) и PreS1 (Фигура 7D), измеряемый по способности к продуцированию множественных цитокинов. Ответы против PreS1 были более изменчивы в зависимости от конструктора, причем наиболее сильные ответы были вызваны примешиванием бигенных 2 и 3 (Группа 9), бигенных 2 и 4 (Группа 10), и тетрацистронных конструкторов (Группы 11 - 14).

Пример 4: Отсеивающий отбор кандидатных терапевтических SMARTT-вакцин против ВГВ на обезьянах

[514] Для подтверждения иммуногенности отобранных на мышах конструкторов для крупных животных проводят исследования иммуногенности на яванских макаках (*M. fascicularis*). Обезьян иммунизируют двумя разными кандидатными SMARTT-вакцинами в 0-ю неделю с последующими бустерными введениями каждые 4 недели еще 3 раза. Оценивают 3 разных уровня доз SMARTT, как показано ниже в Таблице 4. *Ex vivo* анализы включают IFN γ ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов с применением РВМС для определения ответов функциональных Т-клеток через 10 дней после инъекции. Образцы сыворотки берут в дни инъекций для измерения уровня антитела против ГвпАг при помощи ELISA. Образцы сыворотки также берут в день

инъекции, а также через 6 часов после инъекции и через 24 часа после инъекции для измерения цитокинов и уровня С-реактивного белка.

Таблица 4

Группа	Кол-во животных	Описание групп
1	5 (3m, 2f)	Солевой раствор
2	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 1 100 мкг
3	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 1 30 мкг
4	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 1 10 мкг
5	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 2 100 мкг
6	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 2 30 мкг
7	5 (3m, 2f)	SMARRT кандидат 2 10 мкг
8	5 (3m, 2f)	SMARRT.примешанные монотопы

5 m – самцы, f – самки

[515] Специалист в данной области техники легко сможет установить возможность различных видоизменений и модификаций раскрываемого авторами изобретения без отклонения от объема и сущности изобретения.

10 [516] Все патенты и публикации, упомянутые в описании указывают на уровень специалистов в области, к которой относится изобретение.

15 [517] Изобретение, пояснительное описание которого представлено авторами, соответственно предполагает возможность практического осуществления в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые прямо не раскрываются в данном описании. Таким образом, например, в каждом из случаев предполагается возможность замены
любого из терминов "включающий", "состоящий по сути из" и "состоящий из" на
любой из двух других терминов. Применяемые термины и выражения
употребляются для описания, но не ограничения, и применение таких терминов
и выражений не предполагает исключения каких-либо эквивалентов показанных
20 и описанных особенностей или их частей, но при этом признается возможность различных модификаций в пределах объема заявленного изобретения. Кроме того, если особенности или аспекты изобретения описаны с точки зрения групп Маркуша, специалистами в данной области техники признается, что изобретение, таким образом, также описано с точки зрения отдельного элемента
25 или подгруппы элементов группы Маркуша. Например, если X описан как выбранный из группы, включающей бром, хлор и йод, пункты для X, являющегося бромом, и пункты для X, являющегося бромом и хлором,

описываются полностью. Другие варианты осуществления охватываются прилагаемой ниже формулой изобретения.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация нуклеиновой кислоты, которая включает первую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) первый элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый пептид аутопротеазы, и

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген ВГВ, и

вторую не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, включающую, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую третий антиген вируса гепатита В (ВГВ),

(2) второй элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй пептид аутопротеазы, и

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый антиген ВГВ,

причем первая и вторая не встречающиеся в природе полинуклеотидные последовательности связаны третьим элементом последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей третий пептид аутопротеазы, или присутствуют в отдельных молекулах нуклеиновых кислот, и

первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, каждый независимо, являются выбранными из группы, к которой относятся коровый антиген ВГВ, антиген ВГВ-полимеразы (pol) и поверхностный антиген ВГВ, и по меньшей мере один из первого, второго, третьего и четвертого антигенов ВГВ является поверхностным антигеном ВГВ, выбранным из антигена Pre-S1 ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и антигена PreS2.S ВГВ, имеющего аминокислотную последовательность, по

меньшей мере на 98 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, предпочтительно один из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ или ро1-антигеном ВГВ.

5 2. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 1, причем один из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является коровым антигеном ВГВ и один является ро1-антигеном ВГВ.

10 3. Комбинация нуклеиновой кислоты по пп. 1 или 2, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ является отличным от других.

15 4. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 3, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относится:

20 (I) первый антиген PreS1 ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

25 (II) второй антиген PreS1 ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

30 (III) антиген PreS2.S ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(IV) коровый антиген ВГВ включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %,
5 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 7; и

(V) pol-антиген ВГВ, включающий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %,
10 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 9,

причем предпочтительно каждый из антигенов, к которым относятся первый и второй антигены Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и pol-антиген ВГВ,
15 независимо является функционально связанным с сигнальным пептидом, и антиген PreS2.S ВГВ включает внутренний сигнальный пептид.

5. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 4, причем коровый антиген ВГВ включает, предпочтительно состоит из, аминокислотной
20 последовательности, которая по меньшей мере на 98 % идентична по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 84, 85, или 86, например, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 % идентична SEQ ID NO: 84, 85 или 86.

6. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 5, причем последние пять С-концевых аминокислот корового антигена ВГВ включают
25 аминокислотную последовательность VVR, более конкретно – аминокислотную последовательность VVRR (SEQ ID NO: 91), более конкретно – аминокислотную последовательность VVRRR (SEQ ID NO: 92).

7. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 6, причем каждый из поверхностного антигена ВГВ, корового антигена ВГВ и pol-антигена ВГВ включает:
30

(I) консенсусную последовательность для генотипов ВГВ А, В, С и D; и/или

(II) один или несколько эпитопов для HLA-A*11:01, HLA-A*24:02, HLA-A*02:01, HLA-A*A2402, HLA-A*A0101 или HLA-B*40:01.

5 8. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 7, причем каждый из поверхностных антигенов ВГВ, корового антигена ВГВ и ро1-антигена ВГВ включает один или несколько эпитопов для HLA-A*11:01.

10 9. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 4, причем каждый из первого, второго, третьего или четвертого антигенов ВГВ независимо выбран из группы, к которой относятся:

(I) первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(II) второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

15 (III) антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

(IV) коровый антиген ВГВ, состоящий из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86; и

20 (V) ро1-антиген ВГВ, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9,

предпочтительно каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, корового антигена ВГВ и ро1-антигена ВГВ независимо является функционально связанным с сигнальным пептидом, таким как сигнальный пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

25 10. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 9, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

30 (I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2

%, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 2;

(II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 %
5 идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S
10 ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 6, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 6;

(IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 %
15 идентична SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична
20 SEQ ID NO: 8; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая pol-антиген ВГВ, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ
ID NO: 10, например, по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % или 100 % идентична SEQ ID NO:
25 10,

предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и pol-
антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной
30 последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, и антиген PreS2.S ВГВ включает внутренний сигнальный пептид.

11. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 10, причем каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй, третий и

четвертый антигены ВГВ, является независимо выбранной из группы, к которой относятся:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 2;

5 (II) полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй антиген Pre-S1 ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 4;

(III) полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreS2.S ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 6;

10 (IV) полинуклеотидная последовательность, кодирующая коровый антиген ВГВ, состоящий из последовательности одной из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89; и

(V) полинуклеотидная последовательность, кодирующая ро1-антиген ВГВ, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 10;

15 предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и ро1-антиген ВГВ независимо функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим сигнальный пептид, таким как полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 90.

20 12. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 11, причем каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы независимо включает пептидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вирус *Thosea asigna* 2A (T2A),
25 вирус цитоплазматического полиэдроса 2A (BmCPV2A), вирус флашерии 2A (BmIFV2A) и их комбинация, причем предпочтительно каждый из первого, второго и третьего пептидов аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A, такую как последовательность P2A SEQ ID NO: 11.

30 13. Комбинация нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 12, причем каждая из первой, второй и третьей IRES взята из вируса энцефаломиокардита (EMCV) или Энтеровируса 71 (EV71), причем предпочтительно каждая из первой, второй и третьей IRES включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

14. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 1, включающая, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(3) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную

последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(10) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

(11) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген Pre-S1 ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;

(12) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную

антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

(15) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, IRES, 5 имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную 10 последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

(16) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, 15 полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий 20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(17) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную 25 последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(18) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый 30 антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

5 (19) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий
10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86;

15 (20) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий
20 аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

25 (21) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий
30 аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или

- (22) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PreS2.S ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,
- 5 предпочтительно полинуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из первого и второго антигенов Pre-S1 ВГВ, коровый антиген ВГВ и роl-антиген ВГВ, независимо функционально связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.
- 10
- 15 15. Комбинация нуклеиновой кислоты по п. 14, включающая не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54.
- 20 16. Вектор, включающий комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15.
17. Вектор по п. 16, который является плазмидой ДНК.
- 25 18. Вектор по п. 16, который является вирусным вектором ДНК или вирусным вектором РНК.
19. Вектор по п. 18, который является вектором модифицированной вакцины Анкара (МВА) или вектором аденовируса.
- 30 20. Вектор по п. 19, который является вектором Ad26, Ad35 или MVA-BN.

21. РНК-репликон, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца:

- (1) 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК;
- (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один, предпочтительно все, из неструктурных белков вируса РНК;
- (3) субгеномный промотор вируса РНК;
- (4) комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15; и
- (5) 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), которая требуется для опосредуемой неструктурным белком амплификации вируса РНК.

10

22. РНК-репликон по п. 21, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца:

- (1) 5'-нетранслируемую область альфавируса (5'-НТО),
- (2) последовательность 5'-репликации неструктурного гена nsр1 альфавируса,
- (3) правый петлевой (DLP) мотив вида вируса,
- (4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую четвертый пептид аутопротеазы,
- (5) полинуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса,
- (6) субгеномный промотор альфавируса;
- (7) комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15;
- (8) 3'-нетранслируемую область альфавируса (3'-НТО) и
- (9) необязательно последовательность полиаденозина.

15

20

25

30

23. РНК-репликон по п. 22, причем мотив DLP взят из вида вируса, выбранного из группы, к которой относятся вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MTDV), вирус чикунгунья (CHIKV), вирус о'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач

(KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлэнд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндumu (NDUV) и вирус Багги Крик.

24. РНК-репликон по п. 23, причем четвертый пептид аутопротеазы
 5 выбран из группы, к которой относятся свиной тешовирус-1 2A (P2A), вирус
 ящура (FMDV) 2A (F2A), вирус ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вирус
 Thosea asigna 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A),
 вирус флашерии 2A (BmIFV2A) и их комбинация, причем предпочтительно
 четвертый пептид аутопротеазы включает пептидную последовательность P2A.

10

25. РНК-репликон по п. 21, включающий, в порядке от 5'- до 3'-конца:

(1) 5'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID
 NO: 55,

(2) последовательность 5'-репликации, имеющую полинуклеотидную
 15 последовательность SEQ ID NO: 56,

(3) мотив DLP, включающий полинуклеотидную последовательность SEQ
 ID NO: 57,

(4) полинуклеотидную последовательность, кодирующую
 последовательность P2A SEQ ID NO: 11,

(5) полинуклеотидные последовательности, кодирующие неструктурные
 20 белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 альфавируса, имеющие нуклеиновокислотные
 последовательности SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID
 NO: 61, соответственно,

(6) субгеномный промотор, имеющий полинуклеотидную
 25 последовательность SEQ ID NO: 62,

(7) комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15, и

(8) 3'-НТО, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID
 NO: 63.

30 26. РНК-репликон по п. 25, причем:

(I) полинуклеотидная последовательность, кодирующая
 последовательность P2A, включает SEQ ID NO: 12,

(II) комбинация нуклеиновой кислоты включает полинуклеотидную
 последовательность одной из SEQ ID NO: с 15 по 54, и

(III) РНК-репликон также включает последовательность полиаденозина, причем предпочтительно последовательность полиаденозина имеет последовательность SEQ ID NO: 64, на 3'-конце репликона.

5 27. РНК-репликон, включающий полинуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: с 65 по 72.

10 28. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-репликон по одному из пунктов 21 - 27, предпочтительно нуклеиновая кислота также включает T7 промотор, функционально связанный с 5'-концом последовательности ДНК, в более предпочтительном варианте T7 промотор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 73.

15 29. Фармацевтическая композиция, включающая комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15, вектор по одному из пунктов 16 - 20, РНК-репликон по одному из пунктов 21 - 27 или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 28 и фармацевтически приемлемый носитель.

20 30. Фармацевтическая композиция по п. 29, причем фармацевтически приемлемый носитель включает липидную наночастицу, причем липидная наночастица предпочтительно включает один или несколько из ALC-0315, DOTMA, DOTAP, DDAB, DOGS, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, 25 DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA, DLin-M-C3-DMA, DLin-MP-DMA или DCChol.

31. Фармацевтическая композиция по пп. 29 или 30, которая также включает:

30 (1) полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ, имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или 86, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и

полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или

5 (2) полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВГВ-
полимеразы, имеющий, предпочтительно состоящий из, аминокислотной
последовательности SEQ ID NO: 9, полинуклеотидную последовательность,
кодирующую аминокислотную последовательность P2A SEQ ID NO: 11, или
IRES, имеющую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14,
10 и полинуклеотидную последовательность, кодирующую коровый антиген ВГВ,
имеющий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 84, 85 или
86.

32. Фармацевтическая композиция по одному из пунктов 29 - 31 для
15 применения в лечении инфекции ВГВ.

33. Фармацевтическая композиция для применения по п. 32, причем
фармацевтическая композиция является терапевтической вакциной против ВГВ.

34. Фармацевтическая композиция для применения по пп. 32 или 33,
20 которая также включает вторую композицию, включающую молекулу
нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один идентичный антиген
ВГВ, для применения в режиме "прайм-буст".

35. Фармацевтическая композиция для применения по п. 34, причем
25 режим "прайм-буст" включает первую композицию, включающую РНК-репликон
по одному из пунктов 21 - 27, и вторую композицию, включающую вектор, не
являющийся РНК-репликоном и кодирующий по меньшей мере один
идентичный эпитоп ВГВ, предпочтительно по меньшей мере один идентичный
антиген ВГВ, в качестве первой композиции, и одну из первой и второй
30 композиций применяют для праймирующей вакцинации, а вторую композицию
применяют для бустерной вакцинации.

36. Фармацевтическая композиция для применения по п. 35, причем вторая композиция включает вектор модифицированной вакцины Анкара (МВА), вектор аденовируса или плазмидный вектор.

5 37. Фармацевтическая композиция для применения по п. 36, причем вторая композиция включает вектор Ad26, Ad35 или МВА-BN.

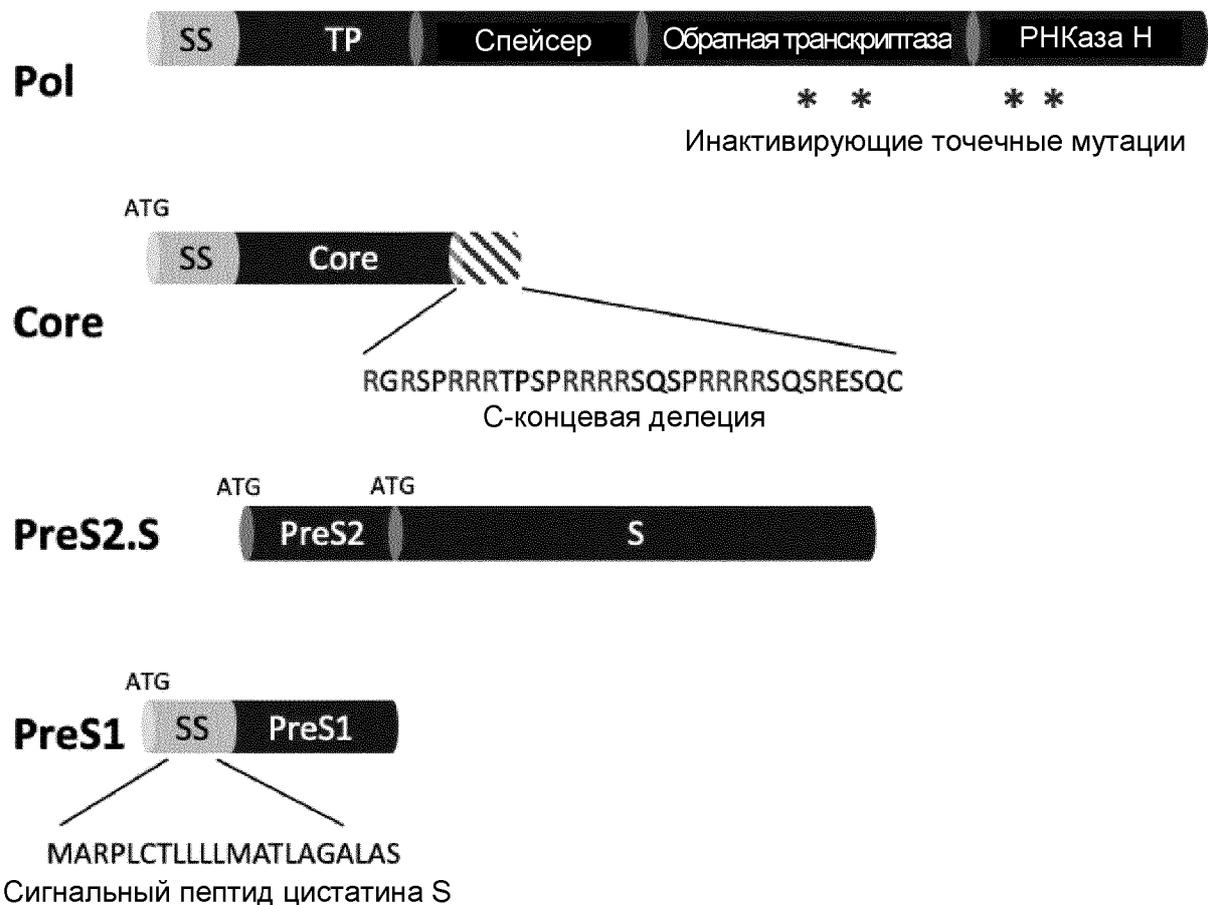
10 38. Фармацевтическая композиция по одному из пунктов 28 - 31 для применения в индукции иммунного ответа против вируса гепатита В (ВГВ) в организме субъекта, который в этом нуждается, причем субъект предпочтительно имеет хроническую инфекцию ВГВ, необязательно в комбинации с другим иммуногенным агентом или другим агентом против ВГВ.

15 39. Фармацевтическая композиция для применения по п. 38, причем другим агентом против ВГВ является малая молекула, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, белок или нуклеиновая кислота.

20 40. Фармацевтическая композиция по одному из пунктов 29 - 31 для применения в уменьшении инфекции и/или репликации ВГВ в организме субъекта, который в этом нуждается.

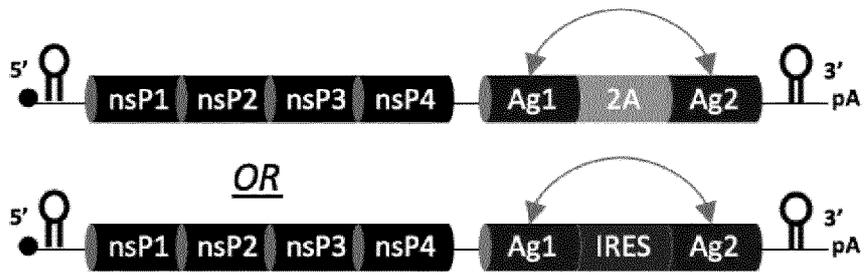
25 41. Выделенная клетка-хозяин, включающая комбинацию нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 1 - 15, вектор по одному из пунктов 16 - 20, РНК-репликон по одному из пунктов 21 - 27 или молекулу нуклеиновой кислоты по 28.

42. Способ продуцирования РНК-репликона, включающий транскрибирование нуклеиновой кислоты по п. 28, *in vivo* или *in vitro*.

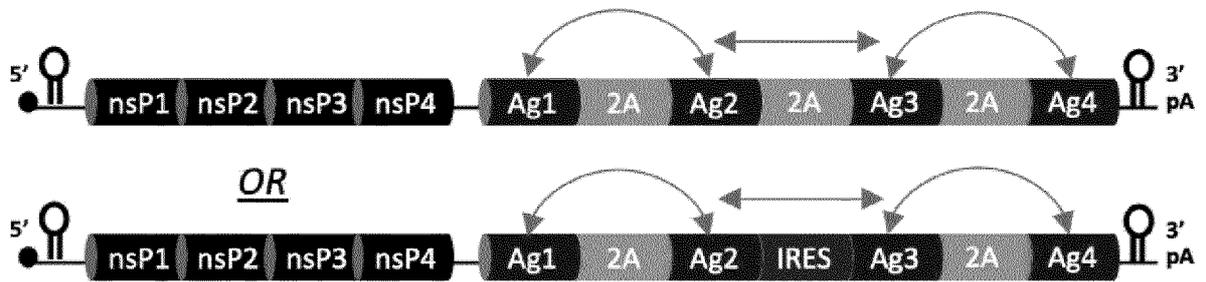


ФИГ. 1А

Бицистронные



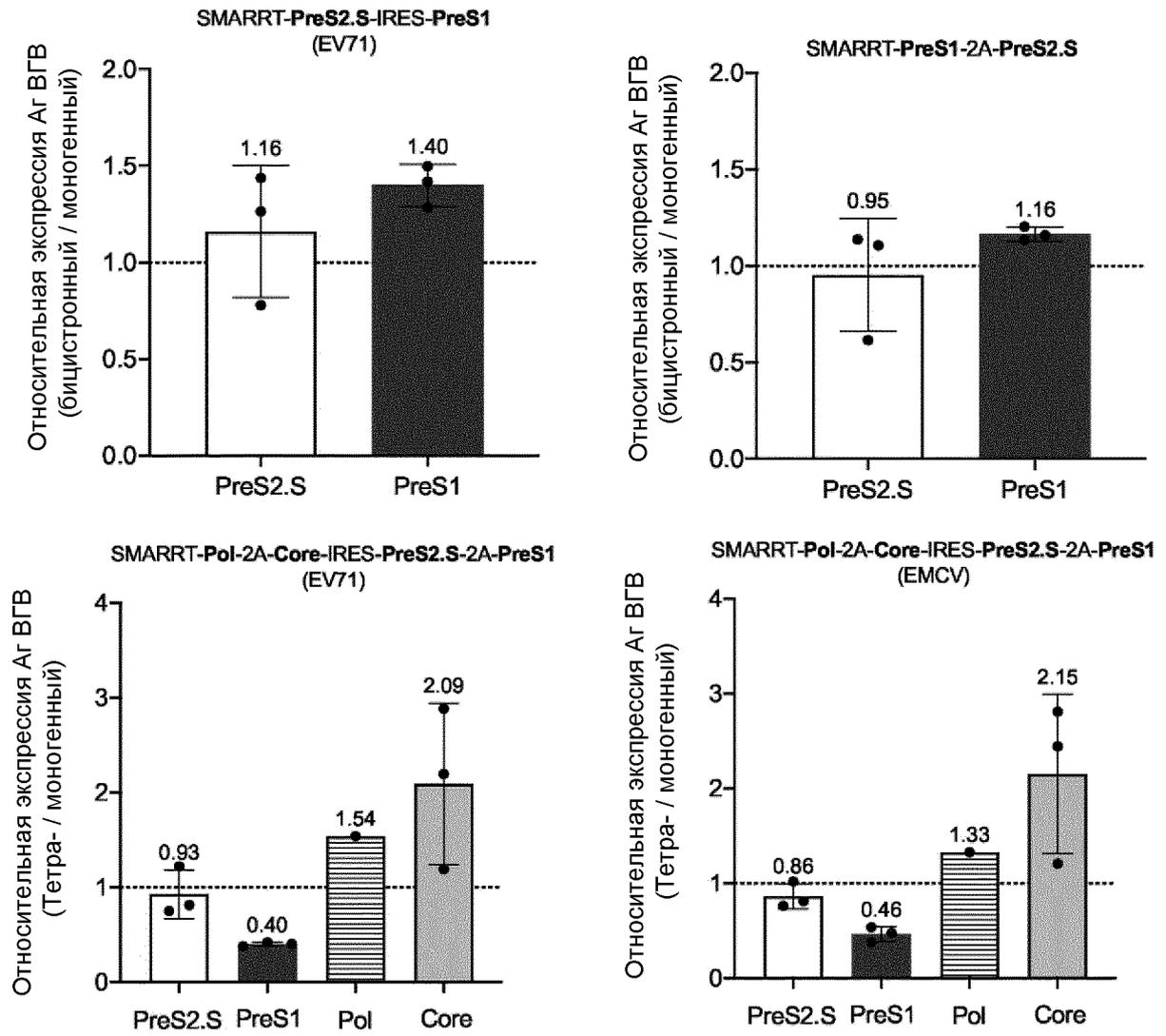
Тетрацистронные



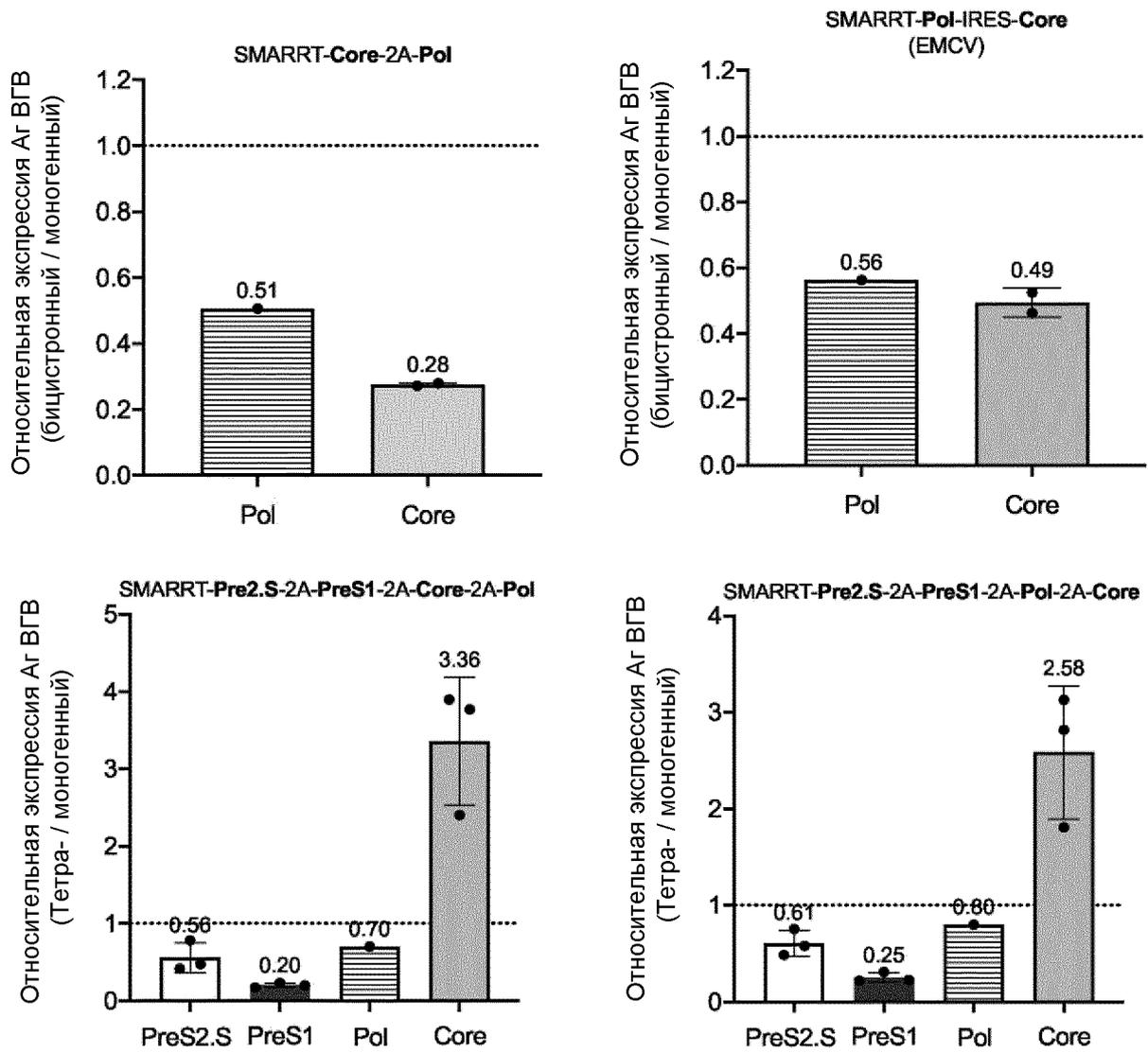
nsP = неструктурные белки

Ag = антиген

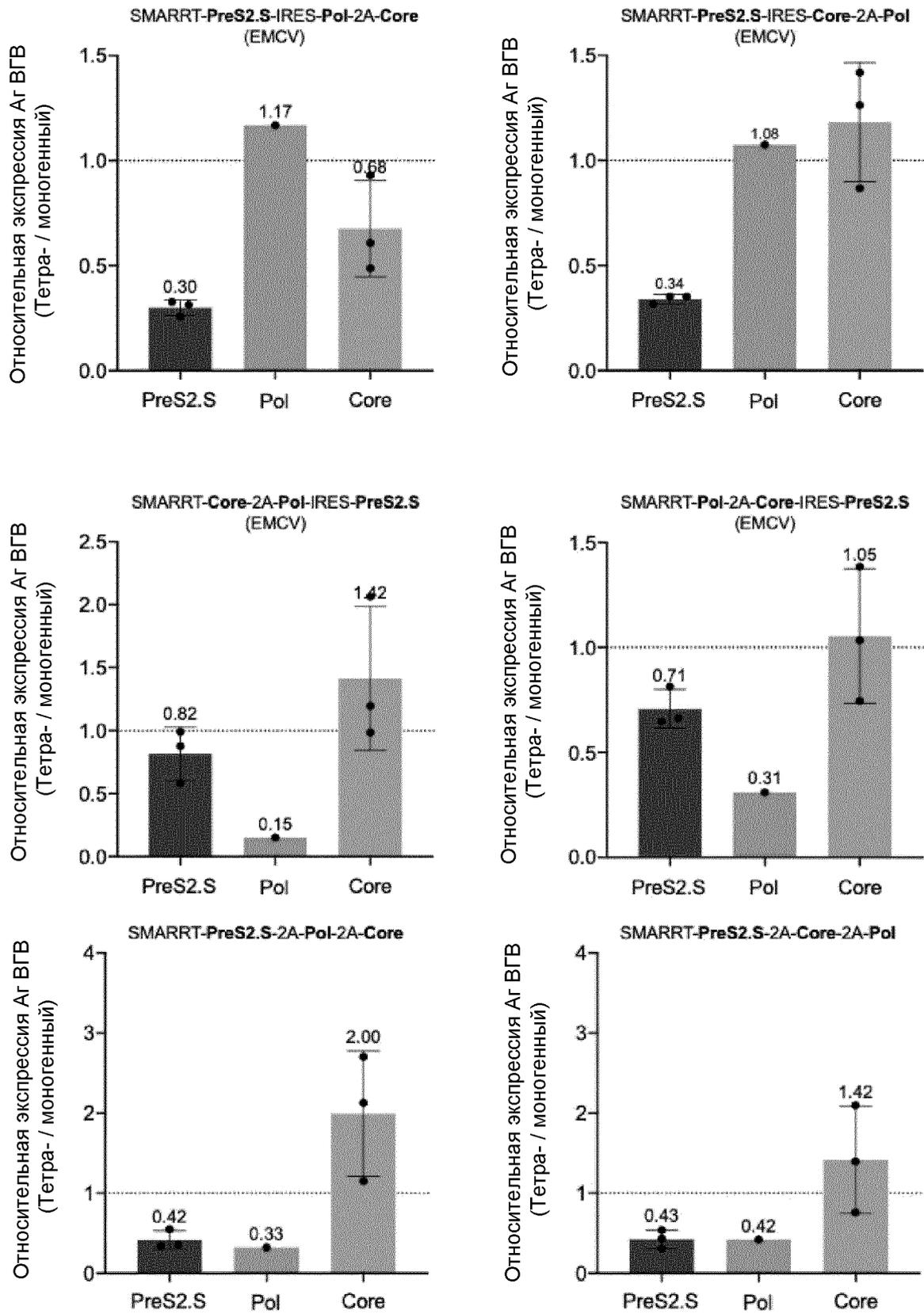
ФИГ. 1В



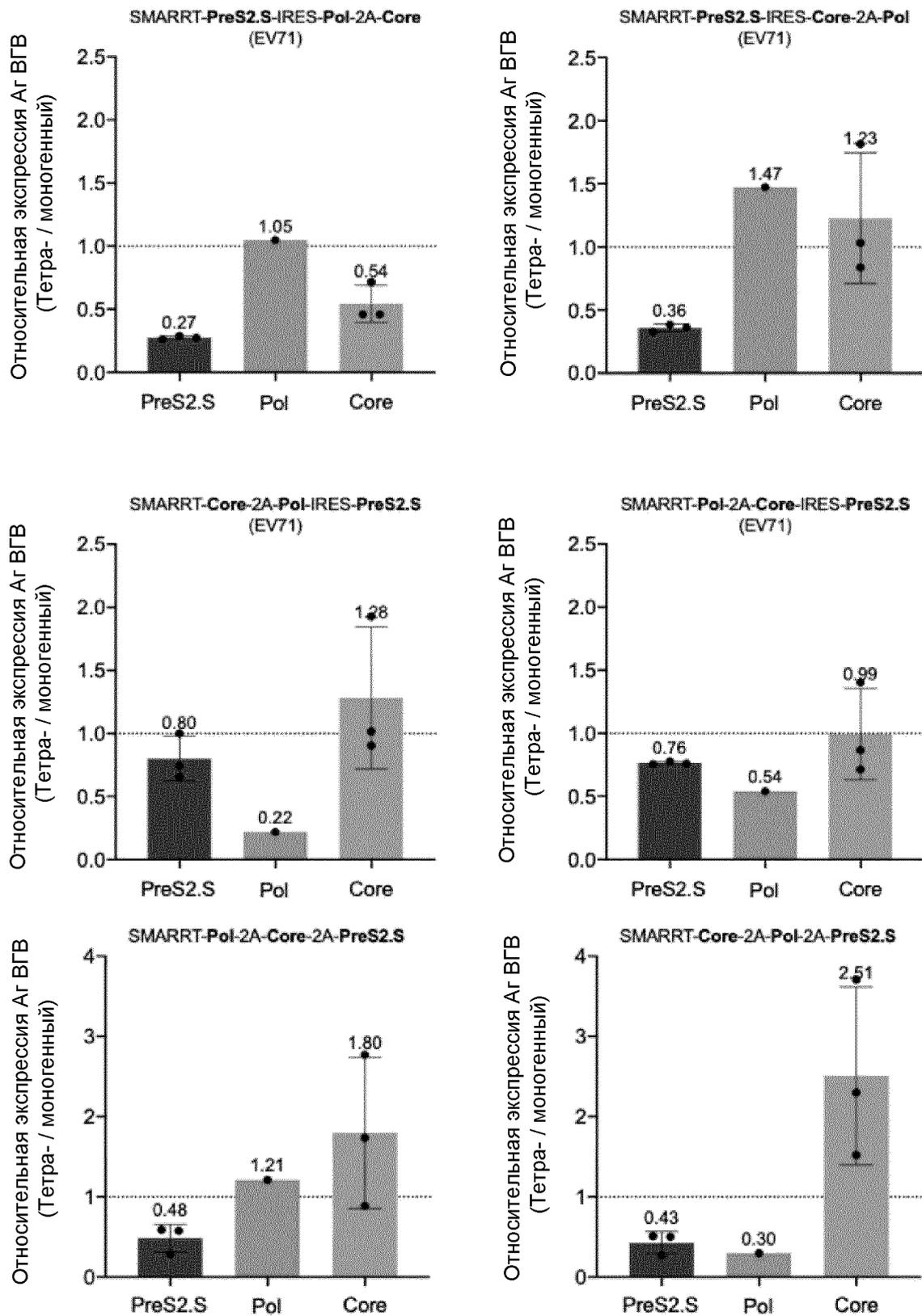
ФИГ. 2



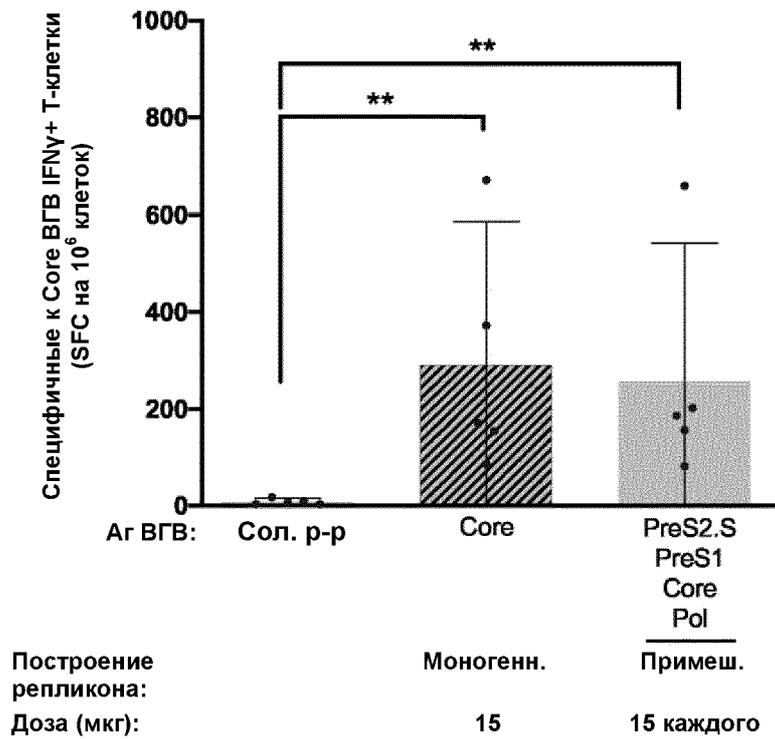
ФИГ. 2 (продолжение)



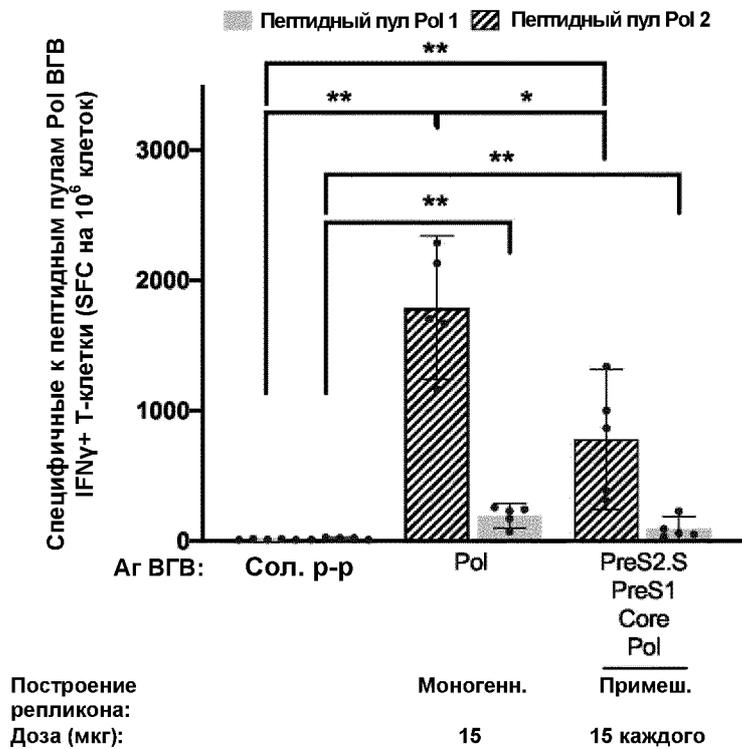
ФИГ. 3



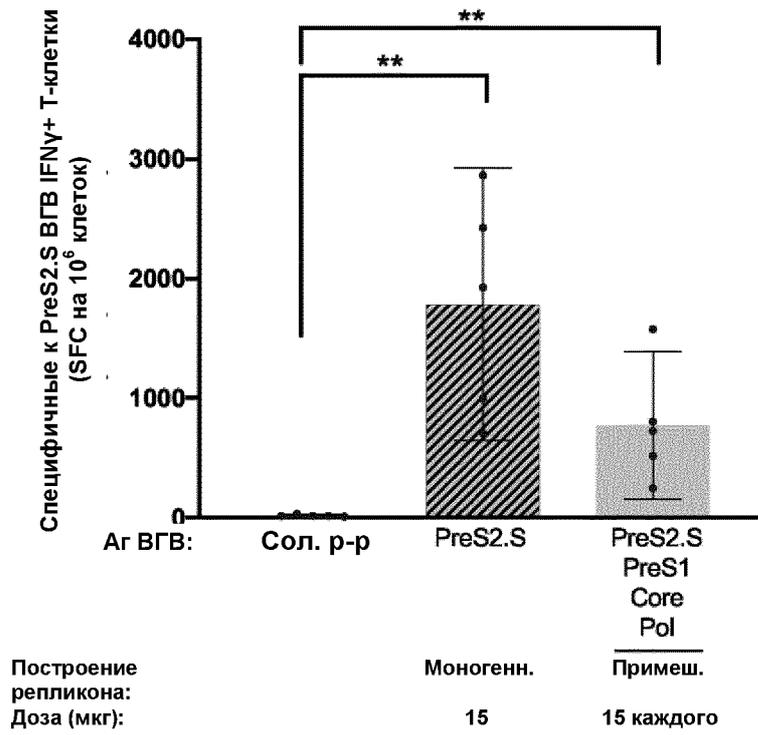
ФИГ. 3 (продолжение)



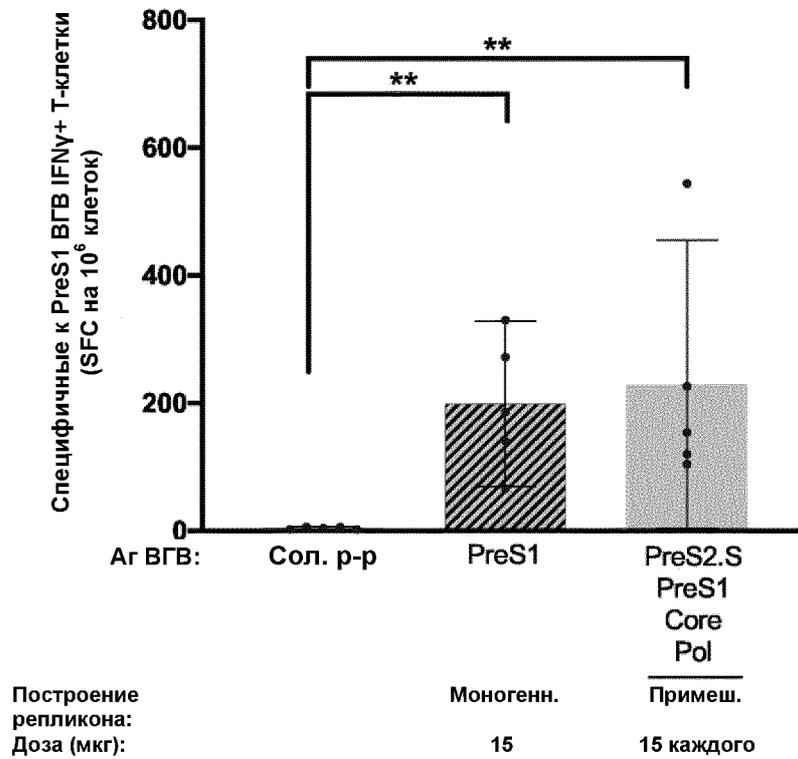
ФИГ. 4А



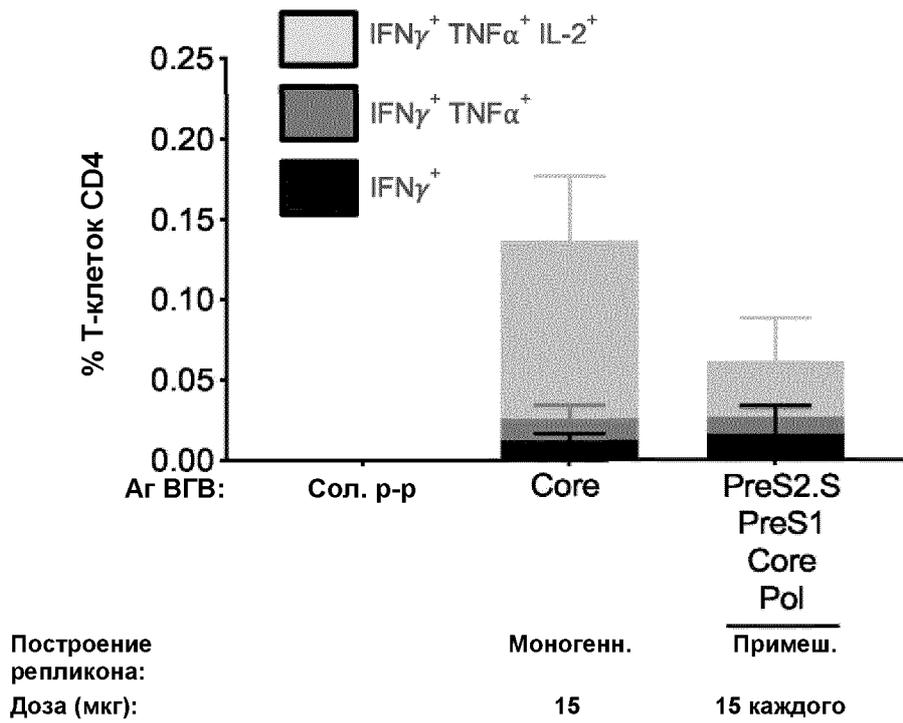
ФИГ. 4В



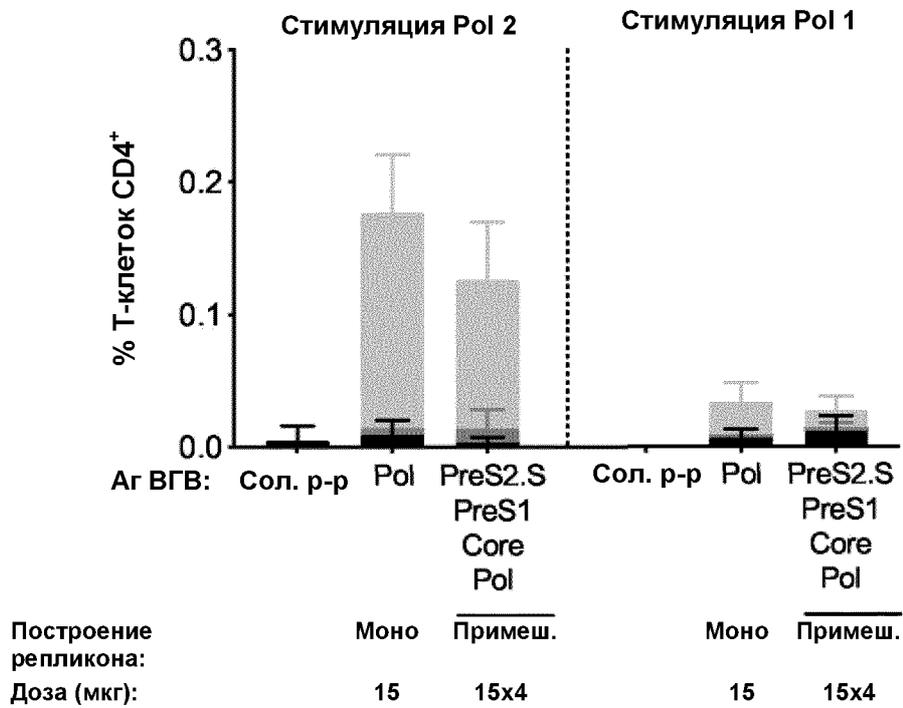
ФИГ. 4С



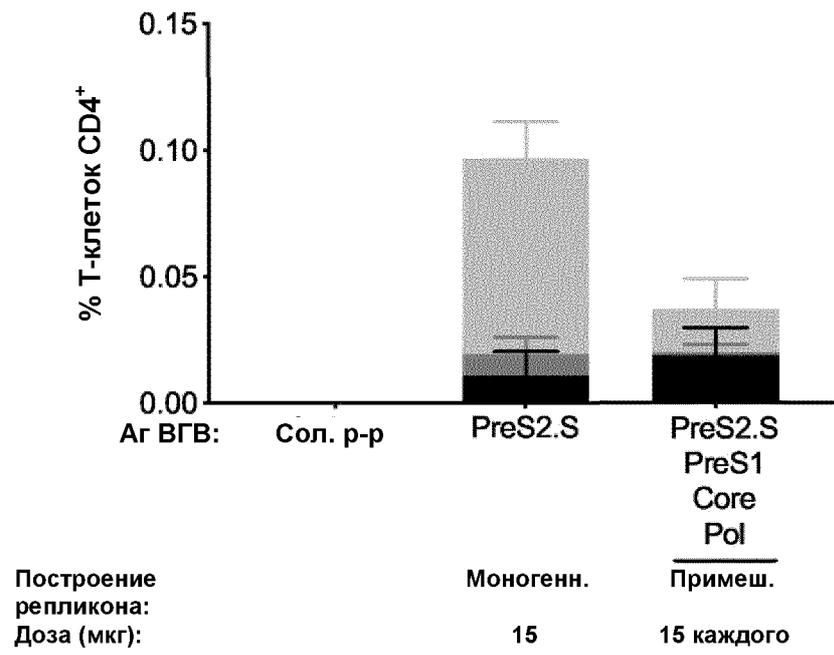
ФИГ. 4D



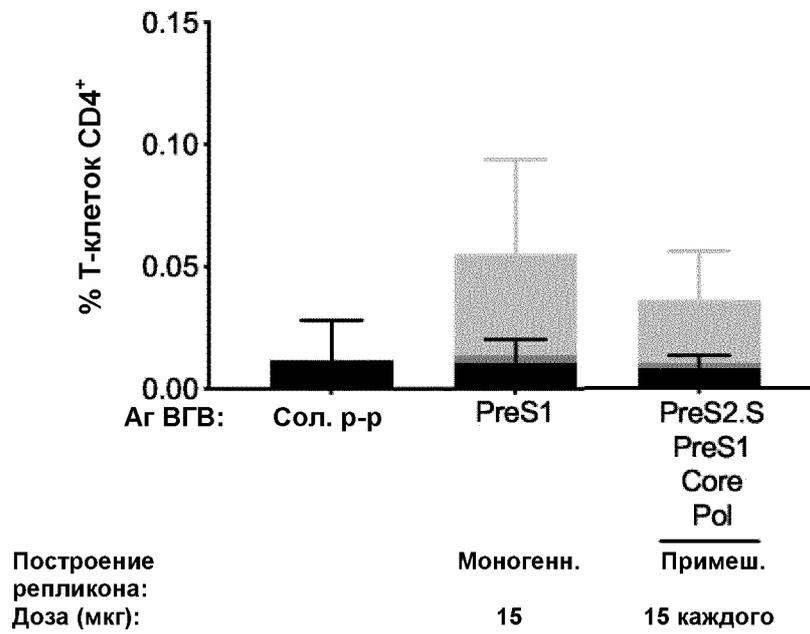
ФИГ. 5А



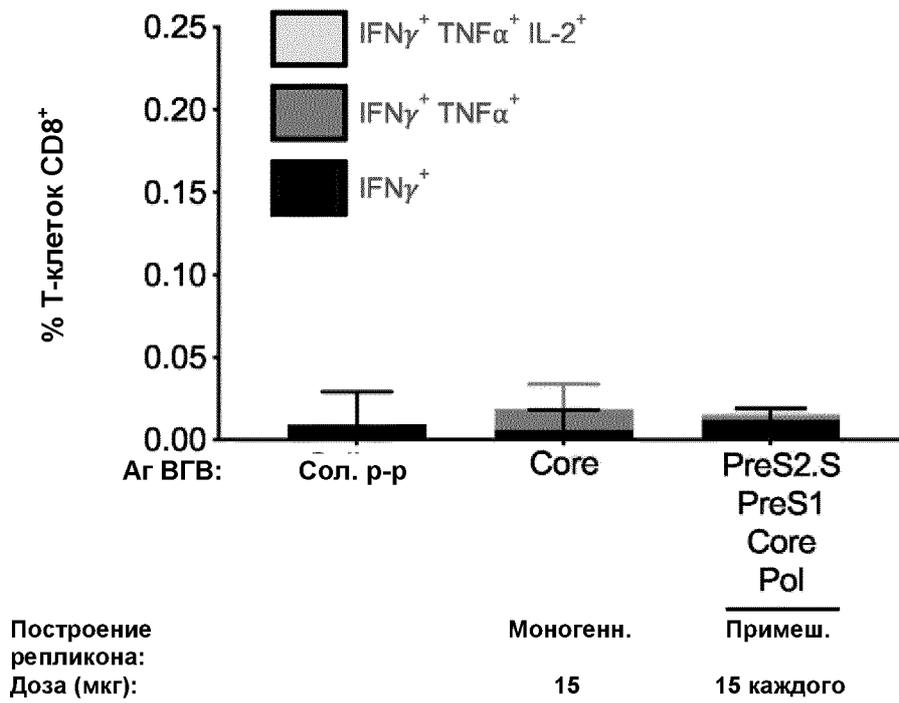
ФИГ. 5В



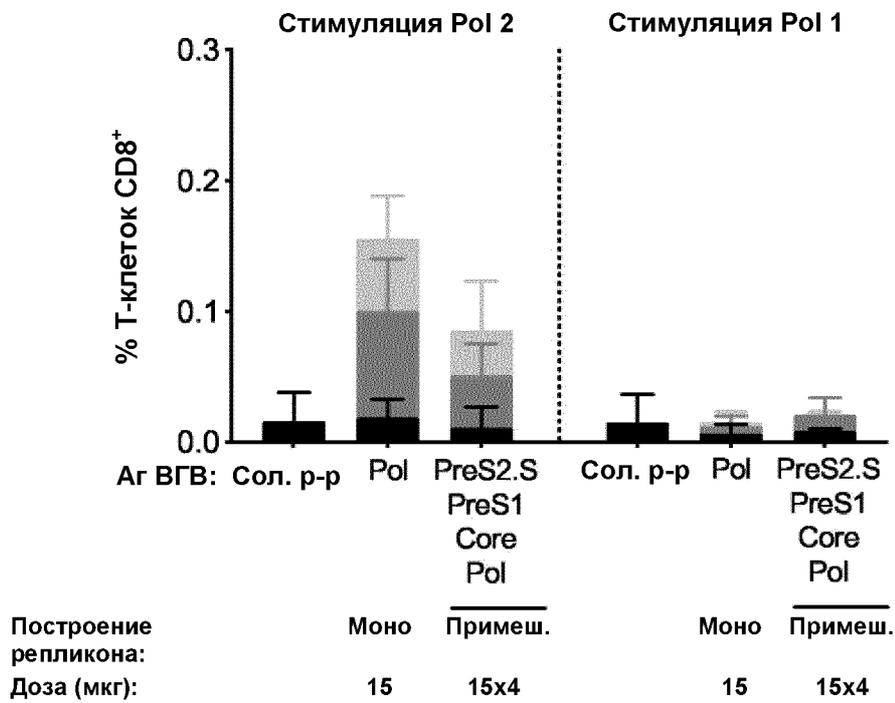
ФИГ. 5С



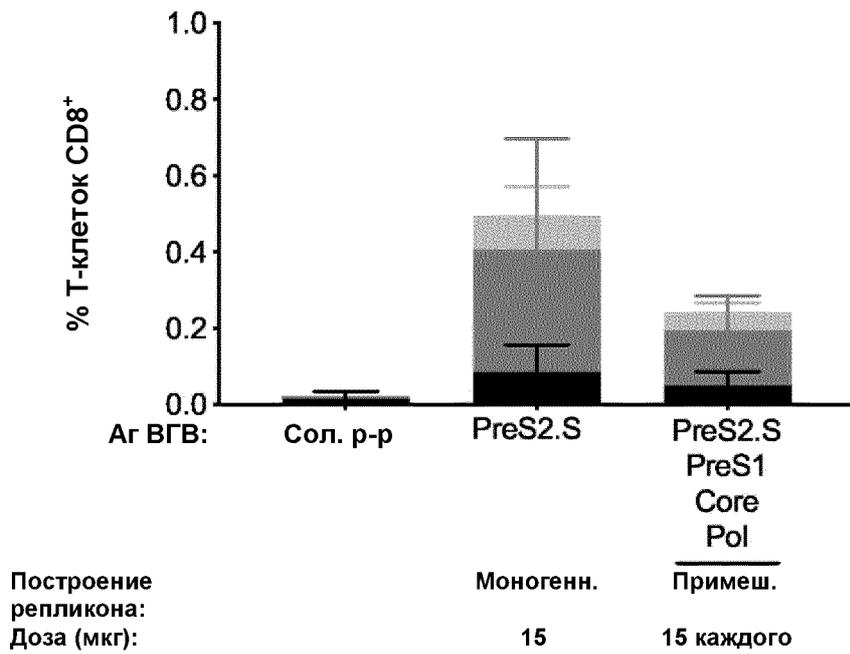
ФИГ. 5D



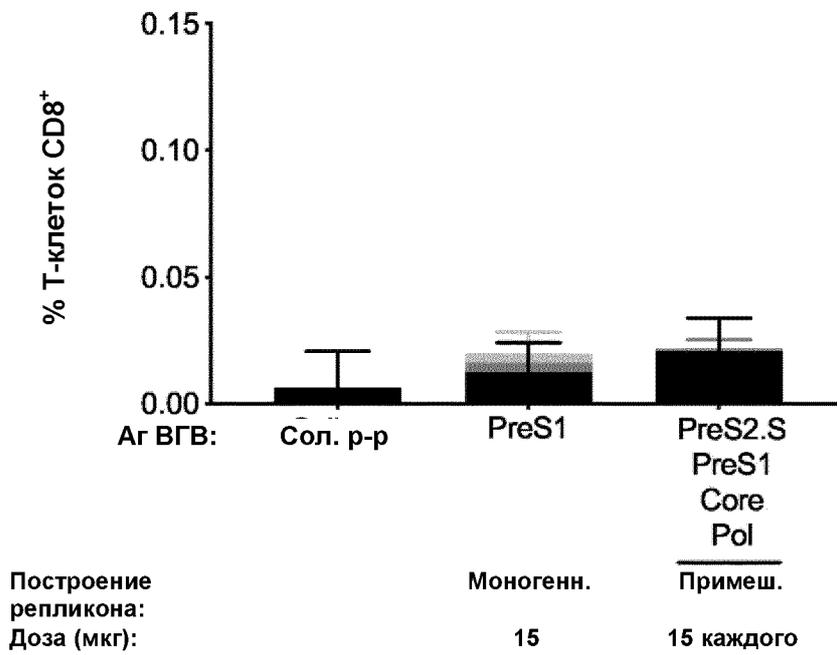
ФИГ. 5Е



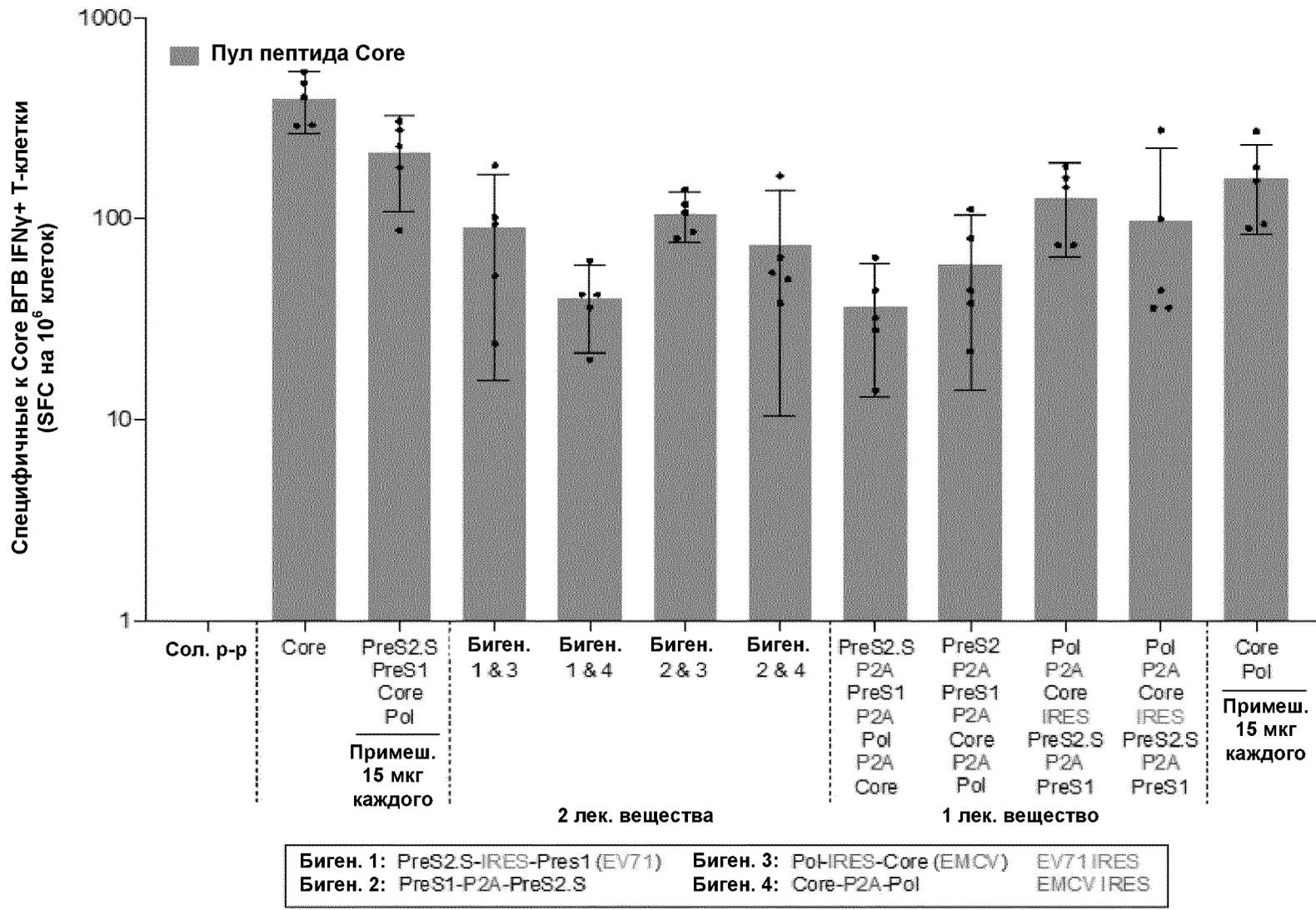
ФИГ. 5F



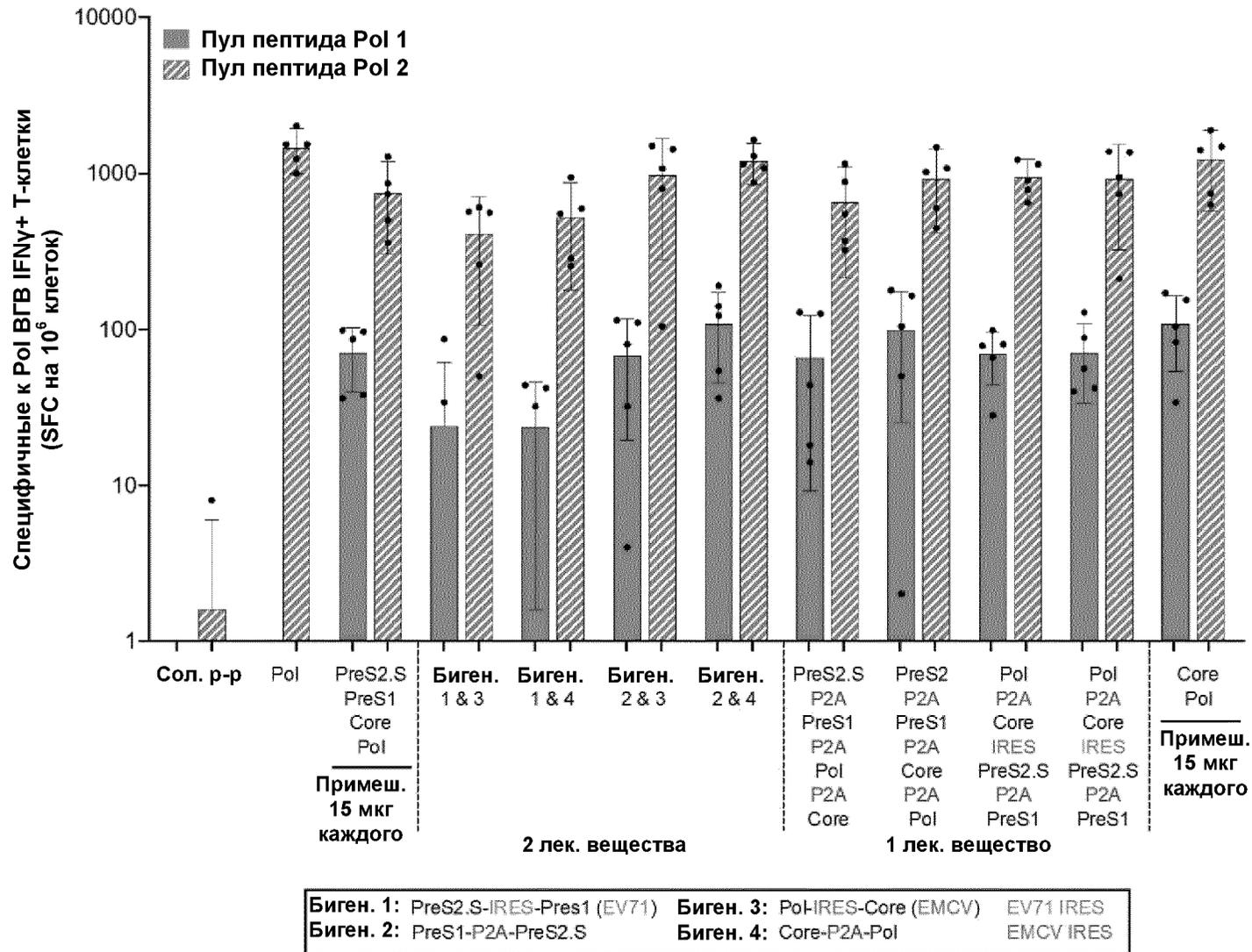
ФИГ. 5G



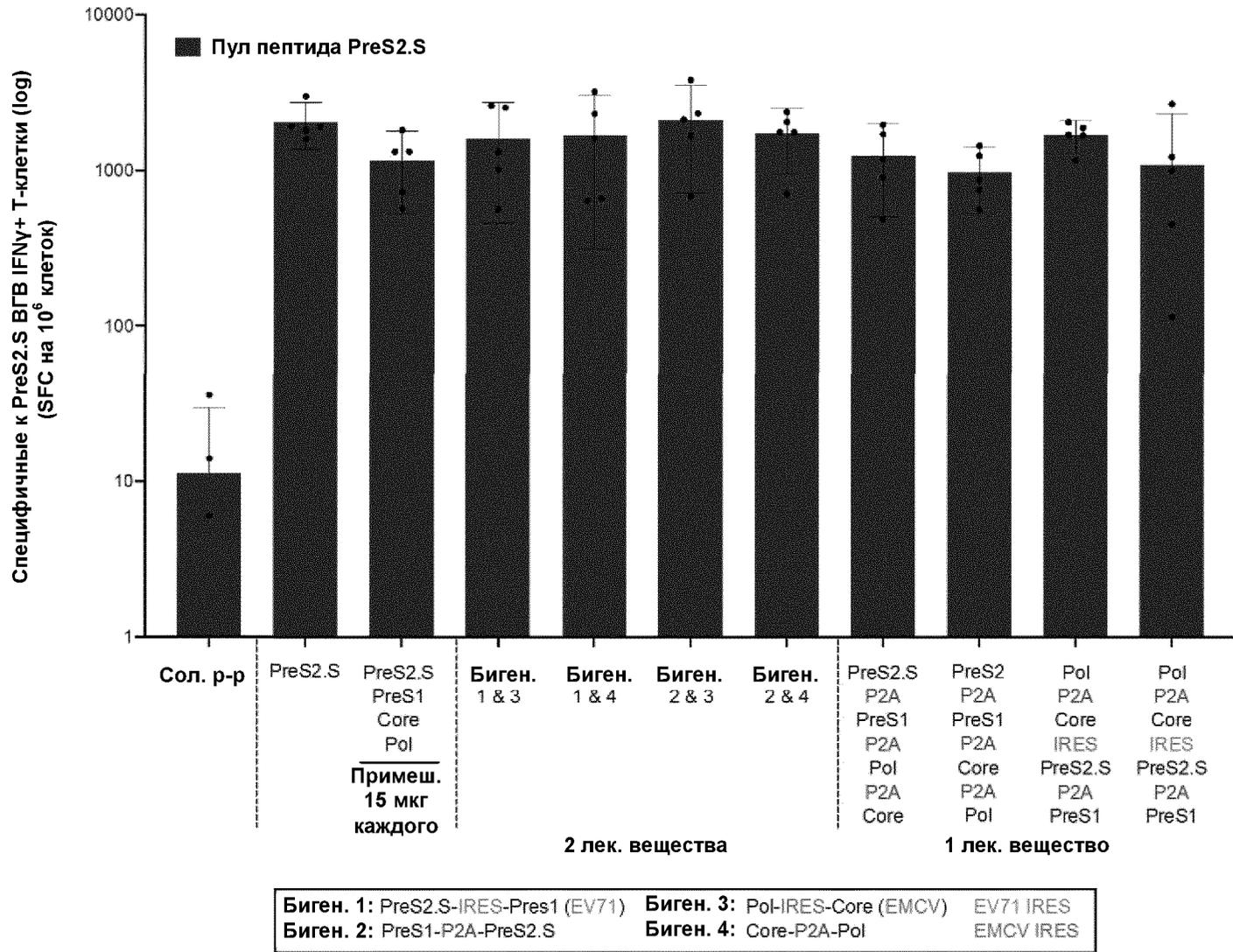
ФИГ. 5H



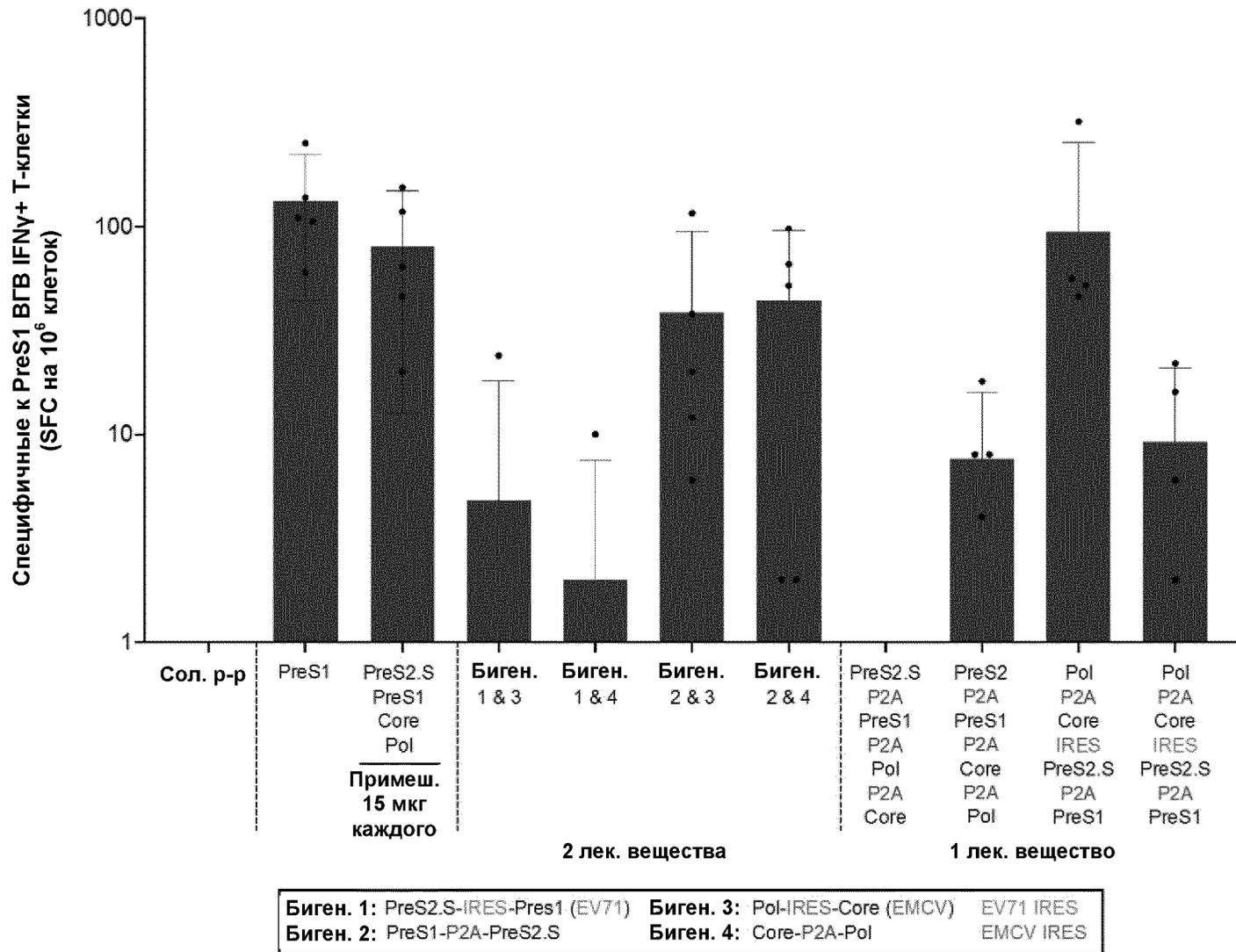
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

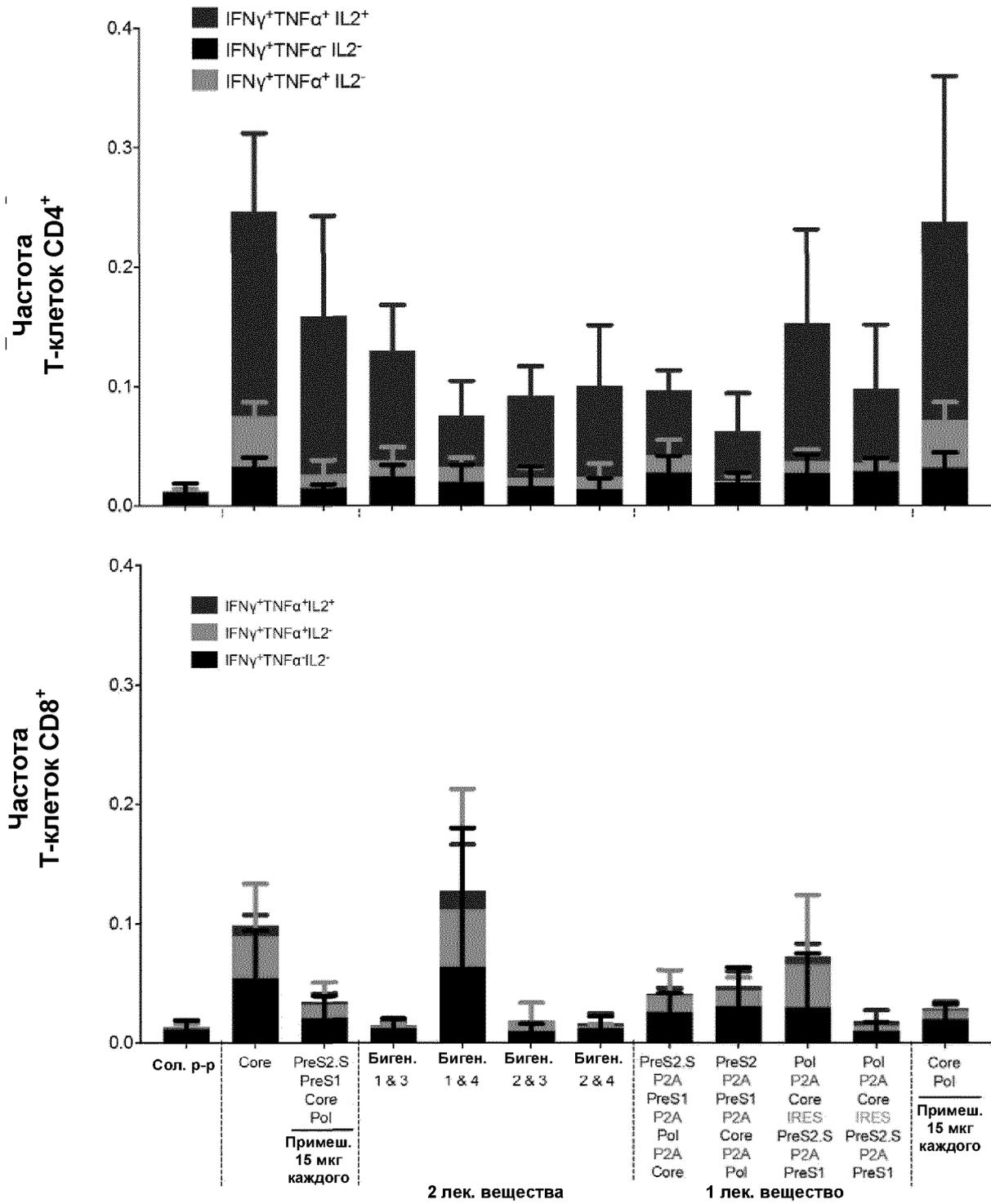


ФИГ. 6С



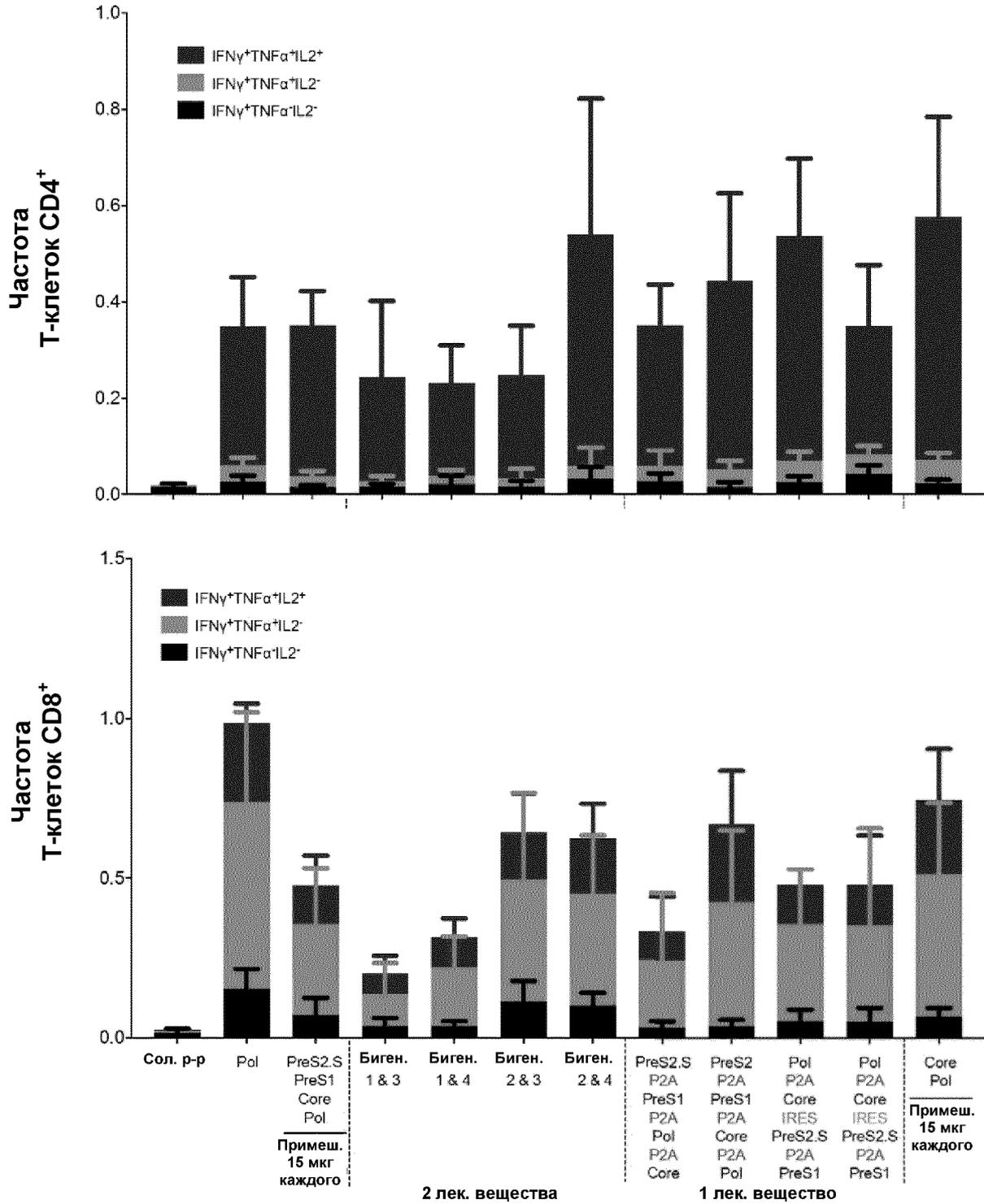
ФИГ. 6D

Core ВГВ



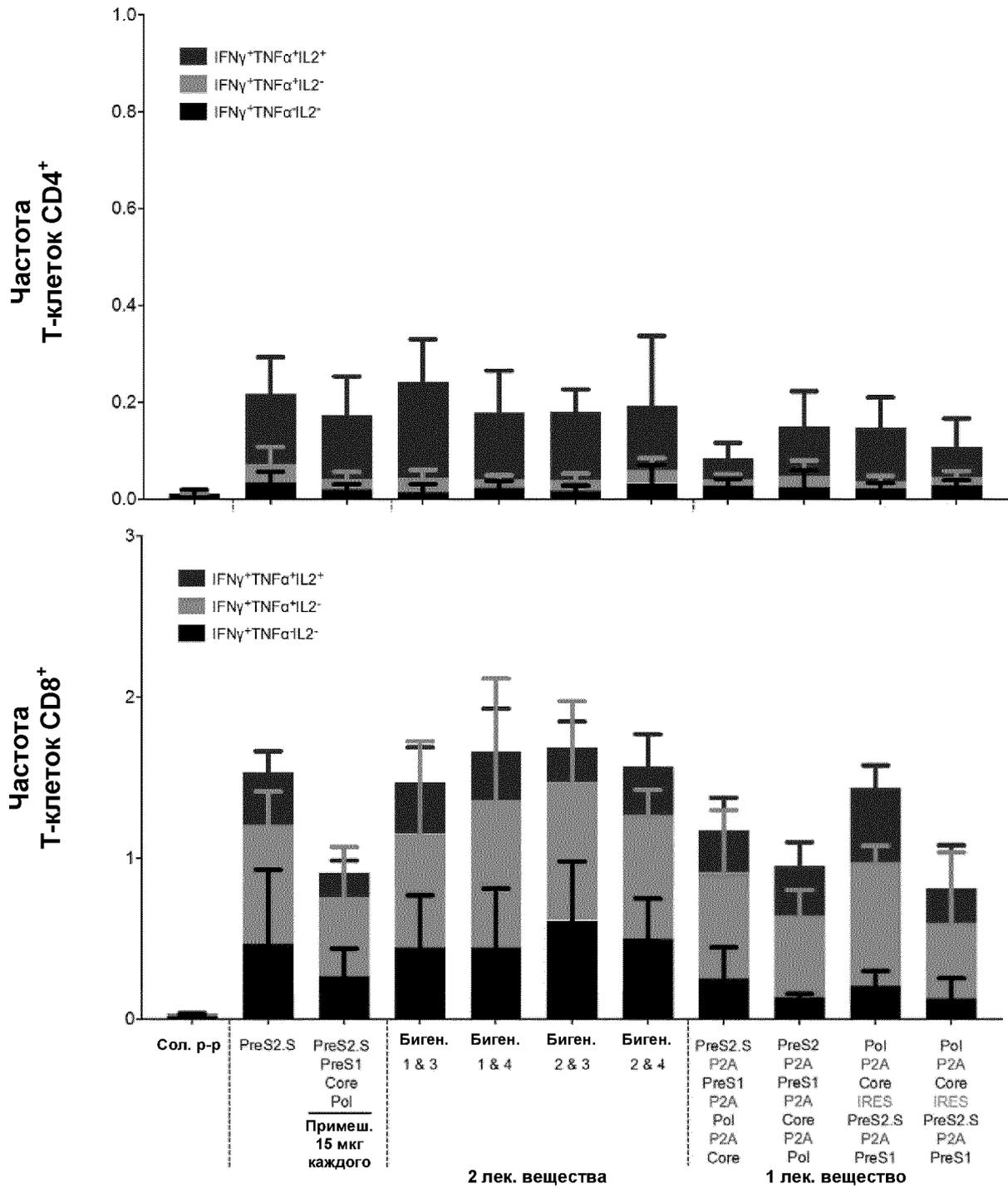
ФИГ. 7А

Pol ВГВ



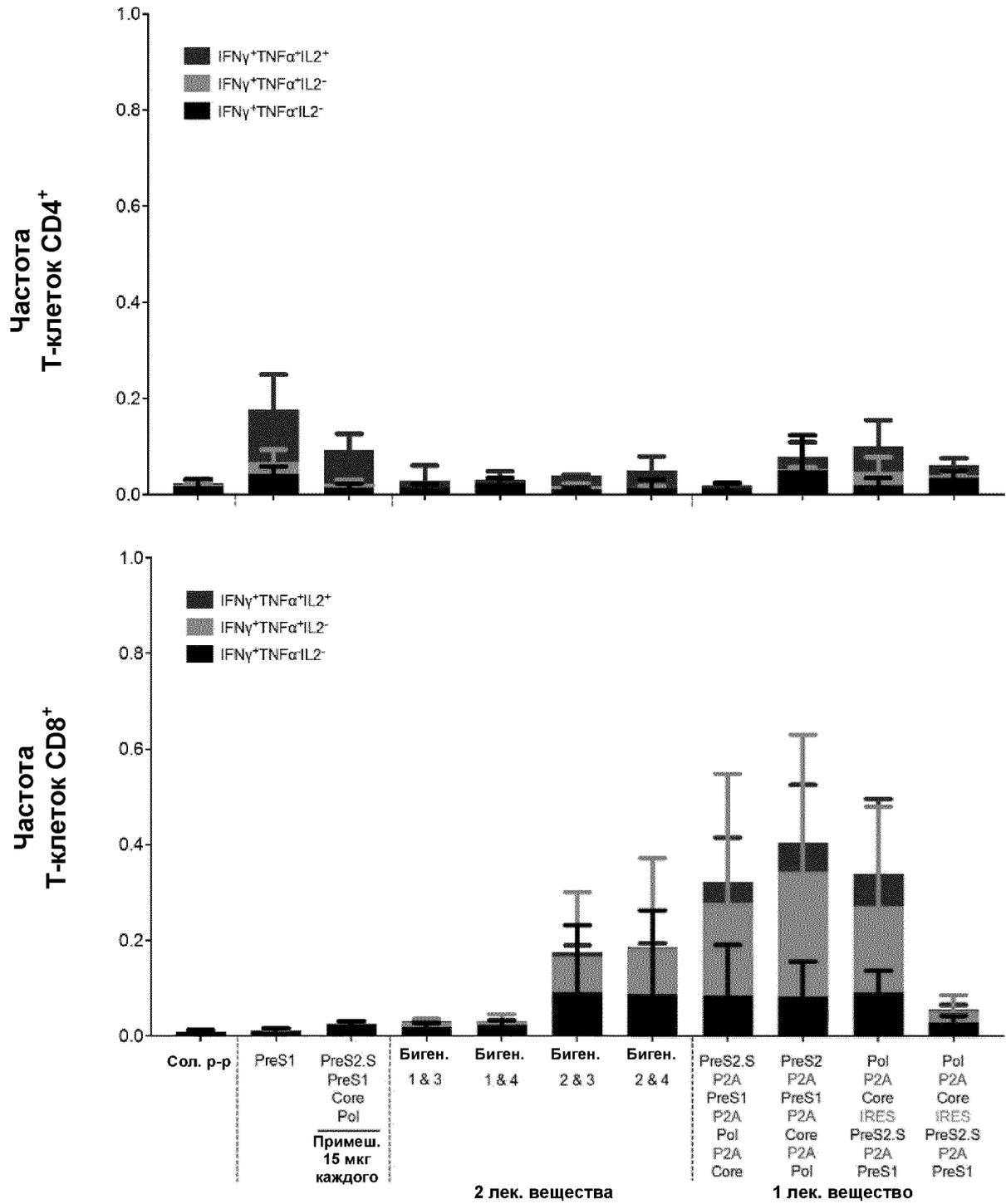
ФИГ. 7В

PreS2.S ВГВ



ФИГ. 7С

PreS1 ВГВ



ФИГ. 7D