

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201590597** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.11.30

(22) Дата подачи заявки
2013.09.19

(51) Int. Cl. *A61K 39/29* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) КОРОВЬЙ БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ПОВЕРХНОСТНЫЙ АНТИГЕННЫЙ БЕЛОК И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ ВАКЦИНА

(31) 13/622,965

(32) 2012.09.19

(33) US

(86) PCT/US2013/060618

(87) WO 2014/047286 2014.03.27

(71) Заявитель:
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:
**Уэйнер Дэвид Б., Янь Цзянь, Обенг-
Аджей Ниямекие (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящей заявке предлагаются последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие коровье белки вируса гепатита В (HBV), поверхностные антигенные белки, их фрагменты и комбинации, а также генетические конструкторы/векторы и вакцины, которые экспрессируют указанные белковые последовательности. Эти вакцины способны индуцировать иммунный ответ периферически и в печени с помощью набора клеточных и гуморальных агентов. В настоящей заявке предлагаются также способы профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидуумов против HBV. Комбинированная вакцина также может быть использована для разработки индивидуальных вакцин для отдельных уровней иммунных ответов на заражение HBV.

A1

201590597

201590597

A1

КОРОВЫЙ БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ПОВЕРХНОСТНЫЙ АНТИГЕННЫЙ БЕЛОК И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ ВАКЦИНА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим коровые белки вируса гепатита В (HBV) поверхностные антигенные белки, их фрагменты и комбинации, к коровым белкам вируса гепатита В (HBV) , поверхностным антигенным белкам, их фрагментам и комбинациям, к улучшенным HBV-вакцинам, к улучшенным способам индукции иммунного ответа на HBV и к улучшенным способам профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидуумов против HBV.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Гепатит В является общей инфекцией, распространенной по всему земному шару, которая приводит к развитию цирроза, печеночной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциноме. Значительное число случаев гепатита не сообщается из-за бессимптомного характера заболевания. Тем не менее, сообщается об около 350 миллионов хронических случаев гепатита В каждый год. Большая часть зараженного гепатитом населения находится в слаборазвитых и развивающихся странах.

[0003] Вирус подразделяется на четыре основных серотипа (adr, adw, ayr, ayw), исходя из антигенных эпитопов, присутствующих на его белковых оболочках. Имеется по меньшей мере восемь генотипов (А-Н) вируса гепатита согласно изменениям геномных последовательностей. Альтернативные генотипы HBV имеют превалирующее географическое распределение.

[0004] В Таблице 1 показано географическое распределение генотипов HBV.

Таблица 1. Географическое распределение генотипов HBV

<i>HBV</i> генотип	<i>HBV</i> геноподтип	<i>HBsAg</i> подтип	Частота	Основное географическое распределение
A	A2	adw2	высокая	Европа, Северная Америка, Австралия
	A1	ayw1, adw2	высокая	Африка
B	B1 B2, B3	adw2	высокая	Дальний Восток
	B4	ayw1	высокая	Дальний Восток
	B2	adw3	низкая	Дальний Восток
C	C1, C2, C4	Adr	высокая	Дальний Восток
	C3	adrq-	высокая	Новая Гвинея, Тихоокеанский регион
	C1, C2	Ayr	высокая	Дальний Восток
	C1, C3	adw2	низкая	Дальний Восток
	C4	ayw3	низкая	Дальний Восток, Тихоокеанский регион
D	D1, D3, D4	ayw2	высокая	Западная Азия, Восточная Европа, Средиземноморье
	D2, D3	ayw3	высокая	По всему миру
	Not identified	adw3	низкая	Восточная Европа, Испания
	D2	ayw4	низкая	Восточная Европа, Испания, США
E	-	ayw4	высокая	Африка
F	F1, F2	adw4q-	высокая	Латинская Америка, Аляска, Тихоокеанский регион
	F1, F2	ayw4	низкая	Латинская Америка
G	-	adw2	низкая	Европа, Северная Америка
H	-	ayw4	низкая	Центральная Америка

J. Med. Virol, DOI 10.1002jmv

[0005] Геном HBV представляет собой круговую молекулу ДНК, в основном двухцепочечную, но имеет одноцепочечную область, вытекающую из одной нити, более длинной, чем другая. Двухцепочечная область возникает из-за гибридизации короткой цепи, составляющей приблизительно 3020 нуклеотидов, с более длительной цепью, составляющей приблизительно 3320 нуклеотидов. Одноцепочечной область на не-гибридизированных нуклеотидах более длинной цепи связана с ДНК-полимеразой HBV. Геномная ДНК HBV и ДНК-полимераза HBV обе содержатся в нуклеокапсиде, образованном множеством молекул корового белка HBV (HBsAg). Коровый белок HBV окутан HBV-поверхностным белком или антигеном (HBsAg) и липидными молекулами.

[0006] ГГеном HBV содержит четыре открытые рамки считывания (ORF), которые кодируют семь различных белков: 1) ORF, которая кодирует ДНК-полимеразу HBV, 2) ORF,

которая имеет два стартовых кодона, причем последовательность, присоединенная к второму стартовому кодону, кодирует коровый белок, а последовательность, которая содержит дополнительный апстрим стартовый кодон, кодирует последовательность, названную пре-С; 3) ORF, которая имеет три стартовых кодона, причем один кодирует поверхностный белок (S белок; gp27), один включает апстрим стартовый кодон, который кодирует последовательность, названную пре-S2 (gp36), а другой, который включает дополнительный апстрим стартовый кодон, который кодирует последовательность, названную пре-S1 (GP42); и 4) ORF, которая кодирует HBxAg, белок, функция которого менее понятна (Фигура 1). Эти белки включают 3 поверхностных белка или антигена (HBsAg): preS1, preS2 и основной S.

[0007] Характеристики HBsAgs проиллюстрированы на Фигуре 2. Эпитопы HBsAgs, участвующие в экспрессии подтипов специфичности, расположены в области, которая включает две внешние петли молекул поверхностного антигена HBV (т.е., аминокислоты 110-180 из S-белка) и являются тем, что, что делает штаммы HBV антигенно разнообразными. Эта же область содержит неизвестное количество эпитопов, которые определяют "какую-то" детерминанту HBsAg, которая является общей для всех известных штаммов HBV дикого типа.

[0008] Профилактические вакцины и методы лечения HBV-инфекции включают введение субвирусных частиц, выделенных из плазмы хронических носителей, или субвирусных частиц, продуцируемых в виде рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных эукариотических клеточных линиях. Субвирусные частицы представляют собой вирусные белки и такие вакцины часто называют субъединичными вакцинами. Белки HBV вводят индивидууму и они становятся мишенями для иммунной системы индивидуума. У неинфицированных индивидуумов иммунный ответ на субъединичную вакцину защищает неинфицированного индивидуума от HBV-инфекции. У инфицированных индивидуумов, иммунный ответ, индуцированный вакциной, может иметь терапевтический эффект.

[0009] CChisari F.V., Am J Pathol., 2000. 156:1117-1132 и Pumpeus P. et al. Intervirology 2001. 44:98-114 раскрывают геномную организацию HBV. Deny P. и F. Zoulim, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4):245 53 обсудили диагностику и лечение вируса гепатита В. Michel M.L. и P. Tiollais, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4):288 95 обсуждают вакцины гепатита В и их защитную эффективность и терапевтический потенциал. Публикация РСТ WO2004026899 раскрывает использование иммуногена, содержащего полипептидную последовательность с аминокислотной последовательностью HBV. Опубликованная заявка РСТ WO2008093976 раскрывает HBV-кодирующие последовательности, белки и вакцины,

включая вакцину, содержащую рекомбинантный полноразмерный поверхностный антиген HBV и коровый антиген HBV. Полноразмерный поверхностный антиген HBV состоит из трех типов поверхностного белка (L белка, М белка и S белка). Опубликованная заявка РСТ WO2009130588 раскрывает HBV-кодирующие последовательности, белки и вакцины, включая нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В, который оптимизирован по кодонам для экспрессии в организме человека. Публикация РСТ WO2010127115 раскрывает доставку последовательностей HBV с использованием рекомбинантных векторов.

[0010] Доступные вакцины HBV демонстрируют некоторую эффективность, но являются дорогостоящими в производстве. Кроме того, полученные из плазмы субъединичные вакцины также сомнительны относительно безопасности. Несколько вакцинных подходов были изучены, в том числе на основе рекомбинантных живых векторов, синтетических пептидов и ДНК-вакцин, которые содержат кодон-оптимизированные кодирующие последовательности белков HBV. Эти и другие подходы до сих пор были ограничены различной эффективностью. Кроме того, из-за геномных различий некоторые вакцины HBV демонстрировали положительную эффективность в некоторых географических районах и ограниченную эффективность в других регионах.

[0011] Имеющиеся в настоящее время вакцины на основе HBsAg, полученные из дрожжей, трансфецированных ДНК, кодирующей S-белок (например, ENGERIX-B, доступная от SmithKline Biologicals, находящейся в Бельгии, и RECOMBIVAX/HB-VAX II, доступная от Merck & Co., находящейся в США) не вызывают реакцию у приблизительно 5 %-10 % пациентов (C. Belloni, Immunogenicity of hepatitis B vaccine in term and preterm infants. *Acta Paediatrica*, 1998. 87: p. 336-338). Кроме того, уровень отсутствия ответа увеличивается до 30 % у пожилых лиц и иммунитет против HBV может снизиться через несколько лет после вакцинации. Также для достижения полной защиты используются многократные дозы. Безопасность представляет проблему с основанной на HBsAg вакциной ENGERIX-B поскольку ENGERIX-B увеличивает риск воспалительной демиелинизации центральной нервной системы (ЦНС) в три раза.

[0012] Остальные HBsAg-вакцины, полученные из клеток млекопитающих, используют пре-S1 и пре-S2 в дополнение к S-белку. Антигены пре-S1 и пре-S2 экспрессируют высокоиммуногенные Т и В-клеточные эпитопы и одна такая вакцина вызывает иммунную реакцию у приблизительно 80 % неответающих или слабо отвечающих индивидуумов (Rendi-Wagner, P. et al., Comparative immunogenicity of PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine. *Vaccine*, 2006. 24: p. 2781-9.).

[0013] Было изучено прямое введение последовательностей нуклеиновых кислот для вакцинации против заболеваний животных и человека и много усилий было сосредоточено на эффективных и действенных средствах доставки нуклеиновой кислоты с целью получения необходимой экспрессии желательных антигенов, приводящих к иммунному ответу, и, в конечном счете, к успеху этого способа.

[0014] Д ДНК-вакцины делают возможным эндогенный антигенный синтез, который индуцирует CD8 + гистосовместимый комплекс, цитотоксические Т-лимфоциты, рестриктированные I классом комплекса гистосовместимости, которые редко получают с субъединичными вакцинами. Кроме того, антигенный синтез, который происходит в течение длительного периода, может помочь преодолеть низкую чувствительность и устранить или уменьшить потребность в бустер-инъекциях. Кроме того, ДНК-вакцины, по всей видимости, очень стабильны и просты в изготовлении.

[0015] ДНК-вакцины являются безопасными, стабильными, легко получаемыми и хорошо переносятся пациентами в доклинических испытаниях, указывая на отсутствие признаков интеграции плазмиды [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 772: p. 30-9]. Кроме того, ДНК-вакцины хорошо подходят для повторного введения в связи с тем, что эффективность вакцины не зависит от уже существующих титров антител к вектору [Chattergoon, M., J. Boyer, and D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997. 11(10): p. 753-63]. Однако, одни из основных препятствий для клинического принятия ДНК-вакцин было снижение иммуногенности при переходе на более крупных животных [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40].

[0016] Последние технологические достижения в проектировании ДНК-вакцинного иммуногена улучшили экспрессию и иммуногенность ДНК-вакцин, такие как кодонная оптимизация, РНК-оптимизации и добавление иммуноглобулиновых лидерных последовательностей [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], а также, в последнее время

разработаны технологии систем доставки плазмид, такие как электропорация [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and *in vivo* electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. *In vivo* технология электропорации была использована в клинических испытаниях на людях для доставки противораковых препаратов, таких как блеомицин, и во многих доклинических исследований на большом числе видов животных. Кроме того, исследования показали, что использование консенсусных иммуногенов может увеличить широту клеточного иммунного ответа по сравнению с только нативными антигенами [Yan, J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14].

[0017] ААнтитела и цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ) к различным антигенам HBV могут принимать участие в снижении вирусной нагрузки и очистки HBV-инфицированных клеток из печени. Основная задача для современных вакцин-кандидатов состоит в индукции как гуморального, так и клеточного иммунитета к множественным HBV-антигенам-мишеням и против основных генотипов HBV. По этой причине сохраняется потребность в конструктах нуклеиновых кислот, которые кодируют белок HBV, и композициях, пригодных для индукции иммунного ответа против HBV. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах против HBV, которые экономичны и эффективны. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах, которые увеличивают нейтрализующие титры антител и вовлекают компонент Т-клеток. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах против HBV, в том числе тех, которые эффективны против штаммов HBV, имеющих широкий спектр генотипов, и предпочтительно, в универсальной вакцине, которая будет глобально эффективной.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0018] Настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей: (а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6; (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ

ID NO:10, SEQ ID NO:14, белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14; и (с) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16. Молекулы нуклеиновых кислот могут содержать одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:15.

[0019] Настоящее изобретение также может быть направлено на вакцину, содержащую (а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6; (b) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14; и (с) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16.

[0020] Вакцина может быть плазмидой, содержащей нуклеиновые кислоты, описанные выше. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть включены в вирусные частицы. Вакцина может дополнительно содержать адъювантную молекулу. Адъювантом может быть IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 или их комбинация; и в некоторых вариантах реализации изобретения IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

[0021] Настоящее изобретение также относится к способу индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающему введение вакцины согласно настоящему изобретению субъекту.

[0022] Настоящее изобретение также относится к способу защиты субъекта от HBV-инфекции, включающему введение вакцины согласно настоящему изобретению субъекту.

[0023] Настоящее изобретение дополнительно относится к способу защиты субъекта, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающему введение вакцины согласно настоящему изобретению субъекту.

[0024] Настоящее изобретение дополнительно включает вакцины, полезные для индукции иммунного ответа против HBV. Разработка HBV- иммунной терапевтической вакцины с широкой эффективностью против множества генотипов может быть обеспечена с помощью терапевтической ДНК-вакцины HBV, основанной на направленном воздействии на универсально консервативные короспецифические антигены HBV. Использование консенсусных HBV-иммуногенов индуцирует более широкие клеточный иммунный ответы и может быть полезно, чтобы свести к минимуму степень несходства последовательностей между различными штаммами вируса.

[0025] В настоящей заявке предлагаются белки, выбранные из группы, состоящей из: белков, содержащих SEQ ID NO:2, белков, которые на 95 % идентичны по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2; фрагментов SEQ ID NO:2; белков, которые на 95 % идентичны фрагментам SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, белков, которые на 95 % идентичны по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4; фрагментов SEQ ID NO:4; белков, которые на 95 % идентичны фрагментам SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6, белков, которые на 95 % идентичны по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6; фрагментов SEQ ID NO:6; и белков, которые на 95 % идентичны фрагментам SEQ ID NO:6.

[0026]

В настоящей заявке предлагается белок, выбранный из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO:2; (b) белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2; (c) иммуногенного фрагмента SEQ ID NO:2, содержащего 20 или более аминокислот SEQ ID NO:2; и (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, содержащего 20 или более аминокислот.

[0027] Молекулы нуклеиновых кислот, содержащие последовательности, которые кодируют одну или несколько молекул белка, указанных выше, также предоставляются. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1;

последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1; фрагмента SEQ ID NO:1; последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична фрагменту SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; фрагмента SEQ ID NO:3; последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична фрагменту SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5; фрагмента SEQ ID NO:5; и последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 95 % идентична фрагменту SEQ ID NO:5.

[0028] Некоторые аспекты изобретения предлагают способы индуцирования иммунной реакции HBV, включающие этап введения индивидууму молекул корового антигена HBV и/или поверхностного антигена HBV и/или композиций.

[0029] Дополнительные аспекты изобретения предлагают способы защиты индивидуума против HBV-инфекции. Способы включают этап введения указанному индивидууму профилактически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей такую последовательность нуклеиновой кислоты, или композиций, где последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется в клетках указанного индивидуума и защитная иммунная реакция индуцируется против белка, кодируемого указанной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0030] В некоторых аспектах изобретения предлагаются способы для лечения индивидуума, инфицированного HBV. Способ включает этап введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества таких молекул нуклеиновых кислот и/или композиций.

[0031] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: (a) белка, содержащего SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16; (b) белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16; (c) иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот; и (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот.

[0032] Молекула нуклеиновой кислоты может содержать одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: (a) последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15; (b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 98 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15; (c) их фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот, кодируемых последовательностью SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15; и (d) их фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности белка, кодируемого последовательностью SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15. Молекула нуклеиновой кислоты может быть плазмидой. Молекула нуклеиновой кислоты может быть вектором экспрессии, и последовательности, кодирующие указанный один или более белков, функционально связаны с регуляторными элементами. Молекула нуклеиновой кислоты может быть инкорпорированной в вирусную частицу.

[0033] Некоторые аспекты изобретения предлагают способ индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению субъекту.

[0034] Некоторые аспекты изобретения предлагают способ защиты субъекта от HBV-инфекции, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению субъекту.

[0035] Некоторые аспекты изобретения предлагают способ защиты субъекта, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению субъекту.

[0036] В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает белок, выбранный из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16; (b) белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16; (c) иммуногенного фрагмента последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, содержащего 20 или более аминокислот; и (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, содержащего 20 или более аминокислот.

[0037] Некоторые аспекты изобретения предлагают вакцину, полезную для генерации иммунного ответа против HBV у субъекта, содержащую: молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, и адъювантную молекулу. Адъювантом может быть IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), $TNF\alpha$, $TNF\beta$, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 или их комбинация; и в некоторых вариантах реализации изобретения – IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0038] Фигура 1 представляет собой карту, показывающую организацию генома HBV, который состоит из четырех перекрывающихся ORF.

[0039] Фигура 2 иллюстрирует организацию и особенности поверхностных антигенов HBV.

[0040] Фигура 3 иллюстрирует IgELS и эндопротеолитический сайт расщепления в консенсусном поверхностном антигене HBV.

[0041] Фигура 4 иллюстрирует длинный консенсусный поверхностный антиген HBV (LHBs) и небольшой консенсусный поверхностный антиген HBV (SHBs).

[0042] Фигура 5 представляет собой карту вектора pGX1801 HepB – Mcore (SEQ ID NO:17).

[0043] Фигура 6 представляет собой карту вектора pGX1802 HepB pLHBs-A (SEQ ID NO:18).

[0044] Фигура 7 представляет собой карту вектора pGX1803 HepB pLHBs-C (SEQ ID NO:19).

[0045] Фигура 8 представляет собой карту вектора pGX1804 HepB pSHBs-A (SEQ ID NO:20).

[0046] Фигура 9 представляет собой карту вектора pGX1805 HepB SHBs-C (SEQ ID NO:21).

[0047] Фигура 10 иллюстрирует филогенетический анализ консенсусной последовательности HBsAg по сравнению с индивидуальными генотипами A, B, C, D и E.

[0048] Фигуры 11A и 11B демонстрируют результаты экспериментов по поводу экспрессии рМ Core. Фигура 11A показывает результаты *in vitro* трансляционного протокола. Фигура 11B показывает результаты вестерн-блоттинга.

[0049] Фигура 12 представляет собой график, иллюстрирующий плазмидную карту и последовательность рМCore.

[0050] Фигура 13 показывает реакцию транскрипции/трансляции с использованием плазмиды pMCore, в которой полученный М-коровый белок иммуно-осаждался с анти-НА моноклональным антителом и был разогнан в геле SDS-PAGE.

[0051] Фигура 14 показывает обнаружение М-корового белка во временно трансфицированных клетках с использованием первичного моноклонального НА маркерного антитела с последующим обнаружением DyLight 594-меченным противокроличьим вторичным антителом. Hoechst-окраску также использовали для флуоресцентного мечения клеточного ядра. Экспрессия MCore по большей части локализовалась в цитоплазме, как показано окрашиванием вне ядра.

[0052] Фигура 15 иллюстрирует схему иммунизации. 4 мышей иммунизировали внутримышечно 30 мкг pMCore.

[0053] Фигура 16 показывает увеличенную амплитуду секреции IFN- γ в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0054] Фигура 17 показывает увеличенную амплитуду секреции IFN- γ в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0055] Фигура 18 показывает увеличенную амплитуду секреции TNF- α в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0056] Фигура 19 показывает увеличенную амплитуду секреции TNF- α в CD8+ и CD4+ Т-клетках из из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0057] Фигура 20 показывает увеличенную амплитуду секреции CD 107a в CD8+ и CD4+ Т-клетках из из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0058] Фигура 21 показывает увеличенную амплитуду секреции f CD 107a в CD8+ и CD4+ Т-клетках из из селезенок мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0059] Фигура 22 показывает средний процент HBsAg-специфических CD4 или CD8 IFN- γ^+ , TNF- α^+ секретирующих клеток от мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore.

[0060] Фигура 23 показывает средний процент HBsAg-специфических CD4 или CD8 дважды положительно продуцирующих клеток от мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore.

[0061] Фигура 24 показывает интерферон-гамма Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0062] Фигура 25 показывает интерферон-гамма Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0063] Фигура 26 показывает фактора- α некроза опухоли Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0064] Фигура 27 показывает фактора- α некроза опухоли Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core.

[0065] Фигура 28 показывает процент HBsAg-специфических CD4 и CD8 IFN- γ^+ , TNF- α^+ продуцирующих клеток в печени мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore.

[0066] Фигура 29 показывает средний процент HBsAg-специфических CD4 или CD8 дважды положительных продуцирующих клеток в печени мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore.

[0067] Фигура 30 показывает спленоциты, продуцирующие антиген-специфическое антитело. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно *t*-тесту Стьюдента.

[0068] Фигура 31 показывает данные анализа ELISPOT.

[0069] Фигура 32 показывает частоту HBsAg-специфических IFN- γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов после стимуляции клеток селезенки иммунизированных мышей.

[0070] Фигура 33 показывает данные экспериментов с использованием CFSE-меченных клеток для сравнения элиминации пептида обработанных клеток-мишеней *in vivo* с помощью CD8 Т-клеток у вакцинированных и невакцинированных животных.

[0071] Фигура 34 показывает *in vivo* специфический киллинг. Две группы мышей, иммунизированных pVax (контроль) или pMCore, получали CFSE-меченные клетки-мишени (CFSE^{hi} пульсировали с иррелевантным пептидом или CFSE^{hi} пульсировали с эпитоп-специфическим пептидом) через хвостовую вену. CFSE-меченные клетки, восстановленные и проанализированные с помощью FACS, использовали для определения процента киллинга.

[0072] Фигура 35 показывает сравнение процента пролиферации CD3+CD4+ клеток и CD3+CD8+, обработанных вектором pVax (контроль) или плазмидой pMCore, которая экспрессирует HBV М-кор.

[0073] Фигура 36 показывает процент пролиферации CD4 и CD8 Т-клеток.

[0074] Фигуры 37А и 37В показывают сравнение анти-HBV кора IgG и IgA в серийном разведении сыворотки от животных, обработанных вектором pVax (контроль) или плазмидой pMCore, которая экспрессирует HBV М-кор.

[0075] Фигура 38 показывает HBsAg-специфический гуморальный иммунный ответ, вызванный pMCore, в сыворотке и спленоцитах. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно *t*-тесту Стьюдента.

[0076] Фигура 39 показывает HBcAg-специфический гуморальный иммунный ответ, вызванный рMCore, в сыворотке и спленоцитах. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно *t*-тесту Стьюдента.

[0077] Фигура 40 показывает процент TNF- α и IFN- γ из CD4+ и CD8+ клеток селезенки и печени.

[0078] Фигура 41 показывает данные экспериментов по определению того, воздействует ли клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, на печень, путем измерения уровней ALT в сыворотке.

[0079] Фигура 42 показывает иммунное окрашивание отделов печени, взятых через три дня после гидродинамической инъекции PBS, рMCore (HBcAg) или рNS3/4A (HCV NS3-4A) от наивных мышей и мышей, которые были иммунизированы рMcore. Клиренс очень высокий для рMCore-иммунизированной печени по сравнению с NS3/4a-трансфектированной контрольной печенью. Экспрессию PMcore или NS3/4A обнаруживали с помощью антитела к HA (белые/светло-серые клетки).

[0080] Фигура 43 показывает 3 дня после трансфекции, в которые клетки анализировали по поводу экспрессии маркера дегрануляции, экспрессии CD107a и IFN- γ после стимуляции пептидами HBcAg.

[0081] Фигура 44 показывает уровни ALT в сыворотке в день 3, 6 и 12 после трансфекции, уровни были измерены и не доказали повышения у релевантных вакцинированных животных.

[0082] Фигура 45 показывает общие клеточные иммунные ответы у обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., рMCore, рSHb A и рSHb C), длинной (т.е., рMCore, рLHb A и рLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., рMCore, рLHb A, рLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0083] Фигура 46 показывает короспецифические клеточные иммунные ответы у обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., рMCore, рSHb A и рSHb C), длинной (т.е., рMCore, рLHb A и рLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., рMCore, рLHb A, рLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0084] Фигура 47 показывает клеточные иммунные ответы, специфические к поверхностному антигену A, у обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., рMCore, рSHb A и рSHb C), длинной (т.е., рMCore, рLHb A и рLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., рMCore, рLHb A, рLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0085] Фигура 48 показывает данные анализа ELISPOT клеточных иммунных ответов, специфических к поверхностному антигену C, у обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., рMCore, рSHb A и рSHb C), длинной (т.е., рMCore, рLHb A и рLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., рMCore, рLHb A, рLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0086] Фигура 49 показывает общие клеточные иммунные ответы у обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., pMCore, pSHb A и pSHb C), длинной (т.е., pMCore, pLHb A и pLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., pMCore, pLHb A, pLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0087] Фигура 50 показывает сравнение анти-HBV антител в серийном разведении сыворотки от обезьян, иммунизированных небольшой (т.е., pMCore, pSHb A и pSHb C), длинной (т.е., pMCore, pLHb A и pLHb C) и длинной+IL-12 (т.е., pMCore, pLHb A, pLHb C и prlIL-12) вакцинами.

[0088] Фигура 51 показывает сравнение анти-HBV антител в серийном разведении сыворотки от животных, иммунизированных длинной+IL-12 (т.е., pMcore, pLHb A, pLHb C и prlIL-12) вакциной.

[0089] Фигура 52 показывает ДНК-конструкт поверхностного антигена HBV и его экспрессию. (A) Филогенетический анализ консенсусных последовательностей HBs генотипов A и C по сравнению с природным HBs. Консенсусные последовательности обозначены звездочками. (B) Схематическая диаграмма генных вставок HBs в ДНК-плазмиды. pLHBs и pSHBs представляют большие и небольшие белковые антигены HBs. Белки preS1, preS2 и основной S присоединены к сайтам эндопротеолитического расщепления. (C) Выявление pLHBs и pSHBs с помощью внутриклеточного окрашивания трансфектированных клеток RD моноклональным антителом и поликлональной мышинной сывороткой.

[0090] Фигура 53 показывает, что pLHBs и SHBs вызывают мощные антителопродуцирующий и Т-клеточные ответы у BALB/c. По пять мышей линии Balb/c на группу иммунизировали в трех различных экспериментах и проанализировали их по поводу индукции как гуморального, так и клеточного ответа. (A) HBs-специфические IgG реакции, измеренные через одну неделю после каждой иммунизации. Стрелка указывает время иммунизации. (B) Общие IFN- γ реакции, вызванные каждым конструктом к синтетическим preS1/S2 и основному S пептидам. (C) Характеристика HBs-специфических иммуногенных детерминант с помощью использования отдельных пептидов HBs в 16 и 12-матричных пулах LHBs и SHBs соответственно. Это показывает повышенную ширину клеточно-опосредованного иммунного ответа.

[0091] Фигура 54 показывает *in vivo* специфический киллинг. Различные группы мышей, иммунизированные либо pVax (контроль), или любым из четырех конструктов HBs, получили CFSE-меченные клетки-мишени (CFSE^{lo}, пульсирующие с иррелевантным пептидом, или CFSE^{hi}, пульсирующие с эпитоп-специфическим пептидом) через хвостовую вену. CFSE-меченные клетки извлекали и анализ с помощью FACS

(флуоресцентно-активированный клеточный сортинг) использовали для количественной оценки процента киллинга.

[0092] Фигура 55 показывает, что вакцинный коктейль HBs/HBs вызывает устойчивые иммунные реакции. (A) HBs-специфические реакции антител из сывороток от мышей, иммунизированных вакцинным коктейлем HBs/HBs в различные моменты времени иммунизации (стрелка). (B) IFN- γ ответы после *ex vivo* стимуляции спленоцитов от мышей, иммунизированных коктейлем HBs/HBs. Иммунизированные мыши отвечали как на коровые, так и поверхностные антигенные пептиды.

[0093] Фигура 56 показывает, что антиген-специфические CD8 T-клетки индуцируют противовирусные цитокины. Внутриклеточное окрашивание анти-вирусных цитокинов после *ex-vivo* стимуляции спленоцитов от мышей BALB/c из различных иммунизированных групп (Таблица 3). Лимфоциты окрашивали антителами к CD3, CD4, CD8, IFN- γ , TNF- α , IL-2 и CD107a. Эти данные представлены 4 мышами из каждой группы в 3 различных экспериментах.

[0094] Фигура 57 показывает иммуногенность у нечеловекообразных приматов. Пять макаков-резусов иммунизировали внутримышечно pSHBs/pMCore, pLHBs/pMCore или pLHBs/pMCore + pIL-12 (Таблица 4), а затем с помощью электропорации. Обезьяны получили три прививки. (A) Высокие титры антител к HBs наблюдались только после 2 прививки. (B) Ответы IFN- γ измеряли один раз перед первой иммунизацией и через 2 недели после каждой иммунизации. (C) Многие положительные HBs матричные пептидные пулы наблюдались у большинства обезьян из разных групп, подтверждая широкие T-клеточные ответы у иммунизированных макаков. (D) Внутриклеточное окрашивание (IFN- γ , TNF- α , ИЛ-2) PBMCs после последней иммунизации показывает продуцирование HBs и HBs-специфических антивирусных цитокинов как в CD4, так и в CD8.

[0095] Фигуры 58A-58D показывают безопасность терапевтической HBV-вакцины у макаков-резусов. Образцы анализировали до вакцинации (pre), после третьей вакцинации (3rd), перед четвертой вакцинацией (pre4th), после четвертой вакцинации (4th). Была ошибка анализа на щелочную фосфатазу после третьей вакцинации. Нормальный диапазон для всех измерений изображен пунктирными линиями. (A) Сывороточная щелочная фосфатаза. (B) Уровни сывороточной аланинаминотрансферазы (ALT). (C) Уровни сывороточной аспартатаминотрансферазы (AST). (D) Уровни общего билирубина в сыворотке. (E) Уровни сывороточного креатинина. (F) сывороточные уровни азота мочевины крови.

[0096] Фигуры 59A-59D показывают аннотацию последовательностей для четырех плазмид HBs. Последовательности лидера IgE, эндопротеолитического сайта расщепления

и С-концевой НА-метки подчеркнуты. Четыре HBs плазмиды: большой поверхностный белок генотипа А (pLHBs-A) (А) и небольшой поверхностный белок (pSHBs-A) (В) и большой поверхностный белок генотипа С (pLHBs-C) (С), и небольшой поверхностный белок (pSHBs-C) (D).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0097] Настоящее изобретение относится к высокооптимизированным поливалентным синтетическим иммуногенам вируса гепатита В (HBV), которые вызывают продукцию антител и клеточно-опосредованный иммунитет против HBV-поверхностных (HBs) и HBV-коровых (HBc) антигенов. Эти плазмиды, которые кодируют наиболее распространенные генотипы вируса, индуцируют связывающие антитела к HBs-антигенам и возбуждают надежный клеточный иммунитет (СМІ) к обоим HBc и HBs антигенам. Плазмиды независимо вызвали широкие кросс-реактивные Т-клеточные ответы и ответы с высоким титром антител, а также вакциноиндуцированную цитотоксическую активность. Плазмидные коктейли, содержащие оба поверхностных антигена, индуцируют сильный и широкий клеточный иммунный ответ по нескольким антигенным эпитопам, в частности, широкую перекрестную реактивность между генотипами А и С вируса. Оптимизированные плазмидные коктейли, кодирующие антигены HBs и HBc, индуцировали сильный гуморальный и клеточный ответ, нацеленный на S-антиген, и повлекли различные мультиэпитопные реакции, связанные с очисткой инфицированных гепатоцитов.

[0098] В частности, настоящее изобретение относится к вакцинам для вируса гепатита В (HBV), которые могут быть использованы для защиты человека от HBV-инфекции и обеспечить терапевтические преимущества индивидууму с диагнозом HBV-инфекции. Такие вакцины также могут быть использованы для индукции иммунного ответа против антигена HBV. HBV-вакцины согласно настоящему изобретению содержат одну или несколько молекул нуклеиновых кислот. В частности, молекула нуклеиновой кислоты кодирует один или несколько консенсусных коровых белков HBV. Консенсусные коровые белки HBV получают из последовательностей коровых белков генотипов А, В, С, D и Е HBV, и, следовательно, консенсусные коровые белки HBV являются уникальными. Молекулы нуклеиновых кислот могут также кодировать один или более иммуногенных фрагментов консенсусных коровых белков HBV.

[0099] Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать один или более консенсусных поверхностных антигенов HBV. Консенсусные поверхностные антигены HBV получают из последовательностей поверхностных антигенов из изолятов генотипа А HBV, и, следовательно, консенсусные поверхностные антигены HBV являются

уникальными. Консенсусные поверхностные антигены HBV также могут быть получены из последовательностей поверхностных антигенов из изолятов генотипа С HBV, давая уникальные поверхностные антигены HBV. Молекулы нуклеиновой кислоты могут также кодировать один или более иммуногенных фрагментов консенсусных поверхностных антигенов HBV.

[00100] Вакцина согласно настоящему изобретению может включать любую комбинацию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих консенсусный коровый белок HBV, и/или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих консенсусный поверхностный антиген HBV. Вакцина также может включать любую комбинацию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих иммуногенные фрагменты консенсусного корового белка HBV, и/или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих иммуногенные фрагменты консенсусного поверхностного антигена HBV.

[00101] Эти комбинации корового белка HBV и поверхностного антигена HBV удивительно и неожиданно индуцируют дифференциальный иммунный ответ на коровый белок HBV и поверхностный антиген HBV. Другими словами, сила иммунного ответа на коровый белок HBV и поверхностный антиген HBV отличается в зависимости от конкретной комбинации, вводимой субъекту. Соответственно, любой пользователь вакцины согласно настоящему изобретению может создать вакцину, которая содержит определенную комбинацию, чтобы вызвать желаемый иммунный ответ у субъекта, которому вводят такую разработанную вакцину. Таким образом, любой пользователь может адаптировать вакцину согласно настоящему изобретению, чтобы контролировать уровень иммунного ответа у субъекта.

[00102] Вакцина согласно настоящему изобретению широко применяется для различных типов HBV благодаря уникальным последовательностям консенсусного корового белка HBV и поверхностного антигена HBV.

[00103] Вакцина согласно настоящему изобретению может дополнительно включать одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, как описано выше, и один или несколько белков, кодируемых такой молекулой нуклеиновой кислоты.

1. Определения

[00104] Терминология, использованная в настоящем документе с целью описания конкретных вариантов осуществления, не предназначена для ограничения. Как используется в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[00105] Для чтения числовых диапазонов в данном документе каждое промежуточное число между ними с той же степенью точности явно предусмотрено. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 рассматриваются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0, числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, и 7,0 явно предусмотрены.

[00106] «Адъювант», как используется в данном документе, означает любую молекулу, добавленную к ДНК-плазмидным вакцинам, описанным в настоящем документе, для повышения иммуногенности антигенов, кодируемых ДНК-плазмидами и кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе ниже.

[00107] "Антитело", как используется в данном документе, означает антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или фрагменты, или их фрагменты или производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифические антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из сыворотки образца млекопитающего, поликлональное антитело, аффинно-очищенное антитело или их смеси, которые обладают достаточной специфичностью связывания с нужным эпитопом или последовательностью, полученной из него.

[00108] "Кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота", как используется в данном документе, означает нуклеиновые кислоты (РНК или ДНК-молекула), которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодирующая последовательность может дополнительно включать сигналы инициации и терминации, функционально связанный с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках человека или млекопитающих, которым вводят нуклеиновую кислоту.

[00109] "Комплемент" или "комплементарный", как используется в данном документе, означает нуклеиновую кислоту, может означать спаривание оснований Уотсона-Крика (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстена между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

[00110] "Консенсус" или "консенсусная последовательность", как используется в данном документе, означает полипептидную последовательность, основанную на анализе выравнивания нескольких подтипов конкретного HBV-антигена, такого как коровый или поверхностный антиген HBV. Могут быть получены последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусную полипептидную последовательности. Вакцины, содержащие белки, которые содержат консенсусные последовательности и/или молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют такие белки, могут быть использованы для

индуцирования иммунитета против широкого множества подтипов или серотипов конкретного антигена HBV.

[00111] "Электропорация", "электро-пермеабилзация" или "электро-кинетический энхансмент" ("ЕР"), как используется в данном документе взаимозаменяемо, означает использование импульса трансмембранного электрического поля, чтобы вызвать микроскопические пути (поры) в биомембранах; их присутствие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, мРНК, лекарства, ионы и вода, пройти с одной стороны клеточной мембраны на другую.

[00112] "Фрагмент", как используется в данном документе относительно последовательности нуклеиновой кислоты, означает последовательность нуклеиновой кислоты, или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, которые перекрестно реагируют с полноразмерным антигеном штамма HBV дикого типа. Фрагменты могут быть фрагментами ДНК, выбранными из по меньшей мере одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют белковые фрагменты, описанные ниже.

[00113] "Фрагмент" или "иммуногенный фрагмент" относительно полипептидных последовательностей означает полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с полноразмерным антигеном штамма HBV дикого типа. Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 50 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % консенсусного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 20 аминокислот или более по меньшей мере 30 аминокислот или более, по меньшей мере 40 аминокислот или более по меньшей мере 50 аминокислот или более по меньшей мере 60 аминокислот или более по меньшей мере 70 аминокислот или более по меньшей мере 80 аминокислот или более по меньшей мере 90 аминокислот или более по меньшей мере 100 аминокислот или более по меньшей мере 110 аминокислот или более по меньшей мере 120 аминокислот или более по меньшей мере 130 аминокислот или более по меньшей мере 140 аминокислот или более по меньшей мере 150 аминокислот или более по меньшей мере 160 аминокислот или более по меньшей мере 170 аминокислот или более по меньшей мере 180 аминокислот или более по меньшей мере 190 аминокислот или более по меньшей мере 200 аминокислот или более по меньшей мере 210 аминокислот или более по меньшей мере 220 аминокислот или более по меньшей мере 230 аминокислот или более, или по меньшей мере 240 аминокислот или более консенсусного белка.

[00114] Как используется в данном документе, термин "генетический конструкт" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодирующая последовательность включает сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума, которому молекулу нуклеиновой кислоты вводят. Как используется в данном документе, термин "экспрессирующая форма" относится к генным конструктам, содержащим необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок, таким образом, что когда они присутствуют в клетке индивидуума, кодирующая последовательность будет экспрессироваться.

[00115] Термин "гомология", как используется в данном документе, относится к степени комплементарности. Может быть частичная гомология или полная гомология (т.е., идентичность). Частично комплементарная последовательность, которая по меньшей мере частично ингибирует полностью комплементарную последовательность из гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, называют с помощью функционального термина "по существу гомологичными". При использовании касательно последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты, такой как кДНК или геномный клон, термин "по существу гомологичные", как используется в данном документе, относится к зонду, который может гибридизироваться с цепью последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости. При использовании касательно последовательности одноцепочечной нуклеиновой кислоты термин "по существу гомологичные", как используется в данном документе, относится к зонду, который может гибридизироваться с (т.е., является компонентом) матричной последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости.

[00116] "Идентичные" или "идентичность", как используется в данном документе в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, означает, что последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются такими же в пределах определенной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения числа положений, в которых идентичные остатки присутствуют в обеих последовательностях с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее количество положений в указанной области, и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В тех случаях, когда эти две последовательности

имеют разную длину или выравнивание производит один или несколько расположенных в шахматном порядке концов и определенная область сравнения включает только одну последовательность, остатки одной последовательности включены в знаменатель, но не числитель расчета. При сравнении ДНК и РНК, тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентичность может быть выполнена вручную или с помощью компьютерного алгоритма последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

[00117] "Иммунный ответ", как используется в данном документе, означает активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение антигена, такого как консенсусный антиген HBV. Иммунный ответ может быть в виде клеточного или гуморального ответа, или того и другого.

[00118] "Нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид" или "полинуклеотид", как используется в данном документе означает, по меньшей мере по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота включает также комплементарную цепь описанной одной цепи. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы с той же целью как и данная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота включает также по сути идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементы. Одна цепь обеспечивает зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

[00119] Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, или могут содержать участки как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномные, так и кДНК, РНК или гибрид, в котором нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин гипоксантин, изоцитозина и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены методами химического синтеза или рекомбинантными способами.

[00120] Термин "функционально связанный", как используется в данном документе, означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор можно расположить в положении 5' (апстрим) или 3' (даунстрим) гена под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть примерно таким же, как расстояние между указанным промотором и геном, который он контролирует, в гене, из которого промотор получен. Как известно в данной области

техники, изменение этого расстояния может обеспечиваться без потери функции промотора.

[00121] "Промотор", как используется в данном документе, означает синтетическую или природно-полученную молекулу, которая способна придавать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может включать одну или более конкретных последовательностей, регулирующих транскрипцию, чтобы дополнительно усилить экспрессию и/или изменить пространственную экспрессию и/или временную экспрессию нуклеиновой кислоты. Промотор может также содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут размещаться на расстоянии до несколько тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусные, бактериальные, грибковые, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно, либо дифференцированно по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия или по отношению к стадии развития, при которой происходит экспрессия, либо в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогенные микроорганизмы, ионы металлов или индуцирующие агенты. Репрезентативные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, промотор lac-оператора, tac-промотор, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

[00122] "Сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может связываться с амино-концом белка HBV, указанного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, как правило, направляют локализацию белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, используемые в настоящем описании, предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой он произведен. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляется от остальной части белка, часто упоминаемого как зрелый белок, при секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности присоединяются к N-концу белка.

[00123] "Жесткие условия гибридизации", как используется в данном документе, означают условия, при которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) гибридизирует со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), такой как в сложной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в разных обстоятельствах. Жесткие условия могут быть выбраны, чтобы составлять приблизительно на 5-10 °C ниже, чем точка

плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH. T_m может быть температурой (при определенных ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50 % зондов, комплементарных мишени, гибридизируют с последовательностью-мишенью в равновесии (так как последовательности-мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50 % зондов заняты в равновесии). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее чем приблизительно 1,0 М иона натрия, например, приблизительно 0,01-1,0 М концентрация иона натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет, по меньшей мере по меньшей мере приблизительно 30 °C для коротких зондов (например, приблизительно 10-50 нуклеотидов) и, по меньшей мере по меньшей мере приблизительно 60 °C для длинных зондов (например, более чем приблизительно 50 нуклеотидов). Жесткие условия могут быть также достигнуты при добавлении дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации, положительный сигнал может составлять, по меньшей мере по меньшей мере от 2 до 10 раз фоновой гибридизации. Примеры жестких условий гибридизации включают следующее: 50 % формамид, 5-кратный SSC и 1 % SDS, инкубация при 42 °C, или, 5x SSC, 1 % SDS, инкубация при 65 °C, с промывкой в $0,2 \times$ SSC и 0,1 % SDS при 65 °C.

[00124] "Практически комплементарные", как используется в данном документе, означает, что первая последовательность, по меньшей мере по меньшей мере на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична комплементу второй последовательности по области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизируют в жестких условиях гибридизации.

[00125] "Практически идентичные", как используется в данном документе, означает, что первая последовательность, по меньшей мере по меньшей мере на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична по области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 или более нуклеотидов или аминокислот или относительно к нуклеиновым кислотам, если первая последовательность, по существу, дополняет состав второй последовательности.

[00126] "Подтип" или "серотип": как используется в данном документе, взаимозаменяемы, и относительно HBV означает генетические варианты HBV, так что один подтип распознается иммунной системой отдельно от другого подтипа.

[00127] "Вариант", используемый здесь в связи с нуклеиновой кислотой, означает (I) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (II) комплемент указанной нуклеотидной последовательности или ее части; (III) нуклеиновую кислоту, которая по существу идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (IV) нуклеиновую кислоту, которая гибридизирует в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом, или последовательности, по существу, идентичные ей.

[00128] "Вариант" относительно пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативным замещением аминокислот, но сохраняет, по меньшей мере по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант может также означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет, по меньшей мере по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативное замещение аминокислоты, то есть, замена аминокислоты другой аминокислотой со сходными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных участков), признается в уровне техники, как правило, таким, что включает незначительные изменения. Эти незначительные изменения могут быть определены, в частности, при рассмотрении индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислот Гидропатический индекс аминокислоты основан на рассмотрении его гидрофобности и заряда. Как известно в данной области техники, аминокислоты с подобными индексами гидропатичности могут быть замещенными и по-прежнему сохранять функцию белка. В одном аспекте аминокислоты, имеющие индексы гидропатичности ± 2 замещаются. Гидрофильность аминокислот может быть также использована для выявления замещений, которые могли бы дать белки, сохраняющие биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезное измерение, которое, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4 554 101, включенный в данный документ в полном объеме путем ссылки. Замещение аминокислот, имеющих аналогичные величины гидрофильности, может привести к пептидам, сохраняющим биологическую активность, например, иммуногенность, как известно в данной области. Замещения могут быть выполнены с аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах ± 2 относительно друг друга. Как индекс гидрофобности, так и значение гидрофильности аминокислот зависят от конкретной боковой цепи этой

аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением, аминокислотные замещения, которые совместимы с биологической функцией, как подразумевается, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, как обнаружено с помощью гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и других свойств.

[00129] "Вектор", как используется в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может быть вирусным вектором, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или искусственной хромосомой дрожжей. Вектор может быть ДНК или РНК вектором. Вектор может быть самовоспроизводящимся экстрахромосомным вектором, и предпочтительно, представляет собой плазмидную ДНК.

2. Вакцины

[00130] Настоящее изобретение относится к вакцине против гепатита В. Вакцина против гепатита В (HBV) может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген HBV, поверхностный антиген HBV или их комбинацию; коровый антиген HBV, поверхностный антиген HBV или их комбинации, или комбинацию (1) нуклеиновой кислоты, кодирующей коровый антиген HBV и/или поверхностный антиген HBV, и (2) корового антигена HBV и/или поверхностного антигена HBV, или (3) их комбинации. Коровый антиген HBV может содержать консенсусный белок, полученный из аминокислотных последовательностей капсидных белков от различных генотипов HBV. Аналогичным образом, поверхностный антиген HBV может содержать консенсусный белок, полученный из аминокислотных последовательностей поверхностных антигенов от нескольких генотипов HBV. Такой коровый белок HBV и консенсусные поверхностные антигены HBV являются уникальными и имеют сходство с коровыми и поверхностными антигенами, соответственно, в целом по нескольким генотипам HBV. Таким образом, вакцина согласно настоящему изобретению применима к нескольким типам HBV и подходит для распространенных популяций. Кроме того, вакцина согласно настоящему изобретению может быть приспособлена к конкретным нуклеиновым кислотам, кодирующим консенсусный коровый белок HBV, консенсусный поверхностный белок HBV или их комбинацию. Другими словами, вакцина согласно настоящему изобретению может быть предназначена для контроля уровня или силы иммунного ответа у субъекта против одного или нескольких серотипов HBV.

[00131] Вакцина может быть ДНК-вакциной. ДНК-вакцины раскрыты в патентах США № 5 593 972, 5 739 118, 5 817 637, 5 830 876, 5 962 428, 5 981 505, 5 580 859, 5 703 055 и 5 676 594, которые включены в настоящее описание полностью в качестве ссылки. ДНК-вакцина

может дополнительно содержать элементы или реагенты, которые ингибируют ее интеграцию в хромосому.

[00132] Вакцина может быть РНК капсидного белка HBV и/или белком поверхностного антигена HBV. РНК-вакцина может быть введена в клетку.

а. Коровый антиген HBV

[00133] Вакцина согласно настоящему изобретению может содержать коровый белок HBV. Коровый белок HBV является мишенью для иммунно опосредованного вирусного клиренса, вызывая 1) ЦТЛ-ответы цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), 2) Т-хелперные ответы и/или 3) ответы В-клеток или, предпочтительно, все вышеуказанные для перекрестной презентации.

[00134] Таблица 2 показывает сходство между генотипами корового антигена из генотипов HBV-A, HBV-B, HBV-C, HBV-D и HBV-E с консенсусным коровым белком HBV, названным в графе как "HBV-M-core". Для некоторых вариантов осуществления М-коровый конструктор HBV был разработан для увеличения гомологии для широкого круга коровых мишеней HBV. Сходства генотипов для корового антигена с разработанным М-коровым конструктором увеличили гомологии для широкого круга коровых мишеней HBV. Все генотипы должны быть представлены в универсальной иммунной терапевтической вакцине для HBV.

Таблица 2. Процент идентичности коровых белков HBV

Процент идентичности								
отклонение		1	2	3	4	5	6	
	1		96,2	96,2	97,8	95,6	98,4	1 - HBV-A-ConCore
	2	3,9		100	95,6	93,4	96,7	2 - HBV-B-ConCore
	3	3,9	0		95,6	93,4	96,7	3 - HBV-C-ConCore
	4	2,2	4,5	4,5		97,8	97,8	4 - HBV-D-ConCore
	5	4,5	6,9	6,9	2,2		95,6	5 - HBV-E-ConCore
	6	1,7	3,4	3,4	2,2	4,5		6 - HBV-M-Core
		1	2	3	4	5	6	

[00135] Антиген может содержать эпитопы корового белка, которые делают их эффективными, в частности, в качестве иммуногенов, против которых анти-HBV иммунные ответы могут быть индуцированы. Антиген HBV может содержать полноразмерный продукт, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

[00136] Коровый антиген HBV может содержать консенсусный белок. Консенсусный коровый антиген HBV индуцирует антиген-специфическую Т-клетку и высокий титр антител как системно, так и в печени. Таким образом, защитный иммунный ответ обеспечивается в печени с помощью вакцин, содержащих консенсусный коровый антиген HBV. Соответственно, любой пользователь может создать вакцину согласно настоящему изобретению, которая включает консенсусный коровый антиген HBV, чтобы обеспечить иммунную терапию и/или защиту печени.

[00137] В частности, в индуцированной иммунной реакции, консенсусный коровый антиген HBV стимулирует спленоциты, в частности CD4⁺ клетки и CD8⁺ клетки, секретировать или производить аналогичные количества интерферона-гамма (INF- γ), но различные количества фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α). Интересно, индуцированный иммунный ответ отличается в селезенке и печени. В селезенке, CD8⁺ клетки продуцируют как INF- γ , так и TNF- α больше, чем CD4⁺ клетки, однако в печени происходит обратное. Другими словами, CD4⁺ клетки продуцируют как INF- γ , так и TNF- α больше, чем CD8⁺ клетки в печени. Кроме того, в печени продуцируется больше антиген-специфических IgA чем IgG, а защитный иммунный ответ удивительно и неожиданно включает антиген-специфический ответ ЦТЛ, который не вызывает повреждения печени. Соответственно, вакцина согласно настоящему изобретению, содержащая консенсусный коровый антиген HBV, может быть доставлена на периферию, чтобы наладить антиген-специфическое нацеливание в печень для очистки или устранения HBV-инфицированных клеток без повреждения или воспаления печени.

[00138] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие консенсусные коровые белки HBV, представляют собой SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5. SEQ ID NO:1 кодирует консенсусный коровый белок HBV. SEQ ID NO:3 кодирует консенсусный коровый белок HBV, присоединенный к лидеру IgE. SEQ ID NO:5 кодирует консенсусный коровый белок HBV, присоединенный к лидеру IgE и метке HA.

[00139] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующих белки, идентичные или гомологичные консенсусному белку HBV, иммуногенному фрагменту из консенсусного белка HBV, и их иммуногенные фрагменты гомологичных белков. Такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности в консенсусной последовательности, вплоть до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности в консенсусной последовательности, до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности в консенсусной последовательности, до 97 % идентичности по всей

длине аминокислотной последовательности в консенсусной последовательности, до 98 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности из консенсусной последовательности и до 99 % могут быть предоставлены. Кроме того, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, указанные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, идентичных белкам, указанным в данном описании, также предоставляются.

[00140] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95 % гомологию с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96 % гомологию с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97 % гомологию с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98 % гомологию с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99 % гомологию с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновых кислот с кодирующими последовательностями, описанными в настоящем документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, раскрытого в настоящем документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, присоединенную к 5'-концу кодирующей последовательности, которая кодирует гомологичные белковые последовательности, описанные в настоящем документе.

[00141] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующих белки с определенной процентной идентичностью по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного корового консенсусного белка HBV, иммуногенный фрагмент из корового консенсусного белка HBV и иммуногенные фрагменты коровых консенсусных белков HBV. Такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной

коровой консенсусной последовательности HBV, до 85 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 90 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 91 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 92 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 93 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 94 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 95 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 97 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 98 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV, до 99 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной коровой консенсусной последовательности HBV могут быть обеспечены. Кроме того, предлагаются также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, указанные в настоящем документе, и иммуногенные фрагменты белков с аналогичным процентом идентичности, как указано выше, с коровыми белками HBV, описанными в данном документе.

[00142] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенный белок, который имеет 80 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного корового белка HBV, кодируемого последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенный белок, который имеет 83 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного корового белка HBV, кодируемого последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенный белок, который имеет 85 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного корового белка HBV, кодируемого последовательностями нуклеиновых кислот согласно

[illegible]

корового белка HBV, кодируемого последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенный белок, который имеет 99 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного корового белка HBV, кодируемого последовательностями нуклеиновых кислот согласно данному документу. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновых кислот с кодирующими последовательностями, описанными в настоящем документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного корового белка HBV, раскрытого в настоящем документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, присоединенную к 5'-концу кодирующей последовательности, которая кодирует гомологичные белковые последовательности, описанные в настоящем документе.

[00143] В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты свободна от кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты свободна от кодирующей последовательности, которая кодирует лидер IgE.

[00144] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5. Фрагменты могут составлять по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % от последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичными фрагментам последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80 % по меньшей мере 85 % 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 % или по меньшей мере 99 % идентичными фрагментам последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты включают последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как лидер IgE. В некоторых вариантах

реализации изобретения фрагменты свободны от кодирующих последовательностей, которые кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от кодирующих последовательностей, которые кодирует лидерную последовательность, такую как, например, лидер IgE.

[00145] Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного корового белка HBV представляет собой SEQ ID NO:2. Аминокислотная последовательность консенсусного корового белка HBV, присоединенная к лидеру IgE, представляет собой SEQ ID NO:4. В частности, в SEQ ID NO:4, лидер IgE присоединен к аминоконцу консенсусного корового белка HBV. Аминокислотная последовательность консенсусного корового белка HBV, присоединенного к лидеру IgE и метке HA, представляет собой SEQ ID NO:6. В SEQ ID NO:6, лидер IgE и метка HA присоединены к аминоконцу и карбокси-концу, соответственно, консенсусного корового белка HBV.

[00146] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95 % гомологию с консенсусными белковыми последовательностями, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96 % гомологию с консенсусными белковыми последовательностями, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97 % гомологию с консенсусными белковыми последовательностями, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98 % гомологию с консенсусными белковыми последовательностями, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99 % гомологию с консенсусными белковыми последовательностями, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

[00147] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 80 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непроцесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 85 % идентична по всей длине

[illegible]

имеют аминокислотную последовательность, которая на 98 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 99 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

[00148] В некоторых вариантах реализации изобретения белок свободен от лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения белок свободен от лидера IgE. Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % консенсусного белка. Иммуногенные фрагменты последовательностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6 могут быть обеспечены. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как лидер IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от лидерной последовательности, такой как, например, лидер IgE.

[00149] Иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам последовательностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6 могут быть обеспечены. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по

меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % белков, которые на 95 % гомологичны последовательностям SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96 % гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97 % гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98 % гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99 % гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как лидер IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от лидерной последовательности, такой как, например, лидер IgE.

[00150] Иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам последовательностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6 могут быть обеспечены. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % белков, которые на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % идентичны по всей длине аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как лидер IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от

лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от лидерной последовательности, такой как, например, лидер IgE.

[00151] Как указано в данном описании относительно присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется старт-кодом последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок без кодирующих последовательностей сигнального пептида. Таким образом, например, SEQ ID NO:4 представляет собой SEQ ID NO:2 с сигнальным пептидом/лидерной последовательностью, присоединенным к N-концу последовательности SEQ ID NO:2, т.е. SEQ ID NO:4 является белком, содержащим сигнальный пептид, присоединенный к N-концу последовательности SEQ ID NO:2. Первый остаток в SEQ ID NO:2, "Хаа", как правило, является метионином в отсутствие сигнального пептида. Однако, белки, которые содержат сигнальные пептиды, присоединенные к SEQ ID NO:2, такие как SEQ ID NO:4, заменяют остаток 1 метионина в Хаа остатком, который присоединяет сигнальный пептид к белку. Соответственно, N-концевой остаток последовательности SEQ ID NO:2 может быть любым, но если он кодируется последовательностью инициации, то это метионин. Связь сигнального пептида/лидерной последовательности с N-концом на SEQ ID NO: 2, как правило, исключает N-концевой метионин. Как используется в данном документе, предполагается, что SEQ ID NO: 4 содержит SEQ ID NO: 2 с сигнальным пептидом/лидерной последовательностью, связанной с N-концом на SEQ ID NO: 2, несмотря на устранение N-концевого Хаа-остатка последовательности SEQ ID NO: 2. Аналогичным образом, кодирующие последовательности для SEQ ID NO: 4 содержат последовательности, кодирующие SEQ ID NO: 2 с последовательностями, кодирующими сигнальный пептид/лидерную последовательность, присоединяющиеся к 5'-концу последовательностей, кодирующих SEQ ID NO: 2. Иницирующий кодон может быть "nnn" в кодирующих последовательностях для SEQ ID NO: 2, но он элиминируется, когда кодирующие последовательности сигнального пептида/лидерной последовательности, связанного с 5'-концом кодирующих последовательностей, которые кодируют SEQ ID NO: 2. Как используется в данном документе, предполагается, что кодирующие последовательности для SEQ ID NO: 4 содержат кодирующие последовательности для SEQ ID NO: 2 с кодирующими последовательностями для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединенной к 5'-концу кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где встречается nnn. Таким образом, например, предполагается, что SEQ ID NO: 3 содержит SEQ ID NO: 1 с кодирующими последовательностями для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединенной к 5'-концу последовательности

SEQ ID NO: 1 вместо nnn. В некоторых вариантах реализации изобретения nnn является кодоном инициации на 5'-конце последовательности SEQ ID NO: 1.

б. Поверхностный антиген HBV

[00152] Вакцина может содержать поверхностный антиген HBV. Настоящая заявка предлагает поверхностные антигены HBV, способные вызывать иммунную реакцию у млекопитающих против одного или более серотипов HBV. Поверхностные антигены могут содержать эпитопы поверхностных белков, которые делают их эффективными, в частности, в качестве иммуногенов, против которых анти-HBV может быть вызвана иммунная реакция. Поверхностный антиген HBV может содержать полноразмерный трансляционный продукт, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

[00153] Поверхностный антиген HBV может содержать консенсусный белок. Консенсусные поверхностные антигены HBV получают из последовательностей поверхностных антигенов первичных изолятов генотипа А или С HBV. В частности, консенсусные поверхностные антигены HBV включают S-белок или комбинацию S-белка, пре-S2 и пре-S1 (Фигуры 3 и 4). Эндопротеолитические сайты расщепления вводятся в консенсусные поверхностные антигены HBV для обеспечения правильного белкового фолдинга и лучшего ЦТЛ-процессирования. Использование кодонов в консенсусных поверхностных антигенах HBV было модифицировано, чтобы отразить кодонное смещение человеческих генов. Кроме того, удалось избежать областей с очень высоким (например, больше, чем 80 процентов) или очень низким (например, меньше, чем 30 процентов) содержанием GC, где находились цис-действующие мотивы, такие как внутренние ТАТА-боксы, повторные последовательности и структурированные последовательности. Последовательность Козак ввели в консенсусные поверхностные антигены HBV для повышения инициации трансляции и лидерную последовательность IgE добавили для повышения экспрессии белка.

[00154] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусные поверхностные антигены HBV, представляет собой SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, и SEQ ID NO:15. SEQ ID NO:9 кодирует белок длинного консенсусного поверхностного антигена HBV, полученный из генотипа А, и включает S-белок, пре-S2 и пре-S1 (LHBs-A). SEQ ID NO:11 кодирует белок длинного консенсусного поверхностного антигена HBV, полученного из генотипа С, и включает S-белок, пре-S2 и пре-S1 (LHBs-C). SEQ ID NO:13 кодирует белок короткого консенсусного поверхностного антигена HBV, полученный из генотипа А, и включает S-белок (SHBs-A). SEQ ID NO:15 кодирует белок

короткого консенсусного поверхностного антигена HBV, полученный из генотипа С, и включает S-белок (SHBs-C).

[00155] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, идентичные по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных поверхностных антигенов HBV, иммуногенным фрагментам консенсусных поверхностных антигенов HBV и иммуногенным фрагментам идентичных белков. Таким образом, молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, которые имеют до 95 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV, до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV, до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV, до 97 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV, до 98 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV и до 99 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с последовательностью консенсусного поверхностного антигена HBV могут быть обеспечены. Кроме того, предлагаются также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, описанные в настоящей заявке, и иммуногенные фрагменты белков, идентичных по всей длине аминокислотной последовательности белкам поверхностного антигена HBV, описанным в настоящей заявке.

[00156] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к

молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновых кислот с кодирующими последовательностями, раскрытыми в настоящем документе, которые идентичны по всей длине аминокислотной последовательности кодирующей последовательности белка консенсусного поверхностного антигена HBV, раскрытого в настоящем документе, включает последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, присоединенную к 5'-концу кодирующей последовательности, которая кодирует идентичные белковые последовательности, раскрытые в настоящем документе

[00157] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерного консенсусного белка поверхностного антигена HBV, иммуногенного фрагмента консенсусного белка поверхностного антигена HBV и иммуногенных фрагментов консенсусных белков поверхностного антигена HBV. Такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, которые имеют до 80 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 85 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 90 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 91 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 92 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 93 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 94 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 95 %

идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 96 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 97 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 98 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV, до 99 % идентичности по всей длине аминокислотной последовательности консенсусной последовательности полноразмерного поверхностного антигена HBV могут быть предоставлены. Кроме того, предлагаются также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, описанные в настоящей заявке, и иммуногенные фрагменты белков с похожим процентом идентичности, как указано выше, с белками поверхностных антигенов HBV, описанными в настоящей заявке.

[00158] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 80 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности кодирующих последовательностей полноразмерных поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 83 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности кодирующих последовательностей полноразмерных поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 85 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности кодирующих последовательностей полноразмерных поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 90 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности кодирующих последовательностей полноразмерных поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 91 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности кодирующих последовательностей полноразмерных поверхностных антигенов HBV согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к

[illegible]

поверхностного антигена HBV, раскрытого в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, присоединенную к 5'-концу кодирующей последовательности, которая кодирует идентичные белковые последовательности, раскрытые в данном документе.

[00159] В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты свободна от кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты свободна от кодирующей последовательности, которая кодирует лидер IgE.

[00160] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам последовательностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:15. Фрагменты могут составлять по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % последовательности SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичными фрагментам последовательностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80 % по меньшей мере 85 % 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 % или по меньшей мере 99 % идентичными фрагментам последовательностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты включают последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как лидер IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты свободны от кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как лидер IgE.

[00161] Кроме того, аминокислотные последовательности консенсусных поверхностных антигенов HBV, LHBs-A, LHBs-C, SHBs-A и SHBs-C представляют собой SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:16, соответственно.

[00162] Белки могут быть идентичными последовательностям SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99 % идентичность по всей длине аминокислотной последовательности консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу.

[00163] Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны последовательностям SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 80 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 85 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 90 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты

[illegible]

аминокислотную последовательность, которая на 99 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности непротесированным консенсусным аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO:16.

[00164] Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % консенсусного белка. Иммуногенные фрагменты последовательностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:16 могут быть обеспечены. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.

[00165] Иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам последовательностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, могут быть обеспечены. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере 20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % белков, которые на 95 % идентичны по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.

[00166] Иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам последовательностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, могут быть обеспечены. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 % по меньшей мере 15 % по меньшей мере

20 % по меньшей мере 25 % по меньшей мере 30 % по меньшей мере 35 % по меньшей мере 40 % по меньшей мере 45 % по меньшей мере 50 % или по меньшей мере 55 % по меньшей мере 60 % по меньшей мере 65 % по меньшей мере 70 % по меньшей мере 75 % по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 % по меньшей мере 90 % по меньшей мере 95 % по меньшей мере 96 % по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % белков, которые на 95 % идентичны по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96 % идентичность с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97 % идентичность с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98 % идентичность с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99 % идентичность с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей согласно настоящему документу.

с. **Комбинация коровых и поверхностных антигенов HBV**

[00167] Вакцина может содержать комбинацию коровых и поверхностных антигенов HBV, как описано выше. Эта комбинация антигенов HBV способна вызывать иммунный ответ у млекопитающего на один или более серотипов HBV. Вакцина может быть разработана с учетом или иметь определенную комбинацию антигенов HBV, которые, в свою очередь, обеспечивают возможность контролировать уровень или силу иммунного ответа у млекопитающего.

[00168] Комбинации могут содержать одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих (1) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A, LHBs-C, и SHBs-C; (2) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A и LHBs-C; (3) HBV-M-Core, LHBs-A, и SHBs-A; (4) HBV-M-Core и LHBs-A; (5) HBV-M-Core, SHBs-A, LHBs-C, и SHBs-C; (6) HBV-M-Core, LHBs-C, и SHBs-C; (7) HBV-M-Core и SHBs-C; (8) HBV-M-Core, LHBs-A, LHBs-C, и SHBs-C; (9) HBV-M-core, LHBs-A, и SHBs-C; (10) HBV-M-Core и SHBs-C; (11) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A, и SHBs-C; (12) HBV-M-Core, LHBs-A, и SHBs-C; (13) HBV-M-Core, SHBs-A, и SHBs-C; (14) LHBs-A, SHBs-A, LHBs-C, и SHBs-C; (15) LHBs-A, SHBs-A, и LHBs-C; (16) LHBs-A и SHBs-A; (17) SHBs-A, LHBs-C, и SHBs-C; (18) LHBs-C и SHBs-C; (19) LHBs-A, LHBs-C, и

SHBs-C; (20) LHBs-A и SHBs-C; (21) LHBs-A, SHBs-A, и SHBs-C; (22) LHBs-A и SHBs-C; (23) SHBs-A и SHBs-C; (24) HBV-M-Core и SHBs-A; (25) HBV-M-Core, LHBs-A и LHBs-C; или (26) LHBs-A и LHBs-C.

[00169] Примерный вариант осуществления изобретения относится к вакцине, включая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих HBV-M-Core, LHBs-A и LHBs-C. Другой иллюстративный вариант осуществления относится к вакцине, включая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих HBV-M-Core, SHBs-A и SHBs-C. Еще один вариант осуществления относится к вакцине, включая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих HBV-M-Core, LHBs-A и LHBs-C и адъювант, такой как IL-12.

[00170] Комбинационная вакцина также содержит один или более консенсусных коровых белков HBV и/или белок поверхностного антигена HBV в виде одной или нескольких белковых субъединиц, одну или более убитых вирусных частиц, содержащих один или более консенсусных коровых белков HBV и/или белок консенсусного поверхностного антигена HBV, или одну или более ослабленных вирусных частиц, содержащих один или более консенсусных коровых белков HBV и/или белок поверхностного антигена HBV. Ослабленная вакцина может быть ослабленной живой вакциной, убитой вакциной и вакцинами, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных генов, которые кодируют один или несколько консенсусных коровых белков HBV и/или белок поверхностного антигена HBV, а также субъединицы и гликопротеиновые вакцины. Примеры ослабленных живых вакцин, тех, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных антигенов, субъединичных вакцин и вакцин гликопротеинов, описаны в патентах США №: 4 510 245; 4 797 368; 4 722 848; 4 790 987; 4 920 209; 5 017 487; 5 077 044; 5 110 587; 5 112 749; 5 174 993; 5 223 424; 5 225 336; 5 240 703; 5 242 829; 5 294 441; 5 294 548; 5 310 668; 5 387 744; 5 389 368; 5 424 065; 5 451 499; 5 453 364; 5 462 734; 5 470 734; 5 474 935; 5 482 713; 5 591 439; 5 643 579; 5 650 309; 5 698 202; 5 955 088; 6 034 298; 6 042 836; 6 156 319 b 6 589 529, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

d. Вакцинные продукты и плазмиды

[00171] Вакцина может содержать конструкторы нуклеиновой кислоты или плазмиды, которые кодируют коровые белки HBV, поверхностные антигены HBV, и комбинации коровые белки HBV/поверхностные антигены. Предлагаемыми в настоящей заявке являются генетические конструкторы, которые могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует коровый антиген HBV, описанный в настоящем документе, включая консенсусные белковые последовательности, последовательности,

гомологичные консенсусным белковым последовательностям, фрагменты консенсусных белковых последовательностей и последовательности, гомологичные фрагментам консенсусных белковых последовательностей. Кроме того, предлагаемыми в настоящей заявке являются генетические конструкторы, которые могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует поверхностный антиген HBV, описанный в настоящем документе, последовательности, гомологичные консенсусным белковым последовательностям, фрагменты консенсусных белковых последовательностей и последовательности, гомологичные фрагментам консенсусных белковых последовательностей. Генетический конструктор может присутствовать в клетке в виде функционирующей экстрахромосомальной молекулы. Генетический конструктор может быть линейной минихромосомой, включая центромеры, теломеры или плазмиды или космиды.

[00172] Генетический конструктор может также быть частью генома рекомбинантного вирусного вектора, включая рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный аденовирус ассоциированный вирус и рекомбинантный вирус осповакцины. Генетический конструктор может быть частью генетического материала в ослабленных живых микроорганизмах или рекомбинантных микробных векторов, которые живут в клетках.

[00173] Генетические конструкторы могут содержать регуляторные элементы для экспрессии генов, кодирующих последовательности нуклеиновой кислоты. Регулирующие элементы могут быть промотором, энхансерным иницирующим кодоном, стоп-кодоном или сигналом полиаденилирования.

[00174] Последовательности нуклеиновых кислот могут составить генетический конструктор, который может быть вектором. Вектор может быть способен экспрессировать антиген в клетке млекопитающего в количестве, эффективном для индукции иммунного ответа у млекопитающего. Вектор может быть рекомбинантным. Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген. Вектор может быть плазмидой. Вектор может быть полезным для трансфекции клеток нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, который культивируют с трансформированной клеткой-хозяином и выдерживают в условиях, в которых экспрессия антигена имеет место.

[00175] Кодирующие последовательности можно оптимизировать для стабильности и высоких уровней экспрессии. В некоторых случаях, кодоны выбирают так, чтобы уменьшить образование вторичной структуры РНК, такой как та, что формируется за счет внутримолекулярной связи.

[00176] Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, и может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может располагаться по ходу транскрипции антигенкодирующей последовательности, и

стоп-кодон, который может располагаться против хода транскрипции антигенкодирующей последовательности. Кодон инициации и стоп-кодон может располагаться в рамке с антигенкодирующей последовательностью. Вектор может также содержать промотор, который функционально связан с антигенкодирующей последовательностью. Промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей антиген, может быть промотором из вируса обезьян 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотором вируса иммунодефицита человека (HIV) промотором, таким как промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса бычьего иммунодефицита (BIV), промотором вируса Молони, промотором вируса птичьего лейкоза (ALV), промотором цитомегаловируса (CMV), промотором, таким как непосредственно ранний промотор CMV, промотором вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотором вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор может быть также промотором человеческого гена, такого как человеческий актин, миозин человека, гемоглобин человека, человеческий мышечный креатин или металлотioneин. Промотор может быть также тканеспецифическим промотором, таким мышечно или кожно специфическим промотором, природным или искусственным. цы или кожи конкретного промотора, природные или синтетические. Примеры таких промоторов описаны в публикации патентной заявки США № US20040175727, содержание которой включено в настоящее описание во всей своей полноте.

[00177] Вектор может также содержать сигнал полиаденилирования, который может располагаться против хода транскрипции последовательности, кодирующей коровый белок HBV. Сигнал полиаденилирования может быть сигналом полиаденилирования SV40, сигналом полиаденилирования LTR, сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигналом полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигналом полиаденилирования β -глобина. Сигнал полиаденилирования SV40 может быть сигналом полиаденилирования из вектора pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

[00178] Вектор может также содержать энхансер, расположенный против хода транскрипции последовательности, кодирующей консенсусный коровый белок HBV, или последовательности, кодирующей белок консенсусного поверхностного антигена HBV. Энхансер может быть необходим для экспрессии ДНК. Энхансер может быть человеческим актином, человеческим миозином, человеческим гемоглобином, человеческим мышечным креатином или вирусным энхансером, таким как энхансер из CMV, HA, RSV или EBV. Энхансеры функции полинуклеотида описаны в патентах США № 5 593 972, 5 962 428, а также WO 94/016737, содержание каждого из них в полном объеме включено в качестве ссылки.

[00179] Вектор может также содержать точку начала репликации от млекопитающих, чтобы поддерживать вектор экстрахромосомально и продуцировать несколько копий вектора в клетке. Вектор может быть pVAX1, pCEP4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), который может содержать точку начала репликации вируса Эпштейн-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, которые могут продуцировать высокого копирования эписомную репликацию без интеграции. Вектор может быть pVAX1 или вариантом pVax1 с изменениями, таким как вариантная плазмида, описанная в данном документе. Вариантной плазмидой pVax1 является вариант из 2998 пар оснований скелетной векторной плазмиды pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad CA). Промотор CMV расположен у оснований 137-724. Промотор/сайт примирования T7 расположен у оснований 664-683. Несколько сайтов клонирования расположены у оснований 696-811. Сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста расположен у оснований 829-1053. Ген устойчивости к канамицину находится у оснований 1226-2020. Точка начала репликации pUC расположена у оснований 2320-2993.

[00180] Исходя из последовательности pVAX1, доступной от Invitrogen, следующие мутации могут быть обнаружены в последовательности pVAX1, которая используется в качестве скелета для плазмид 1-6, указанных в настоящем документе:

[00181] C>G 241 в промоторе CMV

[00182] C>T1942 скелет, по ходу транскрипции сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста (bGHpolyA)

[00183] A> -2876 скелет, по ходу транскрипции гена устойчивости к канамицину

[00184] C>T3277 в точке начала репликации pUC (Ori), мутация с высоким числом копий (смотри Nucleic Acid Research 1985)

[00185] G>C 3753 в самом конце pUC Ori против хода транскрипции сайта RNaseH

[00186] Пары оснований 2, 3 и 4 изменяются от АСТ до СТГ в скелете, против хода транскрипции промотора CMV.

[00187] Скелетом вектора может быть pAV0242. Вектор может быть типом 5 вектора аденовируса, дефектного по репликации (Ad5).

[00188] Вектор может также содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии генов в клетках млекопитающих или человека, в которые вводят вектор. Консенсусная кодирующая последовательность HBV может содержать кодон, который может позволить более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

[00189] Вектором может быть pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая может быть использована для продуцирования белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Вектором также может быть pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая может быть использована для продуцирования белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вектором также может быть полная бакуловирусная экспрессионная система MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая может быть использована для продуцирования белка в клетках насекомых. Вектором также может быть pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которые могут быть использованы для продуцирования белка в млекопитающих клетках, таких как овариальные клетки китайского хомячка (CHO). Вектором могут быть векторы экспрессии или системы для продуцирования белка с помощью рутинных технологий и легко доступных исходных материалов, включая Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed. , Cold Spring Harbor (1989), которые включены в полном объеме в виде ссылки.

[00190] В некоторых вариантах реализации изобретения вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21. SEQ ID NO:17 кодирует консенсусный коровый белок HBV, а SEQ ID NOS:18-21 кодируют консенсусный поверхностный антиген HBV. Карты векторов SEQ ID NOS:17-21 показаны на Фигурах 5-9, соответственно.

е. Фармацевтические композиции вакцины

[00191] Вакцина может быть в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать вакцину.

[00192] Фармацевтические композиции могут содержать приблизительно от 5 нанограмм до приблизительно 10 мг вакцинной ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат приблизительно от 25 нанограмм до приблизительно 5 мг вакцинной ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 50 нанограмм до приблизительно 1 мг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 0,1 до приблизительно 500 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 1 до приблизительно 350 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 5 до приблизительно 250 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 10 до приблизительно 200 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах

реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 15 до приблизительно 150 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 20 до приблизительно 100 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 25 до приблизительно 75 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 30 до приблизительно 50 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 35 до приблизительно 40 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 100 до приблизительно 200 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 10 микрограмм до приблизительно 100 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 20 микрограмм до приблизительно 80 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 25 микрограмм до приблизительно 60 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 30 микрограмм до приблизительно 50 микрограмм ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 35 микрограмм до приблизительно 45 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограмм ДНК.

[00193] В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 микрограмм ДНК вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции могут содержать по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305,

310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 или 1000 микрограмм ДНК вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг или более ДНК вакцины.

[00194] В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать вплоть до и включая 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 нанограмм ДНК вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать вплоть до и включая 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 или 1000 микрограмм ДНК вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать вплоть до и включая 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг ДНК вакцины.

[00195] Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другие агенты для целей разработки в соответствии с режимом введения, который будет использоваться. В тех случаях, когда фармацевтические композиции представляют собой инъекционные фармацевтические композиции, они являются стерильными, пирогенными и свободными от частиц. Предпочтительно используют изотонический препарат. Как правило, добавки для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях, предпочтительными являются изотонические растворы, такие как фосфатно-буферный раствор. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах реализации изобретения в композицию добавляют агент для сужения сосудов.

[00196] Вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель может быть функциональными молекулами в качестве наполнителей, адъювантов, носителей или разбавителей. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть агентом для облегчения трансфекции, который может включать поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, и сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные агенты для облегчения трансфекции.

[00197] Облегчающим трансфекцию агентом является полианион, поликатион, в том числе поли-L-глутамат (LGS), или липид. Облегчающим трансфекцию агентом является поли-L-глутамат, и более предпочтительно, поли-L-глутамат присутствует в вакцине в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент может также включать поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален, и сквален и гиалуроновая кислота также могут вводиться в сочетании с генетическим конструктом. В некоторых вариантах реализации изобретения ДНК-векторные вакцины могут также включать облегчающие трансфекцию агенты, такие как липиды, липосомы, в том числе лецитин, липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, как ДНК-липосомные смеси (см. например W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные агенты для облегчения трансфекции. Предпочтительно, облегчающим трансфекцию агентом является полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрирование агента трансфекции в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

[00198] Фармацевтически приемлемый наполнитель может быть адъювантом. Адъювантом могут быть другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или доставляются как белки в комбинации с указанной выше плазмидой в вакцине. Адъювант может быть выбранным из группы, содержащей: α -интерферон (IFN- α), β -интерферон (IFN- β), γ -интерферон фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), кожный Т-клеточный проводящий хемокин (STACK), эпителиальный тимус-экспрессированный хемокин (TECK),

мукозо-ассоциированный эпителиальный хемокин (МЭК), IL-12, IL-15, МНС, CD80, CD86, включая IL-15, имеющий удаленную сигнальную последовательность и необязательно включающий сигнальный пептид от IgE. Адьювантом может быть IL-12, IL-15, IL-28, СТАК, ТЕК, фактор роста тромбоцитов (PDGF), $TNF\alpha$, $TNF\beta$, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 или их комбинации. Примерным вариантом осуществления адьюванта является IL-12.

[00199] Другие гены, которые могут быть полезными адьювантами, включают те, которые кодируют: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, васкулярный фактор роста, фибробластный фактор роста, IL-7, фактор роста нервов, васкулярный эндотелиальный фактор роста, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферона, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAIL_{rec}, TRAIL_{rec}DRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O χ 40, O χ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

f. Способы доставки вакцины

[00200] В настоящей заявке предлагается способ доставки фармацевтической композиции для обеспечения генетического конструкта и белков корового белка HBV и/или поверхностного антигена HBV, которые содержат эпитопы, которые делают их особенно эффективными иммуногенами, против которых иммунный ответ на вирусные HBV-инфекции может быть вызван. С целью индукции терапевтического и/или профилактического иммунного ответа может быть предложен способ доставки вакцины, или вакцинация. Процесс вакцинации может генерировать у млекопитающего иммунный ответ против множества генотипов HBV. Вакцина может быть доставлена индивидууму, чтобы модулировать активность иммунной системы млекопитающего и усилить иммунный ответ. Доставка вакцины может быть трансфекцией антигеном НА в качестве молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и доставляется на поверхность клетки, на которой иммунная система распознает и индуцирует клеточный, гуморальный или клеточный и гуморальный ответ. Доставка вакцины может быть использована, чтобы индуцировать или вызвать иммунный ответ у млекопитающего против множества вирусов HBV путем введения млекопитающему вакцины, как описано в данном документе.

[00201] При доставке вакцины млекопитающему, и вслед за этим вектора в клетки млекопитающего, трансфицированные клетки будут экспрессировать и секретировать консенсусный коровый белок HBV и консенсусный поверхностный антиген HBV. Эти секретлируемые белки или искусственные антигены, будут признаны в качестве чужеродных иммунной системой, которая будет поднимать иммунный ответ, который может включать: антитела, полученные против антигенов, и Т-клеточный ответ именно против антигена. В некоторых примерах, млекопитающее привито вакцинами, обсуждаемыми в данном документе, будет иметь примированную иммунную систему и при заражении вирусным штаммом HBV примированная иммунная система позволяет быстро очистить последующие вирусы HBV, будь то через гуморальную, или клеточную, или обе системы. Вакцина может быть доставлен индивидууму, чтобы модулировать активность иммунной системы индивидуума, тем самым повышая иммунный ответ.

[00202] Способы доставки ДНК вакцины описаны в патенте США №. 4 945 050 и 5 036 006, оба из которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

[00203] С целью индукции иммунного ответа у млекопитающего вакцина может быть введена в организм млекопитающего.. Млекопитающее может быть человеком, нечеловекообразным приматом, коровой, свиньей, овцой, козой, антилопой, бизоном, буйволом, полорогим, оленем, ежом, слоном, ламой, альпака, мышами, крысами или курицей, и, предпочтительно, человеком, коровой, свиньей или курицей.

g. Доставка вакцины с адъювантами

[00204] Фармацевтические композиции, предпочтительно вакцины, описанные в данном документе, могут быть введены в комбинации с белками или генами, кодирующими адъюванты, которые могут включать: α -интерферон (IFN- α), β -интерферон (IFN- β), γ -интерферон, IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, васкулярный фактор роста, фибробластный фактор роста, IL-7, фактор роста нервов, васкулярный эндотелиальный фактор роста, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферона, NF κ B, Bax, TRAIL,

TRAIL_{rec}, TRAIL_{rec}DRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1 или TAP2 или их функциональные фрагменты. В примерных вариантах реализации изобретения адъювантом является IL-12.

h. Способ генерации иммунного ответа на вакцину

[00205] Вакцина может быть использована для генерации иммунного ответа у млекопитающего, в том числе терапевтического или профилактического иммунного ответа. Иммунный ответ может генерировать антитела и/или киллерные Т-клетки, которые направлены на коровый антиген HBV, поверхностный антиген HBV или их комбинации. Такие антитела и Т-клетки могут быть выделенными.

[00206] Некоторые варианты реализации изобретения обеспечивают способы генерации иммунных реакций против коровых белков HBV, поверхностных антигенных белков HBV и их комбинации, которые включают введение индивидууму вакцины. Некоторые варианты реализации изобретения обеспечивают способы профилактической вакцинации индивидуума против HBV-инфекции, которые включают введение вакцины. Некоторые варианты реализации изобретения обеспечивают способы терапевтической вакцинации индивидуума, который был заражен HBV, которые включают введение вакцины. Диагностика HBV-инфекции до введения вакцины может быть осуществлена в установленном порядке.

i. Способ лечения вакциной

[00207] Вакцина может быть использована для получения иммунного ответа у млекопитающего, который защищает печень. Иммунный ответ может создавать антиген-специфический ЦТЛ ответ, который не вызывает повреждения или воспаления печени. В некоторых вариантах реализации изобретения вакцина может быть доставлена к периферии для вызова антиген-специфического иммунного ответа, нацеленного на печень, чтобы очистить или устранить HBV-инфицированные клетки, не повреждая и не вызывая воспаление печени. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение может включать доставку вакцины, содержащей консенсусный коровый антиген HBV, к периферии для создания антиген-специфического иммунного ответа, нацеленного на печень, чтобы очистить или устранить HBV-инфицированные клетки, не нанося вреда или не вызывая воспаления печени.

3. Пути введения

[00208] Вакцину или фармацевтическую композицию можно вводить различными способами, в том числе перорально, парентерально, подъязычно, чрескожно, ректально, через слизистую, местно, путем ингаляции, посредством трансбуккального введения, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, интраназально, интратекально и внутрисуставным способом или их комбинациями. Для применения в ветеринарии, композиция может быть введена в виде соответствующим образом приемлемой композиции в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить схему дозирования и способ введения, который является наиболее подходящим для конкретного животного. Вакцина может быть введена с помощью традиционных шприцов, безыгольных инъекционных устройств, "пистолетов для бомбардировки микрочастицами" или другими физическими методами, такими как электропорации ("EP"), "гидродинамический метод" или ультразвук.

[00209] Вектор вакцины может быть доставлен млекопитающему с помощью нескольких хорошо известных технологий, включая инъекции ДНК (также упоминается как ДНК-вакцинация) с и без *in vivo* электропорации, липосомально опосредованные, наночастицы, рекомбинантные векторы, такие как рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный аденовирус ассоциированный вирус и рекомбинантный вирус коровьей оспы. Антиген HBV может быть доставлен посредством инъекции ДНК и вместе с *in vivo* электропорацией.

а. Электропорация

[00210] Вакцина или фармацевтическая композиция могут быть введены путем электропорации. Введение вакцины посредством электропорации плазмидами вакцины может быть осуществлено с помощью электропорационных устройств, которые могут быть сформированы для доставки к целевой ткани млекопитающего импульса энергии, эффективного для создания обратимых пор, образующихся в клеточных мембранах, а предпочтительным импульсом энергии является постоянный ток, подобный заданному току, введенному пользователем. Устройство для электропорации может содержать компонент электропорации и электродный узел или узел ручки. Компонент электропорации может включать и содержать один или более различных элементов электропорационного устройств, включая: контроллер, генератор импульсов тока заданной формы, тестер импеданса, регистратор сигнала, входной элемент, элемент создание отчётов о состоянии, порт связи, компоненты памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорация может быть осуществлена с использованием *in vivo* электропорационного

устройства, например системы CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) или электропоратора Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) для содействия трансфекции клеток плазмидой.

[00211] Примеры электропорационных устройств и способов электропорации, которые могут содействовать в получении ДНК-вакцин согласно настоящему изобретению, включают те, которые описаны в патенте США № 7 245 963, представленном Draghia-Akli, et al., патентной публикации США 2005/0052630, представленной Smith, et al., содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте. Другие устройства для электропорации и методы электропорации, которые могут быть использованы для облегчения доставки вакцин ДНК, включают предлагаемые в одновременно находящейся на рассмотрении заявке того же заявителя на патент США, серийный номер 11/874072, поданной 17 октября 2007, которая заявляет приоритет в соответствии с 35 USC 119 (e) предварительных заявок США № 60/852149, поданной 17 октября 2006, и 60/978982, поданной 10 октября 2007, все из которых включены в данное описание во всей своей полноте.

[00212] Патент США № 7 245 963 от Draghia-Akli и др. описывает модульные электродные системы и их применение для облегчения ввода биомолекулы в клетки выбранной ткани в теле или растении. Модульные электродные системы могут содержать множество игольчатых электродов; гиподермическую иглу; электрический соединитель, который обеспечивает связь от программируемым контроллером импульса постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может захватить множество игольчатых электродов, которые установлены на опорной конструкции, и прочно вставить их в выбранную ткань в теле или растении. Биомолекулы затем доставляются с помощью подкожной иглы в выбранную ткань. Контроллер программируемого импульса постоянного тока активируется и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Применяемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекулы в клетку между множеством электродов. Полное содержание патента США N 7 245 963 включено в данный документ в качестве ссылки.

[00213] Патентная публикация США 2005/0052630, представленная Smith, et al., описывает электропорационное устройство, которое может быть использовано, чтобы эффективно облегчить введение биомолекулы в клетки выбранной ткани в теле или растении. Электропорационное устройство содержит электро-кинетическое устройство ("EKD устройство»), работа которого определяется программным обеспечением или прошивкой. Устройство EKD выпускает серию модулей программируемых импульсов

постоянного тока между электродами в массиве на основе пользовательского элемента управления и ввода параметров импульса, и позволяет хранить и получать данные данных формы сигнала. Электропорационное устройство также содержит сменный электродный диск, имеющий множество игольчатых электродов, центральный канал впрыска для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Полное содержание патентной публикации США 2005/0052630 включено в данное описание в качестве ссылки.

[00214] Электродные массивы и способы, описанные в патенте США № 7 245 963 и патентной публикации США 2005/0052630, могут быть адаптированы для глубокого проникновения не только в ткани, таких как мышцы, но и в другие ткани или органы. Из-за конфигурации матрицы электродов, инъекционная игла (для доставки выбранной биомолекулы) также вставляется до упора в орган-мишень и инъекцию вводят перпендикулярно к целевой проблеме, в область, которая предварительно очерчена электродами. Электроды, описанные в патенте США № 7 245 963 и патентной публикации США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и 21 калибр.

[00215] Кроме того, некоторые варианты реализации изобретения включающие электропорационные устройства и способы их использования, реализации изобретения предполагают электропорационные устройства, описанные в следующих патентах: патент США № 5 273 525, выданный 28 декабря 1993, патент США № 6 110 161, выданный 29 августа 2000, № 6 261 281, выданный 17 июля 2001, и патент США № 6 958 060, выданный 25 октября 2005, и патент США 6 939 862, выданный 6 сентября 2005. Кроме того, патенты, относящиеся к предмету, представленному в патенте США 6 697 669, выданном 24 февраля 2004, который касается доставки ДНК с использованием любого из множества устройств, и в патенте США 7 328 064, выданном 5 февраля 2008, который касается метода инъектирования ДНК, рассматриваются в настоящем документе. Указанные выше патенты включены в качестве ссылки во всей их полноте в данный документ.

4. Способ приготовления вакцины

[00216] В настоящей заявке предлагаются способы получения ДНК-плазмид, которые содержат вакцины, описанные в данном документе. Плазмиды ДНК, после финальной стадии субклонирования в плазмиду экспрессии млекопитающего могут быть использованы для инокуляции клеток культуры в крупномасштабном ферментационном чане с использованием известных методов в данной области техники.

[00217] ДНК-плазмиды для использования с ЕР-устройствами согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены либо изготовлены с использованием комбинации известных устройств и методов, но, предпочтительно, они изготавливаются с

использованием оптимизированной технологии производства плазмид, описанной в опубликованной заявке США № 20090004716, которая была подана 23 мая 2007 года. В некоторых примерах ДНК-плазмиды, использованные в этих исследованиях, могут быть получены в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Технологии изготовления также включают или модерируют различные устройства и протоколы, которые, как правило, известны специалистам в данной области техники, в дополнение к тем, которые описаны в патенте США с серийным номером 60/939792, в том числе те, которые описаны в лицензированном патенте, патент США № 7 238 522, который был выдан 3 июля 2007 года. Указанные выше заявка и патент США с серийным номером 60/939792 и патент США № 7 238 522, соответственно, включены в данное описание во всей своей полноте.

ПРИМЕРЫ

[00218] Настоящее изобретение далее иллюстрируется следующими примерами. Следует понимать, что эти примеры, показывающие предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, даны только в качестве иллюстрации. Исходя из приведенного выше обсуждения и примеров, специалист в данной области техники может установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не отступая от сущности и объема изобретения, может сделать различные изменения и модификации изобретения, чтобы приспособить его к различным применениям и условиям. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны здесь, будут очевидны специалистам в данной области из вышеприведенного описания. Такие модификации также подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Коровый белок HBV

[00219] Консенсусный коровый белок HBV, также именуемый как HBV модифицированный, М-кор или М-коровый конструкт, был сконструирован из эпитопных последовательностей от генотипов А, В, С, D и Е HBV. Последовательности капсидных белков HBV от этих генотипов были отобраны для включения в конструкцию консенсусного кора, который может индуцировать иммунитет против широкого спектра генотипов, тем самым обеспечивая универсальную вакцину для HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения модификации М-корового конструкта включали добавление лидерной последовательности IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения М-коровый белок кодируется с использованием кодоновой оптимизации и РНК-оптимизации для повышенной экспрессии.

1. Конструирование и экспрессия консенсусного корового антигена

[00220] Коровые консенсусные нуклеотидные последовательности генотипа А, В, С, D, и Е HBV были сконструированы путем получения консенсусных последовательностей коровых генов каждого генотипа, а затем путем получения консенсусной последовательности консенсусов всех пяти генотипов, таким образом избежав смещения к сильно секвенированным генотипам. Кроме того, последовательности были собраны из разных стран, чтобы избежать отбора образцов сильно секвенированных генотипов. Последовательности выравнивали, используя программное обеспечение CLUSTAL X для составления окончательной консенсусной последовательности HBcAg. Как показано на Фигуре 10, наблюдалась относительная близость мультигенотипной консенсусной HBcAg-последовательности для всех выбранных последовательностей из разных генотипов.

[00221] После получения консенсусной последовательности было осуществлено несколько модификаций для увеличения уровней экспрессии антигена из плазмид. В частности, были добавлены высокоэффективная лидерная последовательность IgE и С-концевая НА-метка, а конструктор был оптимизирован относительно РНК и кодона. Это привело к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей М-коровую последовательность с IgE-лидером и НА-меткой (SEQ ID NO:5), которая переваривается EcoRI и NotI, и клонируется в вектор экспрессии pVAX (Invitrogen) под контролем цитомегаловирусного предраннего промотора. Полученный конструктор затем был назван pMCore (SEQ ID NO:17).

[00222] *In vitro* испытания экспрессии были выполнены с использованием конструктора pMCore и pVAX, который использовали в качестве контроля. Результаты, демонстрирующие положительную экспрессию, указаны на изображениях гелей, показанных на Фигурах 11А и 11В.

[00223] Кроме того, белок HBcAg экспрессировался ДНК-плазмидой, трансфектированной pMCore, содержащим коровый ген гепатита В (Фигура 12). Экспрессию pMCore обнаруживали, используя TNT® Quick Coupled Expression of Transcription/Translation System, содержащую ³⁵S-метионин (Promega, Madison, WI). Синтезированный генный продукт осаждали, используя моноклональное антитело к НА, направленное на закодированный эпитоп НА, клон НА-7 (Sigma-Aldrich). Иммуноосажденный белок подвергли электрофорезу на 12 % геле SDS-PAGE, а затем зафиксировали и высушили. Синтезированный белок со вставкой радиоактивной ³⁵S обнаруживали с помощью автордиографии. Этот *in vitro* трансляционный анализ на лизате показал обнаруживаемый HBcAg при ожидаемой молекулярной массе 28 кДа (Фигура 13).

[00224] Экспрессия была дополнительно подтверждена с использованием анти-НА меченного моноклонального антитела с помощью иммунофлюоресцентного анализа. Рабдомиосаркомные (RD) клеточные линии трансфицировали рMCore, используя TURBOFECT (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Сначала клетки фиксировали 2 % формальдегидом, а затем анализировали по поводу экспрессии белка. Зафиксированные клетки инкубировали с кроличьей моноклональной НА-меткой (Invitrogen), разведенной «первичным стандартным раствором» (0,1 % BSA, 0,2 % сапонина, 0,02 % азида натрия) в течение одного часа при комнатной температуре. затем клетки инкубировали с DyLight 594-меченым противокроличьим вторичным антителом (Thermo Scientific) в течение 20 минут при комнатной температуре. конфокальное изображение использовали для визуализации HBcAg в цитоплазме и вокруг ядра трансфицированных RD-клеток, как показано на Фигуре 14. Профиль экспрессии подтвердил, что ДНК-плазмида, несущая консенсусный коровый ген, может высоко экспрессироваться в различных клетках *in vitro*. В частности, изображения были получены с использованием инвертированного конфокального микроскопа Zeiss Axiovert 100. Анализ и количественная оценка интенсивности флюоресценции проводились с использованием программного обеспечения Image J (NIH, Rockville, MD).

2. Иммунизация мышей

[00225] Трансгенные мыши C57BL/6 были разделены на две группы по четыре мыши в каждой и трижды иммунизированы 20 мкг ДНК с помощью электропорации с двухнедельными интервалами (группа 1 – контрольный вектор pVAX; группа 2 рM-Core). Мышей иммунизировали в день 0, день 14, день 28 и умерщвляли в день 35. Селезенку, печень и сыворотку из умерщвленных животных брали для исследования.

[00226] Кроме того, чтобы оценить получение Т и В-клеточных иммунных ответов, мышей Balb/c иммунизировали и измеряли по поводу обоих ответов в различных периферических тканях. Мыши получили три внутримышечные иммынизации 30 мкг рMCore или pVax с последующей электропорацией, как указано на иммунизационной схеме (Фигура 15). В частности, шести-восьми недельные самки мышей Balb/c были приобретены у Jackson Laboratories. Животных содержали в соответствии с нормами National Institutes of Health и the University of Pennsylvania Institutional Care и Use Committee (IACUC). Для исследования ДНК-иммунизации восемь животных разделили на две группы. Каждое животное в группе иммунизации получило в общей сложности по три иммунизации 30 мкг рMCore с интервалом в две недели в большеберцовую (ТА) мышцу. Каждая иммунизация сопровождалась *in vivo* электропорацией с устройством CELLECTRA

для адаптивной постоянноточковой электропорации (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). По два 0,2 амперных постоянноточковых прямоугольных импульса были доставлены через треугольную 3-электродную решетку, состоящую из 26-калиберных твердых электродов из нержавеющей стали, полностью погруженных в мышцу. Каждый импульс был длительностью в 52 миллисекунды с 1-секундной задержкой между импульсами.

[00227] *In vivo* изучение мышей Balb/C показало повышение амплитуды секреции фактора некроза опухоли (TNF- α), интерферона гамма Т-клеток (IFN- γ) и CD107a в CD8 и CD4 Т-клетках, изъятых из селезенки. Фигуры 16 и 17 демонстрируют, что вакцинация мышей Balb/C pM-Core повышала амплитуду секреции IFN- γ в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки. Фигуры 18 и 19 демонстрируют, что вакцинация мышей Balb/C pM-Core повышала амплитуду секреции TNF- α в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки. Фигуры 20 и 21 демонстрируют, что вакцинация мышей Balb/C pM-Core повышала амплитуду секреции CD 107a в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки.

[00228] В дополнительных экспериментах, секрецию IFN- γ и TNF- α проверяли в Т-клетках. Для получения спленоцитов для этих дополнительных экспериментов, мышей умерщвляли через неделю после последней иммунизации, а селезенки изымали и помещали в среду R10 (среда RPMI, обогащенная 10 % FBS и 1х антибиотиком-антимикотиком). Селезенки измельчали индивидуально, процеживали через 40 мкМ клеточный фильтр и обрабатывали 1 мл лизисного буфера ACK в течение 5 минут для лизиса эритроцитов. Спленоциты ресуспендировали в полной среде R10 и использовали для дополнительных иммунологических анализов.

[00229] Субпопуляцию спленоцитов ресуспендировали в среде R10 в концентрации 10^7 на мл и по 100 мкл высевали на 96-луночный круглодонный планшет. 100 мкл среды, содержащей объединенные пептиды pMCore или 10 нг/мл PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA), и 500 нг/мл иономицина (Calbiochem, Novabiochem, La Jolla, CA, USA) смешали в качестве положительного контроля или 0,1 % диметилсульфоксид (Sigma, St. Louis, MO, USA) в качестве отрицательного контроля. Все лунки содержали по 5 мкл/мл двух ингибиторов транспорта белков, брефелдин А (GolgiPlug) и моненсин (Golgistop) (All from BD Bioscience). Клетки инкубировали при 37 °C в 5 % CO₂ в течение 5 часов и окрашивали LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 10 минут при 37 °C. Внеклеточное окрашивание проводили, используя антитела, специфичные к мышинным CD3, CD4 и CD8. Спленоциты затем пермеабелизировали и промывали, используя BD CYTOFIX/CYTOPERM и PERM/WASH (BD Bioscience), соответственно.

[00230] *Внутриклеточное окрашивание цитокинов.*

[00231] Внутриклеточные цитокины затем окрашивали антителами к мышинному интерферону-гамма и фактору-альфа некроза опухоли. Субпопуляцию лимфоцитов ресуспендировали в среде R10 в концентрации 10^7 на мл и по 100 мкл высевали на 96-луночный круглодонный планшет. 100 мкл среды, содержащей объединенные пептиды pMCore, или 10 нг/мл PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) и 500 нг/мл иономицина (Calbiochem, Novabiochem, La Jolla, CA, USA) смешали в качестве положительного контроля или 0,1 % диметилсульфоксид (Sigma, St. Louis, MO, USA) в качестве отрицательного контроля. Все лунки содержали по 5 мкл/мл двух ингибиторов транспорта белков, брефелдин А (GolgiPlug) и моненсин (Golgistop) (All from BD Bioscience). Клетки инкубировали при 37 °C в 5 % CO₂ в течение 5 часов и окрашивали LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 10 минут при 37 °C. Внеклеточное окрашивание проводили, используя антитела, специфичные к мышинным CD3, CD4 и CD8. Спленциты затем пермеабелизировали и промывали, используя BD Cytotfix/Cytoperm™ и Perm/Wash™ (BD Bioscience), соответственно. Клетки затем окрашивали внутриклеточно антителами к интерферону-гамма, фактору-альфа некроза опухоли, интрелейкину-2 и лизосомно-ассоциированному мембранному белку 1.

[00232] Конъюгированные противомышьи антитела использовали во время внеклеточного и внутриклеточного окрашивания, включая: CD3-фикоэритрин/Cy7 (PE/Cy7), CD4-перидинин хлорофилловый белок (PerCP), CD8-аллофикоцианин (APC), IFN- γ -Alexa Fluor 700, TNF- α -флюоросцеина изотиоцианат (FITC) и IL-2-фикоэритриноцианин (PE) (все от BD Biosciences, San Jose, CA).

[00233] Средний индуцированный HBsAg-специфический IFN- γ Т-клеточный ответ был сильным при 2000 ($\pm$ 210) SFU на миллион спленцитов. Интересно, что внутриклеточное окрашивание стимулированных спленцитов показало, что клетки CD4⁺ и CD8⁺ продуцируют почти подобное количество антигенспецифического IFN- γ , 0,74 и 0,94, соответственно, но разные уровни TNF- α с примерно 0,3 % и 1,5 % клеток CD4⁺ и CD8⁺, соответственно (Фигура 22). Аналогичная тенденция наблюдалась с клетками, которые были дважды положительными для обоих цитокинов. Наблюдалось меньше дважды положительных клеток CD4⁺, приблизительно 0,2 %, в селезенке, чем дважды положительных клеток CD8⁺, которые составляют 0,7 % (Фигура 23).

[00234] Миграция HBV специфических Т-клеток в печень также была продемонстрирована у животных, которым вводили ДНК-вакцину pMCore. Нацеливание Т-клеток, специфических к коровому антигену HBV, с высокой частотой и эффекторной функцией к печени является целью для развития HBV-иммунной терапии. После иммунизации животных умерщвляли и их печень удаляли и определяли миграцию

HBV-специфических эффекторных Т-клеток в печень. Результаты показали, что вакцина рМCore приводит эффекторные Т-клетки в печень *in vivo*. Фигуры 24 и-25 демонстрируют интерферон- γ Т-клеточный ответ в печени, а Фигуры 26 и 27 демонстрируют иммунный ответ фактора- α некроза опухоли в печени и повышенную реакцию, которая возникает в результате вакцинации рМCore.

[00235] М-коровый консенсусный иммуноген, кодируемый ДНК-конструктом рМCore, приводит к строго уравновешенным CD4+/CD8+ Т-клеточным иммунным ответам. Индуцированные Т-клетки движутся к печени с высокой частотой и демонстрируют корректный эффекторный фенотип иммунного клиренса после HBV-инфекции, поддерживая дальнейшее развитие этой иммунной терапевтической вакцины.

[00236] Также исследовали способность внутрипеченочных антиген-специфических Т-клеток продуцировать цитокины после ДНК-иммунизации. В каждую печень путем непосредственной инъекции вводили 1мл PBS в печеночную вену каждой мыши. В частности, изымали печень, измельчали и ресуспендировали в 5 мл 44 % изотонического Percoll. Смеси заливали 3 мл 66 % изотонического Percoll и центрифугировали в течение 20 минут при 2000 оборотов в минуту для градиентного разделения. Лимфоциты собирали и промывали 10 мл R10 и обрабатывали лизисным буфером ACK по мере необходимости. Как CD4, так и CD8 Т-клетки, выделенные из печени, продуцировали IFN- γ и TNF- α , когда стимулировались *in vitro* пептидом HBsAg (Фигуры 28 и 29). В то время как CD4 Т-клетки демонстрировали высокий процент двойных продуцентов, CD8 демонстрировали незначительное количество или отсутствие IFN- γ +TNF- α + продуцирующих клеток. Зато, большинство CD8 Т-клеток продуцировало или только IFN- γ или TNF- α . В печени наблюдалось накопление HBsAg-специфических CD4 Т-клеток в противоположность селезенке. Процент HBsAg-специфических CD4 Т дважды положительных Т-клеток в покоей печени был сопоставимым с клетками, наблюдаемыми в селезенке. Более того, периферические CD8 Т-клетки были убедительно лучшими двойными продуцентами, чем резидентные CD8 Т-клетки печени. Также наблюдались антитело-продуцирующие способности резидентных В-клеток печени иммунизированных мышей. Интересно, что печень в качестве слизистого органа продуцировала больше антиген-специфических IgA, чем IgG (Фигура 30), наблюдение, которое ранее не исследовалось.

[00237] На Фигуре 31 показаны клеточные иммунные реакции, вызванные рМ-Core с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISPOT). Спленоциты стимулировали двумя пулами 15-мерных пептидов, охватывающих полную длину рМCore и перекрывающихся 8 аминокислотами. 200000 спленоцитами в среде R10 засеивали 96-луночный планшет, покрытый IFN- γ -захватывающим антителом (система R&D),

стимулировали в течение ночи в присутствии специфического пептидного пула при 37°C в 5 % CO₂. Клетки смыли, а планшеты инкубировали в течение ночи с биотинилированным противомышиным IFN-γ-обнаруживающим антителом (система R&D). Стрептавидин-щелочную фосфатазу и 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат р-толуидиновую соль и нитросиний тетразолия хлорид использовали для обнаружения пятен. Пятна подсчитывали, используя автоматизированный ELISPOT-ридер (ЦТЛ Limited). Как показано на Фигуре 31, иммунизация рMCore вызывает сильные клеточные иммунные реакции. Среднее HBcAg-специфических IFN-γ Т-клеточных реакций составляло приблизительно 2000 (± 210) SFU на миллион спленоцитов.

[00238] Анализ ELISPOT использовали для дальнейшего исследования IFN-γ. В частности, спленоциты стимулировали двумя пулами 15-мерных пептидов, охватывающих полную длину HBcAg и перекрывающихся 8 аминокислотами. Всего было 33 индивидуальных пептидов, которые были объединены случайным образом с первыми 17 пептидами в пул 1 и последними 16 в пул 2. IgEL и HA-метка исключались, чтобы сделать пептид как можно более ближе к природному антигену. 200000 спленоцитами в среде R10 засеивали 96-луночный планшет, покрытую IFN-γ-захватывающим антителом (система R&D), стимулировали в течение ночи в присутствии специфического пептидного пула при 37°C в 5 % CO₂. Клетки смыли, а планшеты инкубировали в течение ночи с биотинилированным противомышиным IFN-γ-обнаруживающим антителом (система R&D). Стрептавидин-щелочную фосфатазу и 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат р-толуидиновую соль и нитросиний тетразолия хлорид использовали для обнаружения пятен. Пятна подсчитывали, используя автоматизированный ELISPOT-ридер (ЦТЛ Limited). Наблюдалось, что через одну неделю после финальной иммунизации рMCore-иммунизированные мыши демонстрировали признаки сильных HBcAg Т-клеточных реакций, как было определено с помощью IFN-γ ELISPOT-анализа после *ex vivo* стимуляции. На Фигуре 32 показано, что доминантные эпитопы смещены в сторону пептидного пула 2.

[00239] Исследования *in vivo* цитотоксичности проводили, используя мечение карбоксифлюороосцеиндиацетатсукцинимидным эфиром (CFSE) в сочетании с проточной цитометрией. Спленоциты взяли от мишей, не использовавшихся ранее в опытах, и распределили в две популяции. Одна популяция, CFSE-сильно меченные, пульсировала с релевантным пептидом (например, капсидными пептидами HBV). Другая популяция, CFSE-слабо меченные, пульсировала с иррелевантным пептидом (например, NS3-пептидами HCV). Объединяли меченные, обработанные пептидом клетки и использовали в экспериментах адоптивных пересадок, в которых проводили проточный

анализ. Объединенные популяции обработанных, меченных клеток-мишеней вводили двум группам мышей, контрольной группе и иммунизированной группе. Спленоциты выделяли от каждой группы мышей и образцы прогоняли на проточном цитометре. Измеряли количество CFSE. Как правило, в таких экспериментах образуется два пика, первый отвечает иррелевантному пептиду; второй отвечает иммунизирующему пептиду на пике, указывающем больший CFSE.

[00240] Фигура 33 демонстрирует, что CD8 Т-клетка, индуцированная вакцинацией, может специфически элиминировать клетки-мишени *in vivo*. Результаты демонстрируют, что образцы селезенки и печени от мышей, ранее не использовавшихся в опытах, содержали почти равные количества клеток, которые были на пиках иррелевантного и релевантного пептидов, между тем, как результаты показали, что среди иммунизированных групп пики клеток, полученных из селезенки и печени, пульсирующие с релевантным пептидом, были значительно меньше, чем с иррелевантным пептидом. Эти данные демонстрируют, что клетки-мишени, обработанные HBV-пептидом, специфически элиминировались у мышей, иммунизированных HBV-вакциной, но не у неиммунизированных мышей. Любая элиминация клеток-мишеней, обработанных иррелевантным пептидом, если вообще происходила, была такой же у мышей, иммунизированных HBV-вакциной, и неиммунизированных мышей и значительно ниже, чем элиминация клеток-мишеней, обработанных HBV-пептидом.

[00241] Способность HBV-специфических CD8 Т-клеток, индуцированных после ДНК-иммунизации, специфически элиминировать клетки-мишени *in vivo* исследовалась дополнительно. Человеческие ЦТЛ, которые имеют целью коровый антиген, являются важными в сильном клиренсе HBV в сравнении с хронической инфекцией. Через одну неделю после финальной иммунизации 4 мышам из каждой группы, иммунизированной pVax или pMCore, адопционно пересаживали спленоциты-мишени, которые пульсируют с HBsAg (релевантный) или HCV-NS3/4A (иррелевантный) пептидами. Кратко, спленоциты от мышей, ранее не использовавшихся в опытах (наивные), окрашивали либо 1 мкМ или 1 нМ CFDA SE (invitrogen). Затем меченные спленоциты покрывали индикаторными пептидами (1мкМ) и по 10^7 клеток из каждой популяции внутривенно инъектировали наивным или иммунизированным мышам. Спустя 24 или 90 часов, клетки из селезенки и печени выделяли и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент лизиса клеток подсчитывали следующим образом: $100 - \left(\left(\frac{\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках}}{\% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках}} \right) / \left(\frac{\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках}}{\% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках}} \right) \right)$

неинфицированных клетках)] x 100). С помощью селекции на CFSE-меченных спленоцитах, чтобы проследить лизис клеток, наблюдалось, что рMCore-вакцинированные мыши способны индуцировать сильный специфический лизис антиген-пульсирующих клеток-мишеней, как показано на Фигуре 34. Средний процент лизиса клеток, наблюдаемый в селезенке, составил приблизительно 83 %, между тем, как средний процент лизиса клеток в печени составил 76 %, демонстрируя, что индуцированные вакцинацией ЦТЛ, которые мигрируют и удерживаются в печени, способны лизировать HBV-пептид-пульсирующие клетки-мишени. Это было первое исследование для демонстрации индуцирования HBsAg-специфических ЦТЛ реакций в печени с помощью любого метода и, в частности, с помощью системной иммунизации. Эти данные свидетельствуют о том, что периферическая иммунизация может индуцировать эффекторные клетки, которые могут мигрировать в печень и лизировать клетки-мишени.

[00242] Фигура 35 показывает данные, собранные из анализа Т-клеточной пролиферации с использованием CFSE-мечения. Сравнивали процент пролиферации клеток CD3+CD4+ и клеток CD3+CD8+, обработанных вектором рVax (контроль) или плазмидой рMCore, которая экспрессирует HBV М-кор. Кратко, выделенные спленоциты окрашивали карбоксифлюоросцеиндиацетатом, сукцинимидиловым эфиром (CFDA-SE) Cell Tracer Kit (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Окрашенные клетки трижды промывали солевым раствором и стимулировали рMCore-специфическими перекрывающимися пептидами. Клетки инкубировали при 37 °C в течение 96 часов. Спустя 48 часов, 50 % культуральной среды удаляли и помещали в свежую R10. На 4 день, клетки собирали и окрашивали CD3, CD4 и CD8-специфическими моноклональными антителами (BD Pharmingen). Клетки фиксировали PBS с 1 % параформальдегидом (PFA) и приобретенным FACScalibur Becton Dickinson). Данные анализировали, используя программу FlowJo. CFSE низкая и CFSE средняя популяция была признана в качестве пролиферировавших клеток. Как показано на Фигуре 35, CD3+CD8+ Т-клетки, выделенные из селезенки, пролиферировали больше по сравнению с CD3+CD4+ Т-клетками.

[00243] Дальнейшие эксперименты с анализом Т-клеточной пролиферации также использовали CFSE-мечение. В частности, выделенные спленоциты окрашивали карбоксифлюоросцеиндиацетатом, сукцинимидиловым эфиром (CFDA-SE) Cell Tracer Kit (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Окрашенные клетки трижды промывали солевым раствором и засеивали в 96-луночный U-донный планшет в общем объеме 200 мкл среды, содержащей HBsAg объединенных пептидов в концентрации 1 мкг/мл. клетки инкубировали при 37 °C в течение 96 часов. Спустя 48 часов, 50 % культуральной среды отбирали и переносили в свежую R10. Разница в продуцировании цитокинов между CD4 и

CD8 Т-клетками, как описано выше, была сравнима с их максимальной пролиферативной способностью. После 4 дней стимуляции антиген-специфическими пептидами CD8 + Т-клетки, пролиферирующие более чем в 2 раза выше, чем CD4⁺ клетки (Фигура 36), показывают четкое CD8 Т-клеточное смещение в ответ.

[00244] На Фигурах 37А и 37В представлены данные ELISA, демонстрирующие сравнение антитела к кору HBV в серийном разведении сыворотки от животных, обработанных вектором pVax vector (контроль) или плазмидой pMCore, которая экспрессирует HBV М-кор. Кратко, высокосвязывающие планшеты ELISA (Costar, Corning, NY) покрывали 1мкг/мл белка HBcAg в PBS при 4 °C в течение 24 часов, а затем промывали PBS-Tween и блокировали PBS, содержащим 1 % BSA, в течение 2 часов при комнатной температуре. Серийно разведенные образцы сыворотки добавили в лунки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания связанное сывороточное антитело было обнаружено с помощью HRP-меченого козьего противомышиного IgG (Фигура 37А) или IgA (Фигура 37В). Пероксидазокоњуированные Ab были обнаружены с использованием тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата, а OD при 450 нм была измерена с помощью Multiscan ELISA планшет-ридера. Наблюдали антиген-специфический гуморальный ответ в сыворотках иммунизированных мышей.

[00245] Для дальнейшего изучения иммунного ответа, индуцированного у pMCore-иммунизированных мышей, антиген-специфические IgG и IgA реакции анализировали с помощью В-клеточного ELISpot, а также в ELISA с использованием спленоцитов и сывороток, соответственно, собранных после вакцинации. Спленоциты выделяли и очищали, как описано выше. Для ELISA, высокосвязывающие планшеты ELISA (Costar, Corning, NY) покрывали 1 мкг/мл белка HBcAg в PBS при 4 °C в течение 24 ч, а затем промывали 0,1 % PBS-Tween, а затем блокировали PBS, содержащим 1 % BSA, в течение 2 часов при комнатной температуре. Серийно разведенные образцы сыворотки добавили в лунки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания связанное сывороточное антитело было обнаружено с помощью HRP-меченого козьего противомышиного IgGили IgA. Пероксидазокоњуированные Ab были обнаружены с использованием тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата, а OD при 450 нм была измерена с помощью Multiscan ELISA планшет-ридера.. Высокий IgG и IgA титр наблюдался в сыворотке иммунизированных мышей по сравнению с контрольными животными (Фигура 38). В-клеточный ELISpot иммунизированных мышей (Фигура 39) демонстрирует HBcAg-специфические IgG и IgA приблизительно в 200 SFU и 100 SFU на миллион клеток, соответственно. Это иллюстрирует активацию В-клеточного компартмента иммунизацией pMCore. Искусственная плазида HBcAg эффективно

индуцировала антиген-специфические клеточные и гуморальные реакций после 3 иммунизаций.

[00246] Фигура 40 демонстрирует процент TNF- α и IFN- γ из CD4+ и CD8+ клеток селезенки и печени.

[00247] В отсутствие небольших модельных животных для HBV, был использован HBcAg для временной трансфекции печени мышей путем гидродинамической инъекции. Печени иммунизированных мышей трансфицировали рMCore или HCV NS3/4A. Иммуногистохимическое окрашивание через три дня после трансфекции показало клиренс HBcAg-трансфицированных гепатоцитов по сравнению с NS3/4A-трансфицированными гепатоцитами. Уровни ALT в сыворотке измеряли чтобы гарантировать, что клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, не вызывал повреждение печени. Результаты на Фигуре 41 показали, что клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, не вызывал повреждение печени.

[00248] Прямая гидродинамическая инъекция была также использована для временной трансфекции печени мышей. Здесь иммунизированные или наивные печени мышей трансфицировались либо рMCore или иррелевантной плазмидой, кодирующей антигены гепатита С (HCV NS3/4A) Кратко, иммунизированных мышей инъецировали внутривенно 100 мкг плазмиды в 2 мл (около 10 % объема веса мыши) раствора Рингера в течение 7 секунд для временной трансфекции печени. Экспрессию или клиренс плазмиды определяли путем окрашивания печени моноклональными антителами к НА. Иммуногистохимическое окрашивание через три дня после трансфекции (Фигура 42) показало клиренс HBcAg-трансфецированных гепатоцитов по сравнению с NS3/4A-трансфицированными печенями животных. CD8 Т-клетки, выделенные из рMCore гидродинамически инъецированных мышей, на Фигуре 43 показали более высокую частоту IFN- γ^+ CD107a $^+$, маркера дегрануляции, по сравнению с иммунизированными печенями животных, трансфицированных иррелевантной плазмиды.

[00249] Так как клиренс рMCore-трансфицированных гепатоцитов, кажется, включает дегрануляцию, считалось, что лизис клеток может привести к повреждению печени. Чтобы исследовать, способны ли иммунизированные мыши очищаться от трансфицированных гепатоцитов, не вызывая значительного повреждение печени, был использован анализ измерения активности фермента аланинаминотрансферазы (ALT), чтобы указать на наличие повреждений печени при повышенных уровнях фермента в сыворотке (Фигура 44). В частности, активность сывороточной аланинаминотрансферазы (ALT) измеряли с использованием анализа, базирующегося на оптической плотности (Stanbio Laboratory), на BioTek Synergy 2 микропланшет-ридере. Результаты представлены в виде единиц на литр

(Ед./л) и представляют собой количество фермента, который окисляет один мкмоль/л NADH в минуту. Эти исследования показали, что удельный клиренс HBsAg-трансфицированных гепатоцитов не повышает уровни ALT у трансфицированных иммунизированных животных за пределы нормального диапазона 5-30 Ед./л (Фигура 44).

ПРИМЕР 2

Поверхностные белки HBV

1. Конструирование HBsAg ДНК-вакцины

[00250] Использование консенсусных иммуногенов в контексте варьируемых патогенов с сильно изменяющимися антигенными последовательностями может быть эффективным в индукции более прямого иммунного ответа на борьбу с природным вирусным разнообразием по сравнению с иммунизацией одним природным иммуногеном. Восемьдесят две последовательности больших поверхностных антигенов генотипа А гепатита и семьдесят последовательностей больших поверхностных антигенов генотипа С гепатита были собраны из GenBank, а консенсусные последовательности генотип-специфических поверхностных антигенов и небольших поверхностных антигенов были получены после выполнения нескольких выравниваний. Программное обеспечение Clustal X (версия 1.8), используемое для создания нескольких выравниваний, использовали для создания консенсусной последовательности.

[00251] Были получены ДНК-конструкты, кодирующие только основной S или preS1/S2 плюс основной S поверхностный белок оболочки HBV с использованием консенсусных последовательностей, кодирующих генотипы А или С, которые являются одними из наиболее распространенных генотипов в мире (Фигура 52А, Фигуры 59А-59D). Разницу в иммунных ответах, вызванных конструктами, кодирующими полноразмерные HB или только основной S, исследовали по поводу того, как аминоконцевой домен в preS1 может помочь вирусному прикреплению и вхождению, тогда как карбоксильный концевой preS2 может быть вовлечен в инфекционность. Конструкты только основного S были названы небольшими HB (SHB), тогда как плазмиды, которые содержали preS1/S2 были названы большими HB (LHB).

[00252] Консенсусные поверхностные белки HBV были разработаны с эпитопными последовательностями из первичных изолятов генотипа А HBV, так что полученный консенсусный белок имел идентичность последовательности, составляющую от 94,2 процента до 99,8 процента, с поверхностными белками первичных изолятов генотипа А HBV. В частности, были разработаны две версии такого консенсусного белка (Фигура 4 и Фигура 52В). Один включал белок S, также упоминается как SHBs-A, в котором

последовательность SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты и SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность. Второй включал белок S, пре-S2 и пре-S1, также упоминается как LHBs-A, в котором последовательность SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты и SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность.

[00253] Консенсусные поверхностные белки HBV также были разработаны из эпитопных последовательностей первичных изолятов генотипа С HBV, так что полученный консенсусный белок имел идентичность последовательности, составляющую от 96,5 процента до 99,8 процента, с поверхностными белками первичных изолятов генотипа С HBV. В частности, было разработано две версии такого консенсусного белка (Фигура 4).). Один включал белок S, также упоминается как SHBs-C, в котором SEQ ID NO:15 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты и SEQ ID NO:16 представляет собой аминокислотную последовательность. Второй включал белок S, пре-S2 и пре-S1, также упоминается как LHBs-C, в котором SEQ ID NO:11 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты и SEQ ID NO:12 представляет собой аминокислотную последовательность.

[00254] После получения консенсусных последовательностей больших и небольших поверхностных антигенов консенсусных генотипов А или С проводили кодон-оптимизацию и РНК-оптимизацию. Для указанных выше консенсусных поверхностных антигенов HBV, эндопротеолитические сайты расщепления были введены в консенсусные поверхностные антигены HBV для обеспечения надлежащего фолдинга белка и лучшего процессирования антигена (Фигура 3). Использование кодонов в консенсусных поверхностных антигенах HBV было модифицировано, чтобы отразить кодонное смещение человеческих генов. Кроме того, удалось избежать областей с очень высоким (например, больше, чем 80 процентов) или очень низким (например, меньше, чем 30 процентов) содержанием GC, где находились цис-действующие мотивы, такие как внутренние ТАТА-боксы, повторные последовательности и структурированные последовательности. Последовательность Козак ввели в консенсусные поверхностные антигены HBV для повышения инициации трансляции. Высокоэффективную лидерную последовательность IgE добавили против хода транскрипции стартового кодона для повышения и увеличения белковой экспрессии, как описано ранее (Yan *et al.*, *Vaccine* (2008) 26:5210-5215) (смотри Фигуры 3 и 52B). Были синтезированы оптимизированные гены и подтверждены последовательности.

[00255] Консенсусные HBV-поверхностные антигены SHBs-A, LHBs-A, SHBs-C и LHBs-C были клонированы в вектор экспрессии для получения конструкторов pSHb A (также

упоминается как pSHb-A), pLHb A (также упоминается как pLHb-A), pSHb C (также упоминается как pSHb-C) и pLHb C (также упоминается как pLHb-C), соответственно (Фигура 4). Синтезированные гены больших и небольших поверхностных антигенов генотипа А субклонировали в вектор экспрессии pGX0001 в сайты *BamHI* и *XhoI*, тогда как синтезированные гены больших и небольших поверхностных антигенов генотипа С субклонировали в pGX0001 в сайты *EcoRI* и *NotI*. Получение плазмиды HBsAg (pMCore) описано в Примере 1.

2. *In vitro* экспрессия комбинированных ДНК-вакцин HBsAg

[00256] Клеточные линии рабдосаркомы (RD) и карциномы печени человека (Hep G2) трансфицировали pLHBs-A, pLHBs-C, pSHBs-A и pSHBs-C, используя TurboFect™ (Thermo Scientific) согласно инструкциям производителя. Для внутриклеточного анализа клетки промывали и фиксировали, используя Cytofix/Cytoperm kit (BD PharMingen, San Diego, CA) согласно инструкциям производителя. После фиксации клетки окрашивали сывороткой от иммунизированных мышей или мышиным моноклональным антителом к поверхности вируса гепатита В (Abcam, Cambridge, MA). Затем клетки окрашивали вторичным противомышиным антителом, конъюгированным с изотиоцианатом флуоресцеина (BD Biosciences, San Jose, CA). клетки промывали и фиксировали 2 % параформальдегидом. Окрашенные и зафиксированные клетки были получены на приборе LSR с использованием программного обеспечения CellQuest (BD Biosciences) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

[00257] После конструирования и оптимизации четырех конструктов, экспрессия белка из каждой плазмиды была подтверждена внутриклеточным окрашиванием. RD или Hep G2 клетки временно трансфицировали отдельными конструктами или пустым вектором pGX0001 в качестве контроля. Клетки окрашивали внутриклеточно через 48 часов с помощью анти-HBsAg поликлональной мышинной сыворотки или коммерчески приобретенного мышинного моноклонального антитела. Экспрессия была подтверждена с помощью проточной цитометрии (Фигура 52С). Повышенные уровни экспрессии белка HBs наблюдались в клетках, трансфицированных каждым конструктом, по сравнению с клетками, трансфицированными пустыми векторами (pGX0001).

ПРИМЕР 3

Иммуногенность отдельных искусственных HBsAg ДНК-плазмид в моделях небольших животных

[00258] После исследований экспрессии, способность отдельных плазмид индуцировать антигенспецифические гуморальные и клеточные реакции оценивали *in vivo*. Шести-восьми недельные самки мышей Balb/c были приобретены у Jackson Laboratories. Животных содержали в соответствии с нормами National Institutes of Health and the University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee (IACUC). Мышей Balb/c иммунизировали трижды внутримышечно (IM) иммунизировали три раза с 2-недельным интервалом в недели 0, 2 и 4 15 мкг плазмид, экспрессирующих небольшой или большой S-антиген, или контрольной pGX0001. Каждая вакцинация была сразу после электропорации в месте инфекции, как описано выше (Hirao *et al.*, *Vaccine* (2008) 26:440-448).

[00259] Для иммунизации все ДНК разбавляли водой без нуклеазы (Qiagen, Valencia, CA 91355). Каждое животное в группе иммунизации получило в общей сложности три внутримышечные иммунизации по 15 мкг соответствующей плазмиды. Для комплексного изучения, каждое животное получило в общей сложности по 45 мкг ДНК в обе передние большеберцовые (TA) мышцы. Каждая иммунизация сопровождалась *in vivo* электропорацией с устройством CELLECTRA[®] для адаптивной постоянноточковой электропорации (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). По два 0,2 амперных постоянноточковых прямоугольных импульса были доставлены через треугольную 3-электродную решетку, состоящую из 26-калиберных твердых электродов из нержавеющей стали, полностью погруженных в мышцу. Каждый импульс был длительностью в 52 миллисекунды с 1-секундной задержкой между импульсами. Индуцированные вакциной гуморальные ответы были рассмотрены впервые, поскольку давнишние ДНК-вакцины не были в состоянии вызывать значительные реакции антител.

1. Анализ антител с помощью ELISA

[00260] ELISA проводили для анализа антиген-специфических IgG реакций в сыворотке, собранной от мышей спустя 7 дней после каждой иммунизации с использованием полноразмерного белка HBsAg в качестве антигена-мишени. Высокосвязывающие планшеты ELISA plates (Costar, Corning, NY) покрывали 1 мкг/мл рекомбинантного белка в PBS при 4 °C в течение 24 часов, а затем промывали 0,1 % PBS-Tween и блокировали PBS, содержащим 1 % BSA в течение 2 часов при комнатной температуре. стерильно разведенные образцы сыворотки добавили в лунки и инкубировали в течение 1 часа при

комнатной температуре. после промывания связанный IgG обнаруживали с помощью HRP-меченного козьего противомышиного IgG. Пероксидазно конъюгированные антитела обнаруживали с использованием тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата, а значения OD при 450 нм измеряли с помощью Multiscan ELISA планшет-ридера.

[00261] Обе pLHBs и pSHBs из любого генотипа были высоко иммуногенными. Дополнительная иммунизация повысила эти реакции с реакциями антител, демонстрируя наибольшее увеличение спустя две недели после третьей иммунизации (Фигура 53А). В противоположность этому, мыши, иммунизированные только контрольной pGX0001, демонстрировали фоновый уровень реакций IgG. Хотя некоторые различия в амплитуде реакции IgG были обнаружены в каждой группе, постепенное повышение после каждой иммунизации было постоянным в пределах групп.

2. IFN- γ ELISPOT

[00262] Способность конструкторов pLHBs-A, pLHBs-C, pSHBs-A и pSHBs-C индуцировать клеточные иммунные реакции исследовалась с помощью IFN- γ ELISPOT. Matching HepB consensus core, 15-мерные пептиды поверхностного антигена А и поверхностного антигена С синтезировали с помощью Genescript (Piscataway, NJ) и ресуспендировали в DMSO и объединяли в пул при приблизительно конечной концентрации 1 мкг/мл каждого пептида. Клеточные реакции измеряли с использованием IFN- γ ELISpot (MabTech, Sweden) согласно инструкциям производителя. Образцы были проведены в трех повторностях с R10 (RPMI 1640, содержащей L-глутамин с 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой и 1 % пенициллина/стрептомицина) и контролем PMA/ИМ (PMA 0,1 мкг/мл и иономицином 0,5 мкг/мл, Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

[00263] HBsAg-специфические IFN- γ секретирующие клетки проанализировали в ответ на два пула искусственных пептидов, полученных из консенсусного большого поверхностного белка HBV. Первый пептидный пул содержал пептиды, охватывающие preS1 и preS2 белки, тогда как второй пептидный пул состоял из пептидов, охватывающих основной S-белок. Все четыре консенсусные конструкторы были способны индуцировать сильные реакции Т-клеток, а перекрестная иммунная реактивность наблюдалась в пределах двух генотипов (Фигура 53В). Хотя, вместе preS белки почти одинаковы по размеру с основным S-белком, было эпитоппное смещения в клеточноопосредованных иммунитетных (СМІ) реакциях по отношению к основному S-белку. Эти результаты указывают, что искусственные ДНК-иммуногены, кодирующие полноразмерный поверхностный антиген или только основную S-часть поверхностного антигена HBV, демонстрируют

иммуногенность, которая является достаточно разнотипной, чтобы нацелиться на основные генотипы HBV. Полноразмерные конструкторы не продемонстрировали существенных отличий в индукции IgG к природному белку HBV по сравнению с более короткими конструкторами.

3. Картирование поверхностных антигенных (15-мерных) пептидов HBV

[00264] После подтверждения амплитуды СМІ была исследована ширина клеточных реакций на генотип-специфические мишени. Соответственно, наборы Интерферон-гамма ELISPOT анализов проводили против различных пулов матричных пептидов. Два комплекта пептидов, охватывающих белок LHBs-A или LHBs-C, каждый из которых содержал 15 аминокислотных остатков, перекрывающихся 8 аминокислотами, были синтезированы с помощью GenScript (Piscataway, NJ). Для того, чтобы отобразить иммуно-доминантные эпитопы, два комплекта пептидов были объединены в 16 или 12 пулов для больших или малых групп HBsAg соответственно. IFN- γ ELISpot анализ осуществляли, как описано выше. Эти различные комплекты объединенных пептидов были использованы в матричном анализе для картирования эпитопов каждого конструктора. Реакции в более 50 SFU на миллион клеток считались положительными.

[00265] Эти данные показывают, что различные эпитопные реакции были вызваны этими искусственными плазмидами поверхностного антигена у мышей линии BALB/c. Наблюдались в 12 из 16 положительных LHBs-A матричных пулов у pLHBs-A-иммунизированных мышей и 8 из 16 положительных LHBs-C матричных пулов у pLHBs-C-иммунизированных мышей. Небольшие плазмиды HBS показали более высокие количества реакций с pSHBs-A-иммунизированными мышами, отвечая на 9 из 12 SHBs-A матричных пептидов, в то время как pSHBs-C-иммунизированные мыши демонстрировали ответы на все матричные пулы SHBs-C (Фигура 53C). Эти данные указывают на высокую степень широких перекрестно-реактивных клеточные реакции, вызванных этими 4 HBs-конструкторами. В результате, эти генотип-специфические консенсусные вакцины могут быть способны индуцировать перекрестно-реактивные клеточные реакции против различных первичных поверхностных антигенных изолятов, которые до 8 % отличаются от этих генотипов.

ПРИМЕР 4

Анализ цитотоксичности и антиген-специфических ЦТЛ, обнаруженных в печени и селезенках вакцинированных мышей

[00266] Противовирусные эффекторные CD8 Т-клетки индуцируют цитотоксичность, которая представляет собой клеточную активность для элиминирования HBV-инфицированных гепатоцитов. Способность конструкторов генерировать HBs-специфические ЦТЛ в периферии, которые могут также являются родными для печени иммунизированных мышей, оценивали с помощью *in vivo* анализа цитотоксичности. Спленоциты наивных мышей окрашивали либо 1 мкМ (высокая) или 1 нМ (низкая) CFDA SE (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Меченые спленоциты затем покрывали указанными пептидами (релевантными или иррелевантными пептидами) (1 мкМ) и по 10^7 клеток каждой популяции внутривенно вводили наивным или иммунизированным мышам. Спустя 90 часов, выделяли клетки из крови, селезенки или печени и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент лизиса клеток рассчитывали следующим образом: $100 - [(\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках}) / (\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках})] \times 100$.

[00267] Миграция HBV-специфических ЦТЛ в печень имеет важное значение для внутрипеченочного элиминирования инфицированных клеток. Антиген-специфическая элиминация адоптивно пересаженных спленоцитов-мишеней, которые пульсировали с искусственными пептидами HBsAg, не наблюдалась. Средний процент лизиса клеток-мишеней в селезенке у мышей, иммунизированных конструкторами SHBs, составлял 39 % и 48 % для генотипа А и С, соответственно. Средняя элиминация клеток-мишеней для конструкторов LHBs составила 35 % для генотипа А и 51 % для генотипа С. Клиренс был сильным, но не столь мощным, как реакция, наблюдаемая у мышей, которые были иммунизированы только коровой Ag-плазмидой, как описано в Примере 1, у которых 83 % и 76 % целевой коиренс был отмечен в селезенке и печени, соответственно. Демонстрация того, что ЦТЛ, генерированные против HBs, могут устранять антиген-мишень в печени, способствует тому, что она поддерживает комбинацию HBs и HBc для дальнейшего расширения клеточной силы и ограничения утечки. Процент элиминации клеток-мишеней в печени составил 45 % и 66 % для SHBs-A и SHBs-C, и 60 % и 74 % в группах LHBs-A и LHBs-C (Фигура 54). Имея вакциносpezifический ЦТЛ трафик в печень, орган, как

известно, подавляет Т-клеточный ответ и индуцирует толерантность, подчеркивает эффективность конструкторов в стимулировании функционального СМІ.

ПРИМЕР 5

Иммуногенность HBsAg-HBcAg ДНК-коктейля

[00268] Поскольку иммунизация каждой искусственной HBsAg-плазмидой вызвала широкие перекрестно-реактивные иммунные ответы, ответы были расширены за пределы поверхностного антигена для дальнейшего повышения иммуногенности в отношении различных антигенов в пределах вируса. Плазмиды HBs объединили с плазмидой, кодирующей HBcAg (pMCore), для создания HBs-HBc ДНК-вакцинных коктейлей для иммунизации, чтобы определить, повысит ли коктейль клеточную реакцию путём повышения количества иммунных эпитопов, которые Т-клетка будет распознавать для элиминирования, так как коровий антиген HBV участвует в вирусном клиренсе через индукцию HBsAg-специфических ЦТЛ реакций.

[00269] Пять групп мышей, иммунизированных вакцинными коктейлями только антигенов HBs или объединенных антигенов HBs и HBc. Каждая мышь получила две инъекции с последующей электропорацией в обеих ТА. Мышей иммунизировали либо коктейлями, содержащими только поверхностные антигены (обеих генотипов), или коктейлями, содержащими как поверхностные антигены, так и консенсусную плазмиду корового антигена (pMCore), описанную в Примере 1 (смотри Таблицу 3). Мыши, иммунизированные только HBsAg, генерировали высокий титр IgG в своих сыворотках. Интересно, похожие титры наблюдались в группе SHBs-pMCore, но были менее сильными в группе коктейлей LHBs-pMCore (Фигура 55А). Увеличение антигена-мишени, возможно, вызвало некоторое торможение антител.

Таблица 3. Иммунизационные группы мышей для исследования ДНК-коктейлей HBs-HBc.

Группы мышей	ДНК-коктейль
Группа 1	pGX0001only
Группа 2	pLHBs-A/pLHBs-C
Группа 3	pSHBs-A/pSHBs-C
Группа 4	pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore
Группа 5	pSHBs-A/pSHBs-C/pMCore

[00270] Для дальнейшего изучения иммунного ответа, вызываемого HBS-HBc-иммунизированными мышами, оценивали продуцирование IFN-γ из каждой

иммунизированной группы. Средние SFU на миллион спленоцитов для групп, не имеющих рМCore, составило 689 и 666 для генотипа А и 1160 и 1312 против пептидов генотипа С, соответственно. Кроме того, добавление рМCore в среднем увеличило общее SFU на миллион спленоцитов на 400 точек против генотипа С и в два раза реакцию, когда спленоциты стимулировали пептидами генотипа А (Фигура 55В).

[00271] CD8 Т-клетки, как известно, являются основными эффекторными клетками, ответственными за клиренс HBV. Важно определить, какой тип Т-клеток является причиной наблюдаемого производства IFN- γ и изучить, могут ли эти Т-клетки вызывать несколько противовирусных функций в ответ на антигенное повторное столкновение, высвобождая другие противовирусные цитокины, такие как TNF- α и IL -2 и маркеры дегрануляции, такие как CD107a. Способность CD8 Т-клеток от иммунизированных мышей индуцировать эти цитокины и маркеры оценивали после *ex vivo* стимуляции пригодными пептидами. Разноцветный проточный анализ показал, что значительный процент CD8 Т-клеток из каждой группы были полифункциональными (т.е. продуцируется несколько цитокинов), активированные CD8 Т-клетки во всех группах (Фигуры 56А - F). Также наблюдалась антиген-специфическая индукция маркера лимфоцитарной дегрануляции, CD107a, в этих CD8 Т-клетках. CD8 Т-клетки из группы коктейлей HBS-HBc показали высокую полифункциональную активность при стимуляции пептидом поверхностного антигена, что подтверждает синергетический эффект в CD8 Т-клеточных противовирусных цитокинах, таких как IFN- γ TNF- α и IL-2, и маркера дегрануляции, CD107a. Также наблюдалась индукция ЦТЛ через клиренс пересаженных антигенпульсирующих клеток. В то время как имелось уменьшение ответов антител к HBs для коктейлей, включая конструкции LHBS, коктейли вакцин SHBs-рМCore поддерживали гуморальные ответы, обнаруженные у животных, иммунизированных только SHBs.

ПРИМЕР 6

Иммунизация резус-макак коктейлем индуцирует сильные клеточные HBs- и HBs-специфические и гуморальные HBs-специфические иммунные реакции

[00272] Эффективность ДНК-вакцины предыдущих ДНК-конструктов была последовательно слабой у крупных животных и людей. Сильные ответы антител и Т-клеточные ответы, стимулированные комбинацией рLHBs или рSHBs и рМCore у мышей приводят к оценке иммуногенности этих конструктов в модели нечеловекообразных приматов (NHP), который более точно имитирует иммунный ответ человека. Это препятствие для иммуногенности вакцины в качестве большего размера и аутбредной МНС-популяции NHP, как правило, приводит к снижению или отсутствию

иммуногенности по сравнению с мышинными моделями. Для этих исследований L-12, Th-1-ведущий цитокин, был добавлен для анализа. Было показано, что IL-12 приводит СМІ, способствуя примированию и экспансии CD8 Т-клеток, при добавлении к иммунизации в качестве адъюванта для усиления иммунного ответа против различных антигенов из различных патогенов. Этот адъювант увеличивает Т-клеточные ответы ДНК-вакцины у мышей и макак, и человека.

1. Вакцинация

[00273] Пятнадцать индийских макак-резусов были размещены в Bioqual (Rockville, MD) в соответствии со стандартами Американской ассоциации по аккредитации в области лабораторных животных. Обезьяны резус-макак были помещены в группы, где каждая группа содержит 5 обезьян. *Смотри* Таблицу 4.

Таблица 3. Группы иммунизации нечеловекообразных приматов

группы обезьян	ДНК-коктейль
группа А	pSHBs-A/pSHBs-C/pMCore
группа В	pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore
группа С	pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore + IL-12

[00274] Одной группе вводили путем внутримышечной (IM) доставки (также известной как *in vivo* электропорация) вакцину, содержащую 1,0 мг каждого из конструкторов pMCore, pSHb A и pSHb C; эта группа называется "небольшой" группой. Второй группе вводили посредством IM доставки вакцину, содержащую 1,0 мг каждого из конструкторов pMCore, pLHb A и pLHb C; эта группа называется "длинной" группой. Третьей группе вводили через IM доставку вакцину, содержащую по 1,0 мг каждого из конструкторов pMCore, pLHb A и pLHb C и 0,4 мг prhIL-12 (плазмида, экспрессирующая оптимизированный резус IL-12); эта группа упоминается как "длинная+IL-12" или "pLHBs+12" группа. Конструкт prhIL-12 кодирует белок IL-12 резус-макаки. ДНК была доставлена к единичному сайту в четырехглавой мышце с последующей *in vivo* EP с помощью устройства постоянного тока CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) 3 импульсами при 0,5 А постоянного тока, длительность импульса 52 мс и 1 с отдыха между импульсы. Животные были вакцинированы в недели 0, 4, 12 и 30.

2. Отбор проб

[00275] Образцы брали от обезьян до иммунизации в неделю 0, а также после каждой иммунизации (т.е., после недель 0, 4 и 12). У животных брали кровь через 2 недели после каждой иммунизации. Кровь (20 мл в каждый момент времени) собирали в пробирки с

ЭДТА, а РВМС выделяли с использованием стандартной процедуры фиколл-гипак с пробирками Accuspin (Sigma-Aldrich). Дополнительные 5 мл крови собирали в пробирки для отделения плазмы, а сыворотку делили на аликвоты для анализа.

[00276] Реакции с высоким титром антител против HBsAg наблюдались после двух иммунизаций pSHBs/pMCore, но не с pLHBs/pMCore. Этот ответ был сопоставим с данными мышинового антитела на Фигуре 55А. Ответ против pLHBs/pMCore поднялся после третьей иммунизации. Адъювант IL-12 повысил титр антител иммунизации коктейлем pLHBs/pMCore уже после всего лишь двух иммунизаций (Фигура 57А).

[00277] Клеточные иммунные реакции от РВМС показывают практически отсутствие HBs или НВС-специфических ответов после первой иммунизации. Однако, ответы наблюдались после второй иммунизации и увеличивались после каждой последующей иммунизации. Сильные ответы свыше 2000 SFU на миллион РВМС наблюдались во всех группах после третьей иммунизации и были в значительной степени направлены против корового антигена. Добавление адъюванта IL-12 усиливало амплитуду Т-клеточного ответа 1000 SFU на миллион РВМС по сравнению с только коктейлем pLHBs/pMCore (Фигура 57В). Для дальнейшего определения широты клеточного ответа были созданы матриксные пулы консенсусных коровых пептидов для определения количества возможных эпитопов. Реакции Т-клеток охватили несколько пептидных пулов со средним ответом на 12 пептидных эпитопов (Фигура 57С). Эти ответы совпадают с полученными ранее, как показано на небольших животных моделях. Эти результаты позволяют предположить, что коктейли способны индуцировать клеточный ответ с сильной амплитудой и шириной, и что амплитуда этих ответов может быть расширена путем добавления IL-12.

[00278] На Фигурах 45-48 показаны клеточные иммунные реакции, вызванные вакцинами, введенными в небольших, длинных и длинная+IL-12 группах. Анализ иммуноферментных пятен (ELISPOT) был использован для определения клеточного иммунного ответа, как описано выше в Примере 1. Как показано на Фигурах 45-48 Т-клеточный ответ повышался с каждой вакцинацией. Однако, коровый антиген HBV был более иммуногенным, чем HBV-поверхностный антиген А и HBV-поверхностный антиген С. Эти данные также показывают, что более длинный консенсусный поверхностный антиген HBV (т.е. включает белок S, preS2 и preS1) является иммуногенным в качестве небольшого поверхностного антигена HBV (т.е. включает белок S).

[00279] Подобно Фигурам 45-48, на Фигуре 49 показаны клеточные иммунные ответы, вызванные вакцинами, введенными в небольших, длинных и длинная+IL-12 группах, как измерено с помощью анализа ELISPOT, кроме того были исследованы различные пулы

пептидов, охватывающие коровый антиген, поверхностный антиген А и поверхностный антиген С. Опять же, ответ Т-клеток повышался с каждой вакцинацией, добавление IL-12 усиливало клеточный иммунный ответ, а длинные и короткие консенсусные поверхностные антигены HBV были аналогично иммуногенными.

[00280] На Фигуре 50 показаны данные ELISA, сравнивающие ответы антител против HBV для небольших, длинных и длинная+IL-12 групп. ELISA были выполнены, как описано выше в Примере 1. Наблюдались антиген-специфические гуморальные реакции в сыворотке, полученной от иммунизированных обезьян. В частности, вакцины, включающие длинный консенсусный поверхностный антиген (т.е. S-белок, preS2 и preS1) имеют лучшую реакцию антитела, которая может быть из-за дополнительных эпитопов, присутствующих в вакцине.

[00281] На Фигуре 51 показаны данные ELISA, сравнивающие ответы антител против HBV для группы длинная+IL-12 до иммунизации (prevac) и после иммунизации в неделю 0, неделю 4 и неделю 12 (то есть, после 1-й, после 2-й и после 3-ей иммунизации, соответственно). ELISA проводили, как описано выше в Примере 1. Данные на Фигуре 51 показывают, что две иммунизации или дозы необходимы для измеримого продуцирования антител. Кроме того, значительное повышение ответа антитела к HBV наблюдали после третьей иммунизации или дозы.

ПРИМЕР 7

[00282] Как и в экспериментах с мышами в Примере 5, спленоциты, т.е. CD8 и CD4 Т-клетки, были выделены от иммунизированных макаков резус в Примере 6 для исследования уровней INF- γ и секреции TNF- α в ответ на введение комбинации консенсусных коровых и консенсусных поверхностных антигенов. CD8 и CD4 Т-клетки были изучены с помощью полифункционального и фенотипического анализа потока, чтобы изучить секрецию фактора некроза опухоли, гамма-интерферона и CD107a из этих CD8 и CD4 Т-клеток, чтобы определить, имеют ли CD8 и CD4 Т-клетки иммунизированных обезьян из Примера 6 сходные характеристики с мышинными CD8 и CD4 Т-клетками, изученными в Примере 1.

[00283] Для дальнейшего определения функции клеточного иммунного ответа, внутриклеточное окрашивание противовирусных цитокинов проводили после стимуляции коровых и поверхностных антигенов из генотипов А и С. Внутриклеточное окрашивание антителами к противовирусным цитокинам показало, что антиген-специфическое продуцирование противовирусных цитокинов (INF- γ , TNF- α и IL-2) индуцировалось в обеих CD4 и CD8 Т-клетках от иммунизированных обезьян. Фигура 57D показывает, что после трех иммунизаций наблюдались HBV-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные

реакции. Подобно результатам, показанным в IFN- γ ELISpot, ответы против корового антигена доминировали. Добавление IL-12 усиливало общую амплитуду отклика, однако, как ожидалось, этот эффект был более выраженным для CD8 T-клеток. Индукция как CD4, так и CD8 ответов, составляющая в среднем 1 %, предполагает индукцию широкого иммунного ответа, состоящего из Th1 и Th2 иммунитета и является сильно обнадеживающей для продвижения этой стратегии в испытаниях на людях.

[00284] Антитела и Т-клеточные ответы на антигены HBs и HBc были аналогичны результатам, полученным с мышами в Примере 5. Эти ответы были еще более впечатляющими, когда IL-12, Th1 поляризационный цитокиновый адъювант был добавлен в коктейль pLHBs-pMCore. Похоже, что pLHBs-pMCore + IL-12 рецептура была весьма эффективной в качестве предпочтительной комбинации. Следует отметить, что ни один вакцинный препарат не привел к повышению параметров, связанных с повреждением печени.

ПРИМЕР 8

Анализ функции печени у нечеловекообразных приматов после вакцинации с использованием панелей для химического анализа крови из печени

[00285] Поскольку клинические исследования пациентов, активно инфицированных HBV, предположили возможность того, что Т-клеточный ответ может быть связанным с патологией печени в течение болезни, то проводили предварительный анализ общей безопасности этих поливалентных вакцин в отношении функции печени. Для того чтобы исследовать функцию печени, сывороточные уровни щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и общего билирубина были проанализированы у вакцинированных животных до иммунизации, после третьей вакцинации и непосредственно перед четвертой вакцинацией и после четвертой вакцинации. Панели для химического анализа крови были прогнаны IDEXX Laboratories и содержали щелочную фосфатазу, аланинаминотрансферазу, аспартатаминотрансферазу и общий билирубин. Результаты этого анализа показаны на Фигуре 58. Отсутствие повышения щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и общего билирубина в тестах на функцию печени до, во время и после завершения периода иммунизации предположил, что индукция HBV-специфического иммунного ответа не вызывала значительный ущерб печени вакцинированных животных.

[00286] Взятые вместе, эти данные подтверждают, что введение этого искусственного ДНК-вакцинного коктейля, кодирующего сконструированные антигены HBV, в комбинации со специфической электропорацией приводит к сильным и разнообразным

клеточным и гуморальным реакциям у мышей и NHP, избегая при этом ощутимой токсичности.

[00287] Понятно, что приведенное выше подробное описание и сопровождающие примеры являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения, который определен исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

[00288] Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации, в том числе, без ограничения, касающиеся химической структуры, заместителей, производных, промежуточных соединений, композиций, составов или способов использования изобретения, могут быть сделаны без отступления от сущности и объема изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
Weiner, David B.
Yan, Jian
Obeng-Adjei, Nyamakye

<120> МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОДИРУЮЩИЕ КОРОВЬИЙ БЕЛОК ВИРУСА
ГЕПАТИТА В И ПОВЕРХНОСТНЫЙ АНТИГЕННЫЙ БЕЛОК, И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ ВАКЦИНА

<130> UPVG0037 WO2

<140> PCT/US13/60618

<141> 2013-09-19

<150> US 13/622,965

<151> 2012-09-19

<160> 21

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 552

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты M-core

<220>

<221> прочие характеристики

<222> (1) .. (3)

<223> n является a, c, g или t

<400> 1

nnngacatcg acccctacaa agaattcggc gccaccgtgg aactgctgag cttcctgccc	60
agcgacttct tcccctccgt gcgggacctg ctggataccg ccagcgcctt gtacagagag	120
gccctggaaa gccccgagca ctgcagccct caccacacag ccctgcgga ggccatcctg	180
tgctggggcg agctgatgac cctggccacc tgggtcgga gcaacctgga agatcccgcc	240
agccgggacc tgggtggtgtc ctacgtgaac accaacadtg gcctgaagat ccggcagctg	300
ctgtggttcc acatctcctg cctgaccttc ggccgggaaa ccgtgctgga atacctggtg	360
tccttcggcg tgtggatcag aacccccct gcctacagac cccccaacgc ccctatcctg	420
agcacctgc ccgagacaac cgtggtccgc agacggggca gaagccccag aagaagaacc	480
cccagcccta gacggcggag atctcagagc cccaggcgga gaagatccca gagccgcgag	540
agccagtgc ga	552

<210> 2

<211> 183

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотная последовательность M-Core

<220>
<221> прочие характеристики
<222> (1)..(1)
<223> Xaa может быть природной аминокислотой

<400> 2

Xaa	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu
1				5					10					15	

Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
		20						25					30		

Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys
		35					40					45			

Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu
	50					55					60				

Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala
65					70					75					80

Ser	Arg	Asp	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys
			85						90					95	

Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg
		100						105					110		

Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr
		115					120					125			

Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro
	130					135					140				

Glu	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr
145					150					155					160

Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser
			165						170					175	

Gln	Ser	Arg	Glu	Ser	Gln	Cys
			180			

<210> 3
<211> 603
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты IgE лидера - M-Core

<400> 3

```
atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcca caagggtgca cagcgacatc      60
gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc      120
ttcccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa      180
agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc      240
gagctgatga ccctggccac ctgggctcga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac      300
ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggcctgaaga tccggcagct gctgtggttc      360
cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc      420
gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg cccctatcct gagcaccctg      480
cccgagacaa ccgtgggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac cccagccct      540
agacggcgga gatctcagag cccagggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc      600
tga                                                                    603
```

<210> 4

<211> 200

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность IgE лидера - M-Core

<400> 4

```
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1           5           10          15

His Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu
          20          25          30

Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu
          35          40          45

Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His
50          55          60

Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly
65          70          75          80

Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro
          85          90          95

Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu
          100         105         110
```

Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly
 115 120 125

Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg
 130 135 140

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
 180 185 190

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 195 200

<210> 5
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> последовательность нуклеиновой кислоты IgE лидера - M-Core + HA Tag

<400> 5
 atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcca caagggtgca cagcgacatc 60
 gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcttgcc cagcgacttc 120
 ttccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa 180
 agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc 240
 gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac 300
 ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggctgaaga tccggcagct gctgtggttc 360
 cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggg gtccttcggc 420
 gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga cccccaacg cccctatcct gagcacctg 480
 cccgagaaa ccgtggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac cccagccct 540
 agacggcgga gatctcagag cccagggcg agaagatccc agagccgca gagccagtgc 600
 taccctacg acgtgcccga ctacgcctga 630

<210> 6
 <211> 209
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> аминокислотная последовательность IgE лидера - M-Core + HA Tag

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu
20 25 30

Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu
35 40 45

Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His
50 55 60

Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro
85 90 95

Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu
100 105 110

Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly
115 120 125

Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg
130 135 140

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu
145 150 155 160

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg
180 185 190

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
195 200 205

Ala

<210> 7

<211> 18

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>
<223> IgE лидерная аминокислотная последовательность

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

<210> 8
<211> 9
<212> белок
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотная последовательность НА-метки

<400> 8

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 9
<211> 1317
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> искусственная (LHBs-A)

<400> 9
ggatccgccca ccatggattg gacttggatt ctgttcctgg tcgccgctgc tacacgggtg 60
cattcagggg gctgggtcttc aaaacctaga aaaggcatgg gcaccaacct gagcgtgccc 120
aatcctctgg ggttctttcc agaccaccag ctggaccccg ctttcggcgc aaactccaac 180
aatcctgact gggacttcaa cccaatcaaa gaccactggc cagcagctaa ccaagtggga 240
gtcggagact tcggaccagg actgactccc cctcatggcg ggattctggg ctggtctccc 300
caggctcagg gcatcctgac cacagtgagc actattccac cccctgcaag caccaacagg 360
cagtccggac gccagccaac cccaatctca ccaccctgc gagacagcca ccctcaggcc 420
agaggcagga aacggagatc tatgcagtgg aatagtacag ccttccatca ggctctgcag 480
gacccccggg tgcgggggact gtactttcca gccggaggca gtcctcttgg cactgtcaac 540
cctgcaccaa atatcgctc ccacatcagt tcaatttctg ctggaactgg agaccccggtg 600
accaaccggg gcagaaagag gcgcagtatg gagaatatta cctcagggtt cctgggacct 660
ctgctgggtc tgcaggcagg cttcttttctg ctgaccgcga tcctgacaat tcctcagtca 720
ctggatagct ggtggaccag cctgaacttc ctgggcggca gccccgtgtg cctgggacag 780
aactctcaga gtcttacctc caatcattct ccaacaagtt gtctccaat ctgcccaggc 840

tacagatgga tgtgcctgcg acggttcac	attttcctgt ttatcctgct gctgtgcctg	900
atttttctgc tgggtgctgct ggactatcag	ggcatgctgc cagtctgccc cctgattcct	960
gggtccacta ccacatctac aggaccctgt	aagacttgca ctaccctgc ccaggggaac	1020
agtatgtttc catcatgctg ttgcacaaaa	cccactgatg gaaattgtac atgcatcccc	1080
attcctagct cctgggcatt cgccaagtat	ctgtgggaat gggcaagcgt gaggttttca	1140
tggctgagcc tgctgggtgcc cttcgtccag	tggtttgtgg gactgagccc taccgtctgg	1200
ctgtccgcca tctggatgat gtggtactgg	gggccagcc tgtattcaat cgtgtctcca	1260
ttcatcccc tgctgccaat cttcttttgt	ctgtgggtct acatttgata actcgag	1317

<210> 10
 <211> 431
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (LHBs-A)

<400> 10

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn
20 25 30

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
35 40 45

Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro
50 55 60

Ile Lys Asp His Trp Pro Ala Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe
65 70 75 80

Gly Pro Gly Leu Thr Pro Pro His Gly Gly Ile Leu Gly Trp Ser Pro
85 90 95

Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Ser Thr Ile Pro Pro Pro Ala
100 105 110

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro
115 120 125

Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Met
130 135 140

Gln Trp Asn Ser Thr Ala Phe His Gln Ala Leu Gln Asp Pro Arg Val

145		150		155		160
Arg Gly Leu Tyr Phe	Pro Ala Gly Gly Ser	Ser Ser Gly Thr Val	Asn			
	165		170		175	
Pro Ala Pro Asn Ile	Ala Ser His Ile	Ser Ser Ile Ser	Ala Arg Thr			
	180	185	190			
Gly Asp Pro Val Thr	Asn Arg Gly Arg	Lys Arg Arg Ser	Met Glu Asn			
	195	200	205			
Ile Thr Ser Gly Phe	Leu Gly Pro Leu	Leu Val Leu Gln	Ala Gly Phe			
	210	215	220			
Phe Leu Leu Thr Arg	Ile Leu Thr Ile	Pro Gln Ser Leu	Asp Ser Trp			
	225	230	235			240
Trp Thr Ser Leu Asn	Phe Leu Gly Gly	Ser Pro Val Cys	Leu Gly Gln			
	245	250	255			
Asn Ser Gln Ser Pro	Thr Ser Asn His	Ser Pro Thr Ser	Cys Pro Pro			
	260	265	270			
Ile Cys Pro Gly Tyr	Arg Trp Met Cys	Leu Arg Arg Phe	Ile Ile Phe			
	275	280	285			
Leu Phe Ile Leu Leu	Leu Cys Leu Ile	Phe Leu Leu Val	Leu Leu Asp			
	290	295	300			
Tyr Gln Gly Met Leu	Pro Val Cys Pro	Leu Ile Pro Gly	Ser Thr Thr			
	305	310	315			320
Thr Ser Thr Gly Pro	Cys Lys Thr Cys	Thr Thr Pro Ala	Gln Gly Asn			
	325	330	335			
Ser Met Phe Pro Ser	Cys Cys Cys Thr	Lys Pro Thr Asp	Gly Asn Cys			
	340	345	350			
Thr Cys Ile Pro Ile	Pro Ser Ser Trp	Ala Phe Ala Lys	Tyr Leu Trp			
	355	360	365			
Glu Trp Ala Ser Val	Arg Phe Ser Trp	Leu Ser Leu Leu	Val Pro Phe			
	370	375	380			
Val Gln Trp Phe Val	Gly Leu Ser Pro	Thr Val Trp Leu	Ser Ala Ile			
	385	390	395			400
Trp Met Met Trp Tyr	Trp Gly Pro Ser	Leu Tyr Ser Ile	Val Ser Pro			

Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 420 425 430

<210> 11
 <211> 1319
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (LHBs-C)

<400> 11
 gaattcgcca ccatggattg gacatggatt ctgtttctgg tcgccgccgc aaccgcgctg 60
 cactcagggg gatggtcac aaacactaga cagggaatgg gcactaacct gagtgtgccc 120
 aatcctctgg ggttctttcc cgaccaccag ctggatcctg ccttcggcgc taactctaac 180
 aatccagact gggacttcaa cccaataag gaccactggc ctgaggcaaa tcaagtggga 240
 gcaggagcct tcggaccagg ctttacacc cctcatggcg gactgctggg atgggtccct 300
 caggctcagg ggatcctgac cacagtccca gcagctccac cccctgcaag tactaacagg 360
 cagtccaggac gccagccaac cccattttct ccaccctga gggacagtca cctcaggcc 420
 agaggcagga agcggagaag catgcagtgg aacagcacta ccttccatca ggcactgctg 480
 gatccacgcg tgcgaggact gtactttcca gccggaggca gtcctctctgg aaccgtgaac 540
 cctgtcccaa caactgcctc cccaatcagt tcaattttct ctcgacagg agaccccgct 600
 cctaactcggg gcagaaaaag gcgctcaatg gaaagcacca catccgggtt tctgggacca 660
 ctgctggtgc tgcaggcagg cttctttctg ctgaccagaa tcctgacaat tccccagtct 720
 ctggatagtt ggtggaccag cctgaacttc ctgggcggcg cccctacttg tccaggacag 780
 aactctcaga gtccaacatc aaatcatagc cccacttcct gtcctccaat ctgccctggc 840
 taccgctgga tgtgcctgcg acggttcac attttctctgt ttatcctgct gctgtgcctg 900
 atttttctgc tgggtgctgt ggactatcag ggaatgctgc cgtctgccc tctgctgcca 960
 gggacttcta ctaccagtac cggaccttgt aagacatgca ctattccagc tcaggggacc 1020
 tccatgttcc cctcttgctg ttgcacaaa cctagcgatg gaaattgtac atgcatcca 1080
 attcccagct cctgggcttt cgcacgattt ctgtgggagt gggccagcgt gcgcttttca 1140
 tggctgagcc tgctggtgcc cttcgtccag tggtttgctg gcctgtcacc taccgtgtgg 1200
 ctgagcgtca tctggatgat gtggtactgg gggcccagcc tgtataatat cctgtcacca 1260
 ttcctgccac tgctgccaat cttcttttgt ctgtgggtct acatttgata agcggccgc 1319

<210> 12
 <211> 431
 <212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> искусственная (LHBs-C)

<400> 12

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn
20 25 30

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
35 40 45

Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro
50 55 60

Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80

Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro
85 90 95

Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala
100 105 110

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro
115 120 125

Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Met
130 135 140

Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val
145 150 155 160

Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn
165 170 175

Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr
180 185 190

Gly Asp Pro Ala Pro Asn Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Met Glu Ser
195 200 205

Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe
210 215 220

Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp

225		230		235		240									
Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	Gln
				245					250					255	
Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	Pro
			260					265					270		
Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe	Ile	Ile	Phe
		275					280					285			
Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Asp
	290					295					300				
Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr
305					310					315					320
Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr
				325					330					335	
Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys
			340					345					350		
Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Arg	Phe	Leu	Trp
		355					360					365			
Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe
	370					375					380				
Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	Ile
385					390					395					400
Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro
				405					410					415	
Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile	
			420					425					430		

<210> 13
 <211> 753
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (SHBs-A)

<400> 13	
ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggctgccgc tacacgggtg	60
cattctgaaa atatcacatc tggattcctg ggacctctgc tggctgctgca ggctgggttc	120

tttctgctga caagaatcct gactattccc cagtcactgg acagctggtg gacatctctg	180
aacttcctgg gcgggagtc tgtctgtctg ggacagaact ctcagagtcc tacttccaat	240
cactctccaa ccagttgtcc ccctatctgc ccaggctacc gctggatgtg cctgcggaga	300
ttcatcattt tcctgtttat cctgctgctg tgcctgattt ttctgctggt gctgctggac	360
tatcagggca tgctgcctgt ctgccactg attcccggca gcaccacaac ttctaccggc	420
ccctgtaaga catgcaccac acctgccag gggaacagta tgtttccatc atgctgttgc	480
actaaacca ccgatggaaa ttgtacatgc atcccaattc ccagctcctg ggccttcgct	540
aagtacctgt gggagtgggc aagcgtgcga ttttcatggc tgagcctgct ggtgcctttc	600
gtccagtggg ttgtgggcct gagcccaact gtctggctgt ccgccatctg gatgatgtgg	660
tactgggggc ccagcctgta ttccatcgtg tcaccattca ttcccctgct gccaatcttt	720
ttctgcctgt gggctctacat ctgataactc gag	753

<210> 14
 <211> 243
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (SHBs-A)

<400> 14

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
1				5					10					15	

His	Ser	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu
			20					25					30		

Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser
		35					40					45			

Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Val
	50					55					60				

Cys	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr
65					70					75				80	

Ser	Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg
				85					90					95	

Phe	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu
			100					105					110		

Val	Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro
			115				120					125			

Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro
 130 135 140

Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr
 145 150 155 160

Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala
 165 170 175

Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu
 180 185 190

Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp
 195 200 205

Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser
 210 215 220

Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp
 225 230 235 240

Val Tyr Ile

<210> 15
 <211> 755
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (SHBs-C)

<400> 15
 gaattcgcca ccatggattg gacatggatt ctgttcctgg tcgccgccgc aacacgagtg 60
 cattctgaaa gtacaacctc tggcttcctg ggccccctgc tgggtgctgca ggcaggggttc 120
 tttctgctga cacgaatcct gactattcca cagtcactgg acagctgggtg gaccagcctg 180
 aacttcctgg gcggggcccc tacatgtcca ggacagaact ctcaagatcc cacttccaat 240
 cactctccta ccagttgtcc ccctatctgc cccggctaca gatggatgtg cctgcggaga 300
 ttcatcattt tcctgtttat cctgctgctg tgccctgattt ttctgctggg gctgctggac 360
 tatcagggaa tgctgcccgt ctgccctctg ctgccaggaa cctcaaccac aagcacaggc 420
 ccttgtaaga cttgcacat tcccgtcag gggactagta tgttccttc atgctgttgc 480
 aaaaaacat ctgatgaaa ttgtacttgc atcccaattc ccagctcctg ggccttgcgt 540
 aggtttctgt gggagtgggc cagtgtgcgc ttttcctggc tgtctctgct ggtgccttc 600
 gtccagtggg ttgtcggcct gagccctaca gtgtggctgt ccgtcatctg gatgatgtgg 660

tactgggggc ctagcctgta taatatacctg tcaccatttc tgccactgct gccaatcttc	720
ttttgcctgt ggggtctacat ctgataagcg gccgc	755

<210> 16
 <211> 243
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (SHBs-C)

<400> 16

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
1				5					10					15	

His	Ser	Glu	Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu
			20					25					30		

Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser
		35					40					45			

Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr
	50					55					60				

Cys	Pro	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr
65					70					75					80

Ser	Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg
				85					90					95	

Phe	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu
			100					105					110		

Val	Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Leu	Pro
		115					120					125			

Gly	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ile	Pro
	130					135					140				

Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser
145					150					155					160

Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala
				165					170					175	

Arg	Phe	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu
		180						185					190		

Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

195

200

205

Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn
 210 215 220

Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp
 225 230 235 240

Val Tyr Ile

<210> 17
 <211> 3585
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (pGX1801 HepB - MCore)

<400> 17
 gactcttcgc gatgtacggg ccagatatat gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60
 atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120
 acttacggta aatggcccg ctaggtgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180
 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240
 ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgccagat acatgacctt 360
 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420
 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc 540
 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600
 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga 660
 aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgttttaaact taagcttggt 720
 accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggt ggccgctgcc 780
 acaagggtgc acagcgacat cgaccctac aaagaattcg gcgccaccgt ggaactgctg 840
 agcttcctgc ccagcgactt cttcccctcc gtgcgggacc tgctggatac cgccagcgcc 900
 ctgtacagag aggccctgga aagccccgag cactgcagcc ctcaccacac agccctgcgg 960
 caggccatcc tgtgtgggg cgagctgatg acctggcca cctgggtcgg aagcaacctg 1020
 gaagatcccg ccagccggga cctggtggtg tcctacgtga acaccaacat gggcctgaag 1080
 atccggcagc tgctgtggtt ccacatctcc tgctgacct tcggccggga aaccgtgctg 1140
 gaatacctgg tgtccttcgg cgtgtggatc agaaccccc ctgcctacag accccccaac 1200

gcccctatcc	tgagcacccct	gcccagagaca	accgtgggtcc	gcagacgggg	cagaagcccc	1260
agaagaagaa	ccccagccc	tagacggcgg	agatctcaga	gccccaggcg	gagaagatcc	1320
cagagccgcg	agagccagtg	ctacccttac	gacgtgcccg	actacgcctg	actcgagtct	1380
agagggcccc	tttaaaccgg	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagttg	ccagccatct	1440
gttgtttgcc	cctcccccg	gccttccttg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	1500
tcctaataaa	atgaggaaat	tgcacgcacat	tgtctgagta	gggtgtcattc	tattctgggg	1560
ggtaggggtg	ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	1620
gatgcgggtg	gctctatggc	ttctactggg	cggttttatg	gacagcaagc	gaaccggaat	1680
tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	caaagtaaac	tggatggctt	1740
tctcgccgcc	aaggatctga	tggcgccagg	gatcaagctc	tgatcaagag	acaggatgag	1800
gatcgtttcg	catgattgaa	caagatggat	tgcacgcagg	ttctccggcc	gcttgggtgg	1860
agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	gccgccgtgt	1920
tccggctgtc	agcgccgggg	cgcccggttc	tttttgtcaa	gaccgacctg	tccggtgccc	1980
tgaatgaact	gcaagacgag	gcagcgccgc	tatcgtgggt	ggccacgacg	ggcgttcctt	2040
gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cggaaggga	ctggctgcta	ttgggcgaag	2100
tgccggggca	ggatctcctg	tcctctcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	tccatcatgg	2160
ctgatgcaat	gcggcggtg	catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	gaccaccaag	2220
cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggtcttgtc	gatcaggatg	2280
atctggacga	agagcatcag	gggctcgcc	cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcga	2340
gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	cccatggcga	tgcttgcctg	ccgaatatca	2400
tggtggaana	tggccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	gtggcggaac	2460
gctatcagga	catagcggtg	gctaccctg	atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	2520
ctgaccgctt	cctcgtgctt	tacggtatcg	ccgtcccgga	ttcgcagcgc	atgccttct	2580
atgccttct	tgacgagttc	ttctgaatta	ttaacgctta	caatttcttg	atgcgggtatt	2640
ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcataca	ggtggcactt	ttcggggaaa	2700
tgtgcgcgga	accctatatt	gtttatattt	ctaaatacat	tcaaataatg	atccgctcat	2760
gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atagcacgtg	ctaaaacttc	atttttaatt	2820
taaaaggatc	taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	2880
gttttcgttc	cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	2940
tttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcggtggg	3000
ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	3060
gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	3120

tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg	3180
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg	3240
gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga	3300
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc	3360
ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg	3420
gggaaacgcc tggatatcttt atagtctctgt cgggttttcgc cacctctgac ttgagcgtcg	3480
attttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt	3540
tttacgggtc ctgggctttt gctggccttt tgctcacatg ttctt	3585

<210> 18
 <211> 4254
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (pGX1802 НерВ рLHBs-A)

<400> 18	
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatat gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggtg aatggcccg cctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
ctattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat	420
gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggt	720
accgagctcg gatccgccac catggattgg acttgattc tgttcctggg cgcgctgct	780
acacgggtgc attcaggggg ctggtcttca aaacctagaa aaggcatggg caccaacctg	840
agcgtgccca atcctctggg gttctttcca gaccaccagc tggacccgcg tttcggcgca	900
aactccaaca atcctgactg ggacttcaac ccaatcaaag accactggcc agcagctaac	960
caagtgggag tcggagcttt cggaccagga ctgactcccc ctcatggcgg gattctgggc	1020
tggtctcccc aggctcaggg catcctgacc acagtgagca ctattccacc ccctgcaagc	1080
accaacaggc agtccggacg ccagccaacc ccaatctcac caccctgcg agacagccac	1140

cctcaggcca	gaggcaggaa	acggagatct	atgcagtgga	atagtacagc	cttccatcag	1200
gctctgcagg	acccccgggt	gcggggactg	tactttccag	cgggaggcag	ctcctctggc	1260
actgtcaacc	ctgcaccaa	tatcgctctc	cacatcagtt	caatttctgc	tcgaactgga	1320
gaccccgatga	ccaaccgggg	cagaaagagg	cgagtatgg	agaatattac	ctcagggttc	1380
ctgggacctc	tgctggctct	gcaggcaggc	ttctttctgc	tgacccgcat	cctgacaatt	1440
cctcagtcac	tgatagctg	gtggaccagc	ctgaacttcc	tgggcggcag	ccccgtgtgc	1500
ctgggacaga	actctcagag	tcctacctcc	aatcattctc	caacaagttg	tcctccaatc	1560
tgcccaggct	acagatggat	gtgcctgcga	cggttcatca	ttttcctgtt	tatcctgctg	1620
ctgtgcctga	tttttctgct	ggtgctgctg	gactatcagg	gcatgctgcc	agtctgcccc	1680
ctgattcctg	ggtccactac	cacatctaca	ggaccctgta	agacttgcac	taccctgcc	1740
caggggaaca	gtatgtttcc	atcatgctgt	tgcacaaaac	ccactgatgg	aaattgtaca	1800
tgcatcccca	ttcctagctc	ctgggcattc	gccaaagtac	tgtgggaatg	ggcaagcgtg	1860
aggttttcat	ggctgagcct	gctggtgccc	ttcgtccagt	ggtttgtggg	actgagccct	1920
accgtctggc	tgtccgccat	ctggatgatg	tggtactggg	ggcccagcct	gtattcaatc	1980
gtgtctccat	tcattccccct	gctgccaatc	ttcttttgtc	tgtgggtcta	catttgataa	2040
ctcgagtcta	gagggcccg	ttaaaccgc	tgatcagcct	cgactgtgcc	ttctagttgc	2100
cagccatctg	ttgtttgccc	ctcccccg	ccttccttga	ccctggaagg	tgccactccc	2160
actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcat	gtctgagtag	gtgtcattct	2220
attctggggg	gtggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	2280
catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggct	tctactgggc	ggttttatgg	acagcaagcg	2340
aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	gaagccctgc	aaagtaaact	2400
ggatggcttt	ctcgccgcca	aggatctgat	ggcgaggggg	atcaagctct	gatcaagaga	2460
caggatgagg	atcgtttctg	atgattgaac	aagatggatt	gcacgcaggt	tctccggccg	2520
cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	gacaatcggc	tgctctgatg	2580
ccgccgtgtt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	2640
ccggtgccct	gaatgaactg	caagacgagg	cagcgcggtc	atcgtggctg	gccacgacgg	2700
gcgttccttg	cgagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	gggaaggggc	tggtctgtat	2760
tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	tgctcctgcc	gagaaagtat	2820
ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggctgc	atacgcttga	tccggctacc	tgcccattcg	2880
accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	gatggaagcc	ggtcttgtcg	2940
atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	agccgaactg	ttcgccaggc	3000
tcaaggcgag	catgcccgc	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	ccatggcgat	gcctgcttgc	3060

cgaatatcat ggtggaaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg	3120
tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg	3180
gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgtcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca	3240
tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgaattat taacgcttac aatttcctga	3300
tgcggtatth tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacag gtggcactth	3360
tcggggaaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	3420
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gtttcaataa tagcacgtgc taaaacttca	3480
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaatccc	3540
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc	3600
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc	3660
agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt	3720
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt	3780
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	3840
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	3900
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac	3960
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg	4020
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg	4080
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact	4140
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa acgccagcaa	4200
cgcggccttt ttacggttcc tgggcttttg ctggcctttt gctcacatgt tctt	4254

<210> 19
 <211> 4284
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> искусственная (pGX1803 НерВ рLHBs-C)

<400> 19	
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggta aatggcccg cctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat	420

gcgggttttg	cagtacatca	atgggcgtgg	atagcggttt	gactcacggg	gatttccaag	480
tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	caaaatcaac	gggactttcc	540
aaaatgtcgt	aacaactccg	ccccattgac	gcaaattgggc	ggtaggcgtg	tacggtggga	600
ggtctatata	agcagagctc	tctggctaac	tagagaaccc	actgcttact	ggcttatcga	660
aattaatacg	actcactata	gggagaccca	agctggctag	cgtttaaact	taagcttggt	720
accgagctcg	gatccactag	tccagtgtgg	tggaattcgc	caccatggat	tggacatgga	780
ttctgtttct	ggtcgccgcc	gcaaccgcg	tgcactcagg	gggatgggtca	tcaaaaccta	840
gacaggggaat	gggcactaac	ctgagtgtgc	ccaatcctct	ggggttcttt	cccgaccacc	900
agctggatcc	tgccttcggc	gctaactcta	acaatccaga	ctgggacttc	aacccaata	960
aggaccactg	gcctgaggca	aatcaagtgg	gagcaggagc	cttcggacca	ggctttacac	1020
cccctcatgg	cggactgctg	ggatgggtccc	ctcagggtca	ggggatcctg	accacagtcc	1080
cagcagctcc	acccctgca	agtactaaca	ggcagtcagg	acgccagcca	acccccatth	1140
ctccaccct	gagggacagt	caccctcagg	ccagaggcag	gaagcggaga	agcatgcagt	1200
ggaacagcac	taccttccat	caggcactgc	tggatccacg	cgtgcgagga	ctgtactttc	1260
cagccggagg	cagctcctct	ggaaccgtga	accctgtccc	aacaactgcc	tccccaatca	1320
gttcaatttt	ctctcggaca	ggagaccccg	ctcctaatacg	gggcagaaaa	aggcgctcaa	1380
tgaaagcac	cacatccggg	tttctgggac	cactgctggg	gctgcaggca	ggcttctttc	1440
tgctgaccag	aatcctgaca	attccccagt	ctctggatag	ttgggtggacc	agcctgaact	1500
tcctgggagg	cgcccctact	tgtccaggac	agaactctca	gagtccaaca	tcaaatcata	1560
gccccacttc	ctgtcctcca	atctgccttg	gctaccgctg	gatgtgcctg	cgacggttca	1620
tcattttcct	gtttatcctg	ctgctgtgcc	tgatttttct	gctgggtgctg	ctggactatc	1680
agggaaatgct	gcccgtctgc	cctctgctgc	cagggacttc	tactaccagt	accggacctt	1740
gtaagacatg	cactattcca	gctcagggga	cctccatggt	cccctcttgc	tgttgcacca	1800
aacctagcga	tggaatttgt	acatgcatcc	caattccag	ctcctgggct	ttcgcacgat	1860
ttctgtggga	gtgggccagc	gtgcgctttt	catggctgag	cctgctgggtg	cccttcgtcc	1920
agtggtttgt	cggcctgtca	cctaccgtgt	ggctgagcgt	catctggatg	atgtgggtact	1980
gggggcccag	cctgtataat	atcctgtcac	cattcctgcc	actgctgcca	atcttctttt	2040
gtctgtgggt	ctacatttga	taagcggccg	ctcgagtcta	gagggcccgt	ttaaaccgcg	2100
tgatcagcct	cgactgtgcc	ttctagttgc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctccccgtg	2160
ccttccttga	ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	2220
gcatcgcatt	gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtggggtggg	gcaggacagc	2280
aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggct	2340

tctactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg	2400
gtaaggtttg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt ctgcgcgcca aggatctgat	2460
ggcgcagggg atcaagctct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac	2520
aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact	2580
gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc	2640
gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg	2700
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg	2760
tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt	2820
catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc	2880
atacgttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag	2940
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg	3000
ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgag catgcccgcac ggcgaggatc	3060
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt	3120
ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg	3180
ctaccctgta tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt	3240
acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct	3300
tctgaattat taacgcttac aatttcctga tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg	3360
gtatttcaca ccgcatacag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg	3420
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat	3480
gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca tttttaatth aaaaggatct aggtgaagat	3540
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc	3600
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg	3660
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct	3720
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct	3780
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct	3840
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg	3900
gttgactca agacgatagt taccggataa ggccgacggc tcgggctgaa cgggggggttc	3960
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga	4020
gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg	4080
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta	4140
tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg	4200
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tgggcttttg	4260

ctggcctttt gctcacatgt tctt

4284

<210> 20

<211> 3690

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> искусственная (pGX1804 НерВ pSHBs-A)

<400> 20

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggta aatggcccg cctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
ctattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat	420
gcggtttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gattttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatoga	660
aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggg	720
accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggatcc tgttcctggg ggctgccgct	780
acacgggtgc attctgaaaa tatcacatct ggattcctgg gacctctgct ggtgctgcag	840
gctgggttct ttctgctgac aagaatcctg actattcccc agtcaactgga cagctggtgg	900
acatctctga acttcctggg cgggagtcct gtctgtctgg gacagaactc tcagagtcct	960
acttccaatc actctccaac cagttgtccc cctatctgcc caggetaccg ctggatgtgc	1020
ctgcggagat tcatcatttt cctgtttatc ctgctgctgt gcctgatttt tctgctgggtg	1080
ctgctggact atcagggcat gctgcctgtc tgcccactga ttcccggcag caccacaact	1140
tctaccggcc cctgtaagac atgcaccaca cctgcccagg ggaacagtat gtttccatca	1200
tgctgttgca ctaaaccac cgatggaaat tgtacatgca tccaattcc cagctcctgg	1260
gccttcgcta agtacctgtg ggagtgggca agcgtgcgat tttcatggct gagcctgctg	1320
gtgcctttcg tccagtgggt tgtgggcctg agcccaactg tctggctgtc cgccatctgg	1380
atgatgtggg actggggggc cagcctgtat tccatcgtgt caccattcat tcccctgctg	1440
ccaatctttt tctgcctgtg ggtctacatc tgataactcg agtctagagg gcccgtttaa	1500
acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc	1560

cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag	1620
gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag	1680
gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctgggggatgc ggtgggctct	1740
atggcttcta ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc	1800
cctctggtaa ggttggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttctcg ccgccaagga	1860
tctgatggcg caggggatca agctctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga	1920
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct	1980
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc	2040
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcaag	2100
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg	2160
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc	2220
tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc	2280
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg	2340
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc	2400
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg	2460
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc	2520
gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag	2580
cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgc	2640
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg	2700
agttcttctg aattattaac gcttacaatt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc	2760
tgtgcggtat ttcacaccgc atacaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	2820
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	2880
ataaatgctt caataatagc acgtgctaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt	2940
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg	3000
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt	3060
aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca	3120
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac	3180
tgctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac	3240
atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct	3300
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg	3360
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca	3420
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt	3480

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta	3540
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc	3600
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggg	3660
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt	3690

<210> 21
 <211> 3720
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная (pGX1805 НерВ SHBs-C)

<400> 21	
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggta aatggcccg cctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgccagat acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat	420
gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgttttaaact taagcttggt	720
accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattcgc caccatggat tggacatgga	780
ttctgttcct ggtcgccgcc gcaacacgag tgcattctga aagtacaacc tctggcttcc	840
tgggccccct gctggtgctg caggcagggt tctttctgct gacacgaatc ctgactattc	900
cacagtcact ggacagctgg tggaccagcc tgaacttcct gggcggggcc cctacatgtc	960
caggacagaa ctctcagagt ccacttcca atcactctcc taccagttgt cccctatct	1020
gccccggcta cagatggatg tgctgcgga gattcatcat tttcctgttt atcctgctgc	1080
tgtgctgat ttttctgctg gtgctgctgg actatcaggg aatgctgcc gtctgccctc	1140
tgctgccagg aacctcaacc acaagcacag gcccttgtaa gacttgcacc attcccgctc	1200
aggggactag tatgttcctt tcatgctgtt gcacaaaacc atctgatgga aattgtactt	1260
gcatcccaat tcccagctcc tgggccttcg ctaggtttct gtgggagtggt gccagtgtgc	1320
gcttttctctg gctgtctctg ctggtgccct tcgtccagtg gtttgtcggc ctgagcccta	1380

cagtgtggct	gtccgtcatc	tggatgatgt	ggtactgggg	gcctagcctg	tataatatcc	1440
tgtcaccatt	tctgccactg	ctgccaatct	tcttttgctt	gtgggtctac	atctgataag	1500
cggccgctcg	agtctagagg	gcccgtttaa	acccgctgat	cagcctcgac	tgtgccttct	1560
agttgccagc	catctgttgt	ttgccccctc	cccgtgcctt	ccttgaccct	ggaaggtgcc	1620
actcccactg	tcctttccta	ataaaatgag	gaaattgcat	cgcatgtgtc	gagtaggtgt	1680
cattctattc	tggggggtgg	ggtggggcag	gacagcaagg	gggaggattg	ggaagacaat	1740
agcaggcatg	ctgggggatgc	ggtgggctct	atggcttcta	ctgggcgggt	ttatggacag	1800
caagcgaacc	ggaattgcca	gctggggcgc	cctctggtaa	ggttgggaag	ccctgcaaag	1860
taaactggat	ggctttctcg	ccgccaagga	tctgatggcg	caggggatca	agctctgata	1920
aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	1980
cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	2040
ctgatgccgc	cgtgttcagg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	gtcaagaccg	2100
acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcaag	acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	2160
cgacgggctg	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	2220
tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	cctgccgaga	2280
aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	2340
cattcgacca	ccaagcgaag	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	2400
ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	2460
ccaggctcaa	ggcgagcatg	cccgcggcgc	aggatctcgt	cgtgacccat	ggcgatgcct	2520
gcttgccgaa	tatcatgggt	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	2580
tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	2640
ttggcggcga	atgggctgac	cgcttcctcg	tgctttacgg	tatcgccgct	cccgatccgc	2700
agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	aattattaac	gcttacaatt	2760
tcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcata	tgtgcggtat	ttcacaccgc	atacagggtg	2820
cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	2880
tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatagc	acgtgctaaa	2940
acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	3000
aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	3060
atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacia	aaaaaccacc	3120
gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	3180
tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	3240
ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	3300

ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccggggtg gactcaagac gatagttacc	3360
ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg	3420
aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc	3480
cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac	3540
gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct	3600
ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc	3660
cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggg cttttgctgg ctttttgctc acatgttctt	3720

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, содержащая:

- (a) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14; или
- (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16.

2. Вакцина по п. 1, дополнительно содержащая:

- (с) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6.

3. Вакцина по п. 1, дополнительно содержащая:

- (a) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14;
- (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной

последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и белок, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16; и

- (с) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, и SEQ ID NO:6.

4. Вакцина по п. 3, отличающаяся тем, что молекулы нуклеиновой кислоты содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:15.

5. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, что молекулами нуклеиновой кислоты являются плазмиды.

6. Вакцина по п. 1, что молекулы нуклеиновой кислоты включены в вирусные частицы.

7. Вакцина по п. 1, дополнительно содержащая адъювантную молекулу.

8. Вакцина по п. 7, отличающаяся тем, что адъювантом является IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

9. Способ индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающий введение субъекту вакцины по п.1.

10. Способ защиты субъекта от HBV-инфекции, включающий введение субъекту вакцины по п.1.

11. Способ защиты субъекта, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение субъекту вакцины по п.1.
12. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: белка, содержащего SEQ ID NO:2; белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2; иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот.
13. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, дополнительно содержащая сигнальный пептид, присоединенный к N-концу белков.
14. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, кодирующая один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6.
15. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, содержащая одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO:1; последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 98 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1; ее фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот, кодируемых последовательностью SEQ ID NO:1; и ее фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности белка, кодируемого последовательностью SEQ ID NO:1.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, дополнительно содержащая сигнальный пептид, присоединенный к 5'-концу последовательности нуклеиновой кислоты.
17. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, содержащая одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5.
18. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является плазмидой.
19. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является вектором экспрессии, и последовательности, кодирующие один или более белков, функционально связаны с регуляторными элементами.
20. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.
21. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 60 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 60 аминокислот.
22. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 120 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине

аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 120 аминокислот.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 180 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, которая состоит из по меньшей мере 180 аминокислот.

24. Способ индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п.12.

25. Способ защиты человека от HBV-инфекции, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п.12.

26. Способ защиты индивидуума, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п.12.

27. Белок, выбранный из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO:2;
- (b) белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2;
- (c) иммуногенного фрагмента SEQ ID NO:2, содержащего 20 или более аминокислот из SEQ ID NO:2;
- (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 95 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, содержащего 20 или более аминокислот.

28. Белок по п. 27, отличающийся тем, что указанный белок выбирают из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 60 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 60 аминокислот.

29. Белок по п. 27, отличающийся тем, что указанный белок выбирают из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 120 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 120 аминокислот.

30. Белок по п. 27, отличающийся тем, что указанный белок выбирают из группы, состоящей из: иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:2, который состоит из, по меньшей мере 180 аминокислот; и иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, который состоит из по меньшей мере 180 аминокислот.

31. Способ индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п. 27.

32. Способ защиты индивидуума от HBV-инфекции, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п. 27.

33. Способ защиты индивидуума, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты по п. 27.

34. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кодирующую последовательность, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) белка, содержащего SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16;

- (b) белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16;
- (c) иммуногенного фрагмента белка, содержащего SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот; и
- (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, который состоит из по меньшей мере 20 аминокислот.

35. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34, содержащая одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) нуклеиновой последовательности, содержащей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 98 % идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15;
- (c) ее фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот, кодируемых последовательностью SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15; и
- (d) ее фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности белку, кодируемому последовательностью SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.

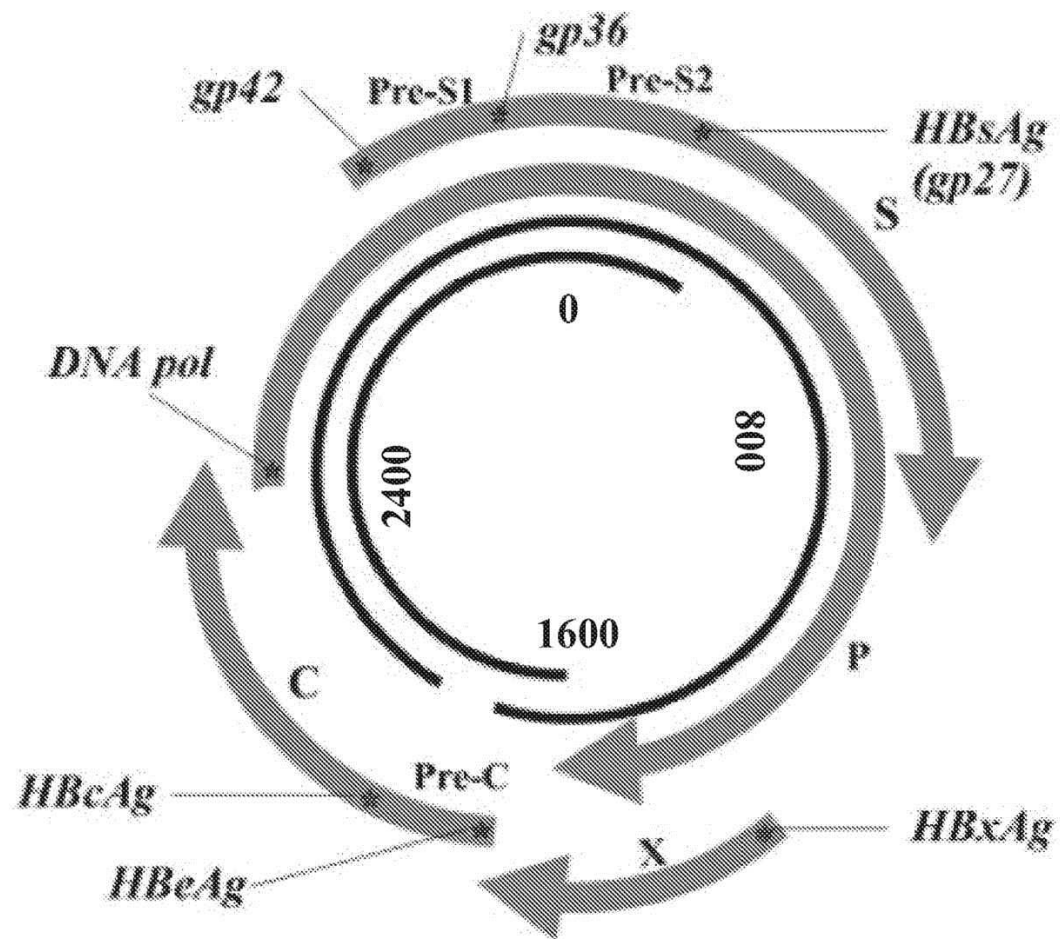
36. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является плазмидой.

37. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является вектором экспрессии, и последовательности, кодирующие указанный один или более белков, функционально связаны с регуляторными элементами.
38. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.
39. Способ индукции иммунного ответа против антигена HBV, включающий введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты по п. 34.
40. Способ защиты субъекта от HBV-инфекции, включающий введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты по п. 34.
41. Способ защиты субъекта, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты по п. 34.
42. Белок, выбранный из группы, состоящей из:
- (a) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16;
 - (b) белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16;
 - (c) иммуногенного фрагмента SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, содержащего 20 или более аминокислот; и
 - (d) иммуногенного фрагмента белка, который на 98 % идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, содержащего 20 или более аминокислот.
43. Вакцина, полезная для генерирования иммунного ответа против HBV у субъекта, содержащая:
- молекулу нуклеиновой кислоты по п. 34 и

адъювантную молекулу.

44. Вакцина по п. 43, отличающаяся тем, что указанным адъювантом является IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

По доверенности



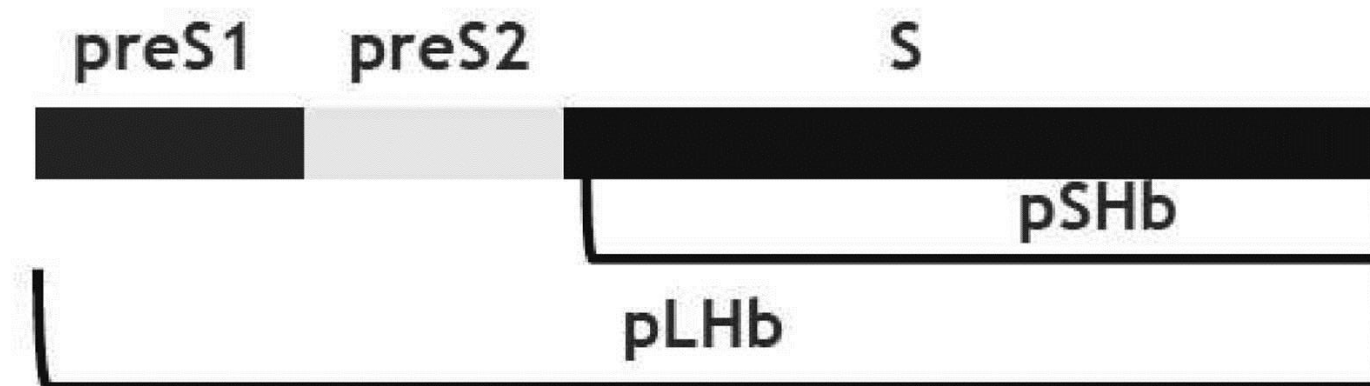
Фигура 1



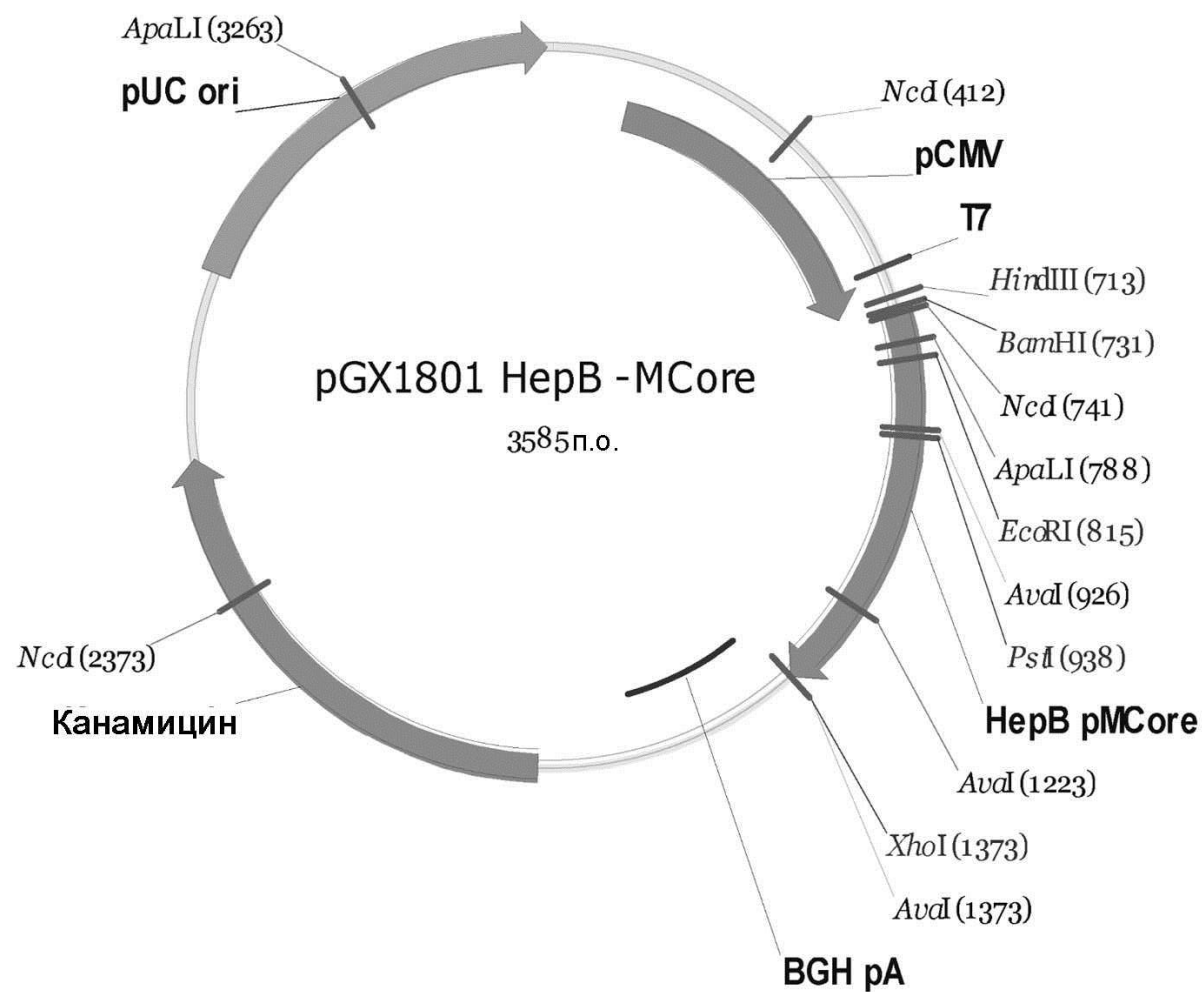
Фигура 2



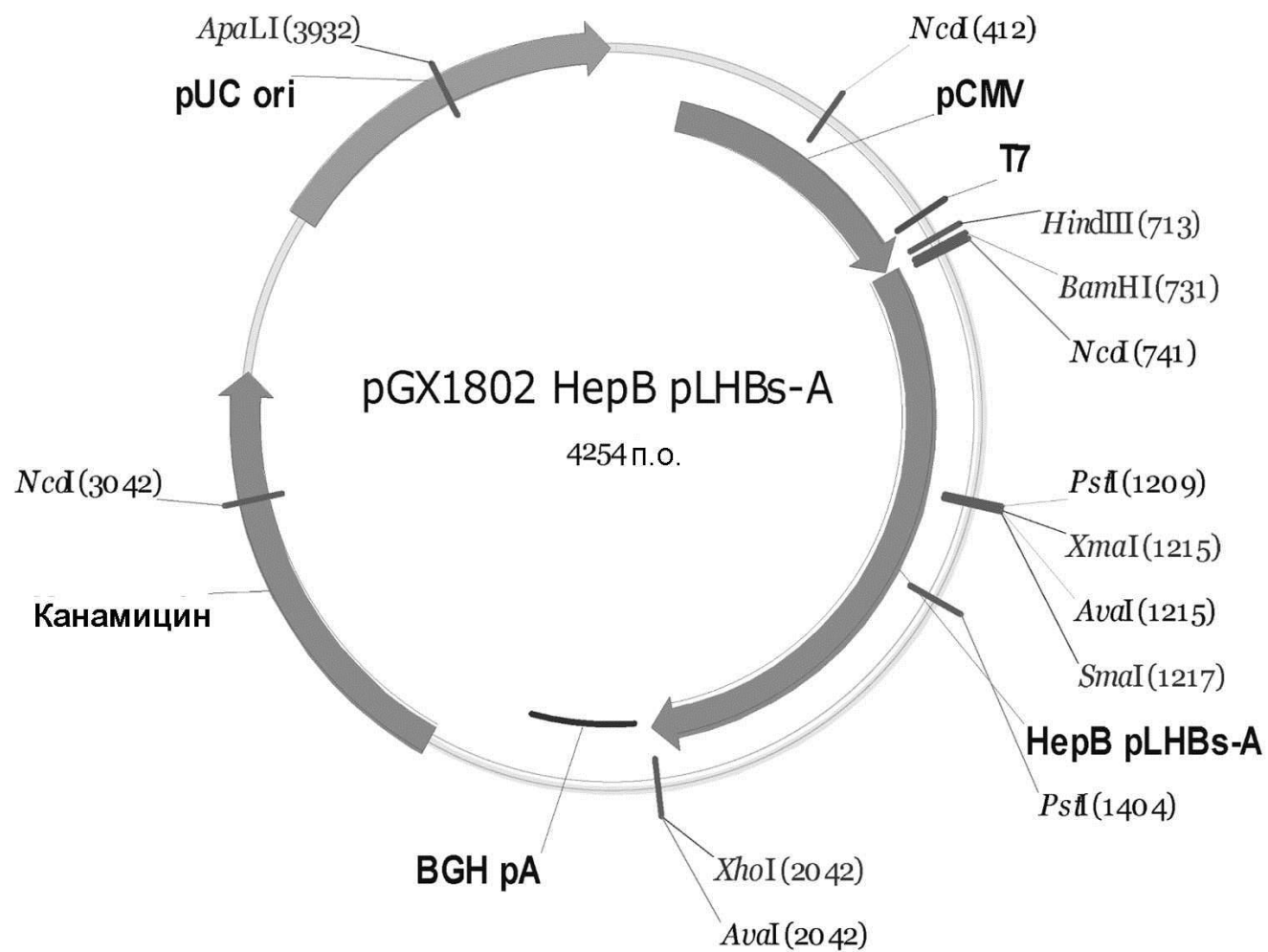
Фигура 3



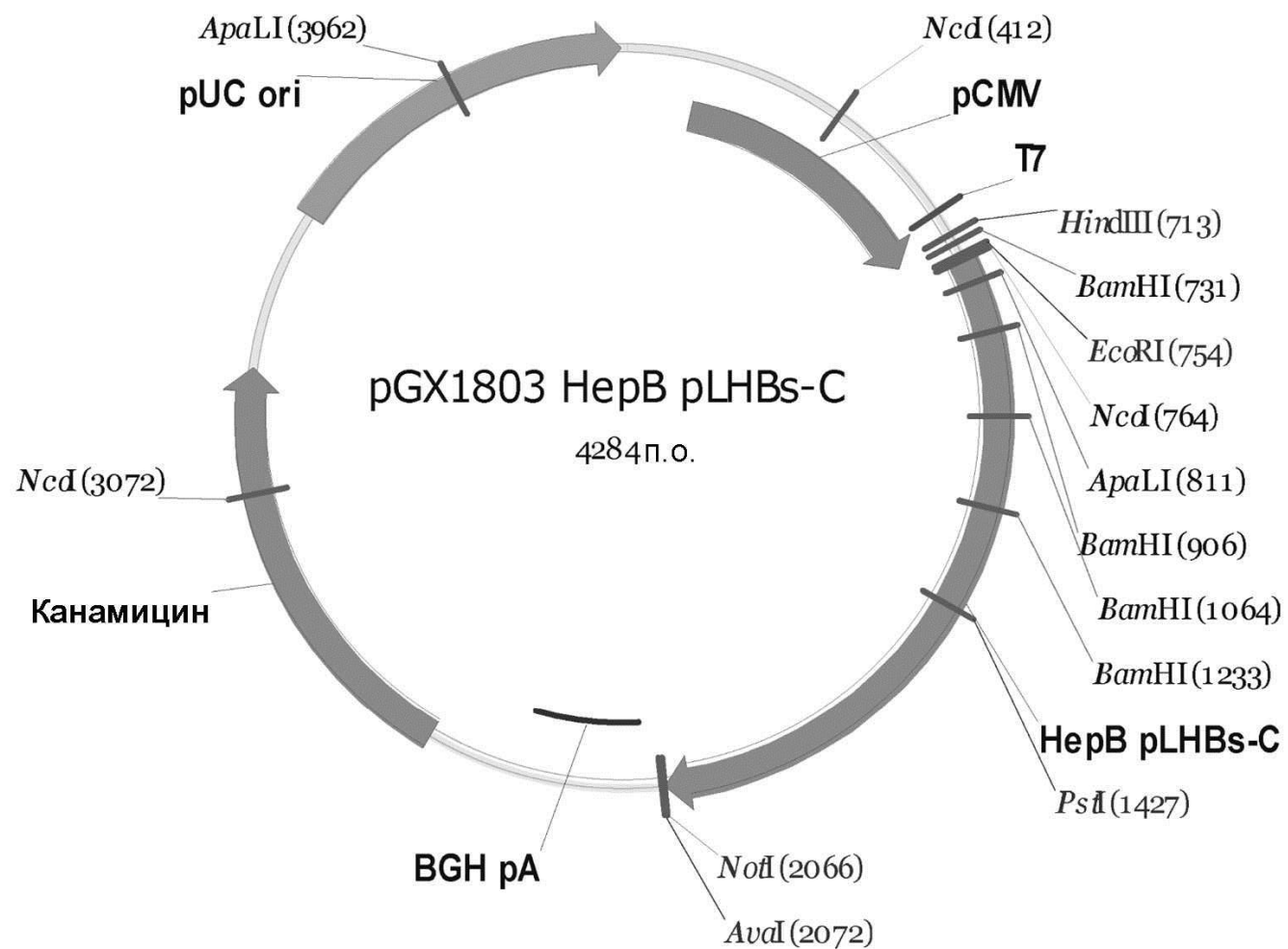
Фигура 4



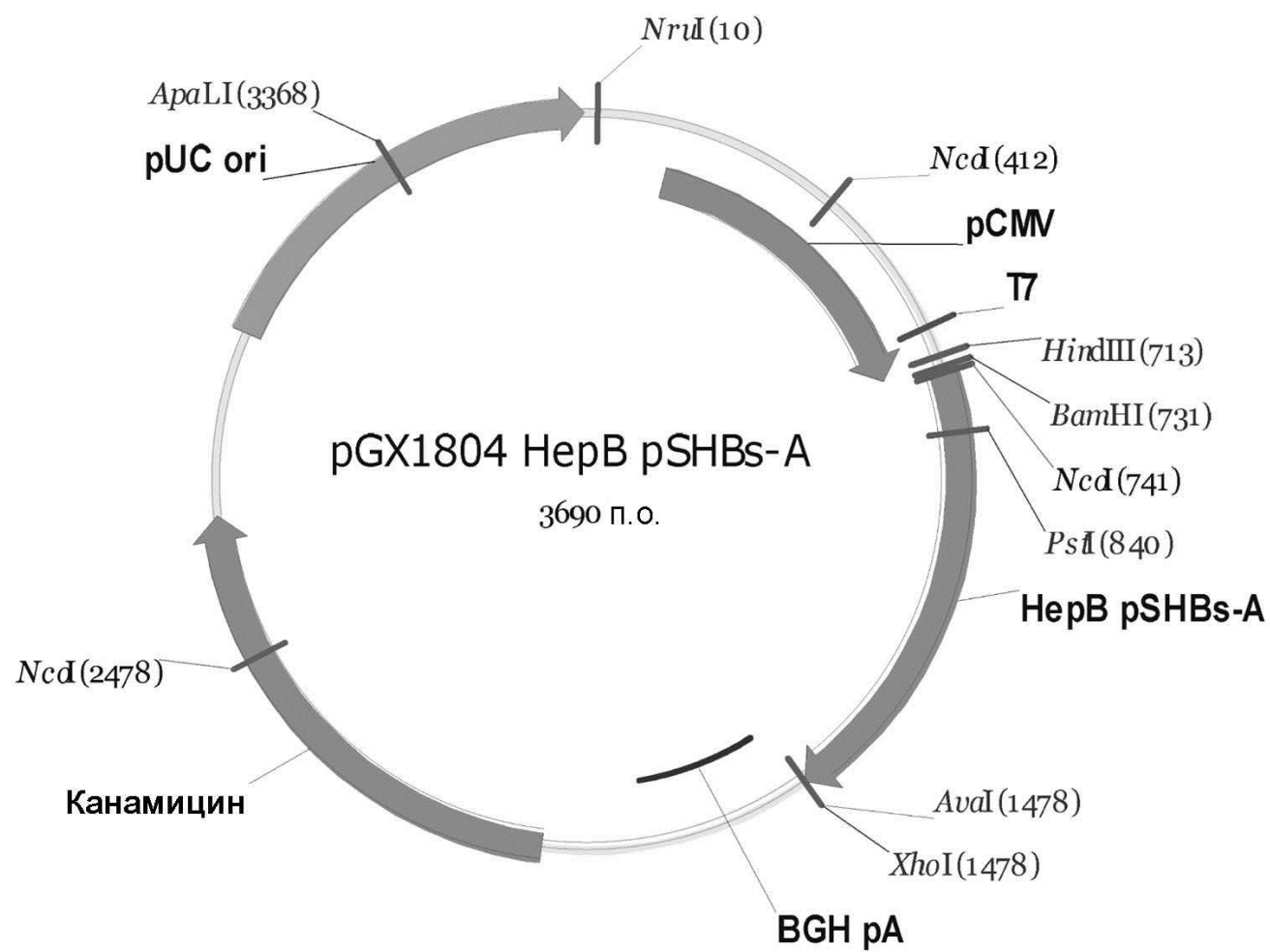
Фигура 5



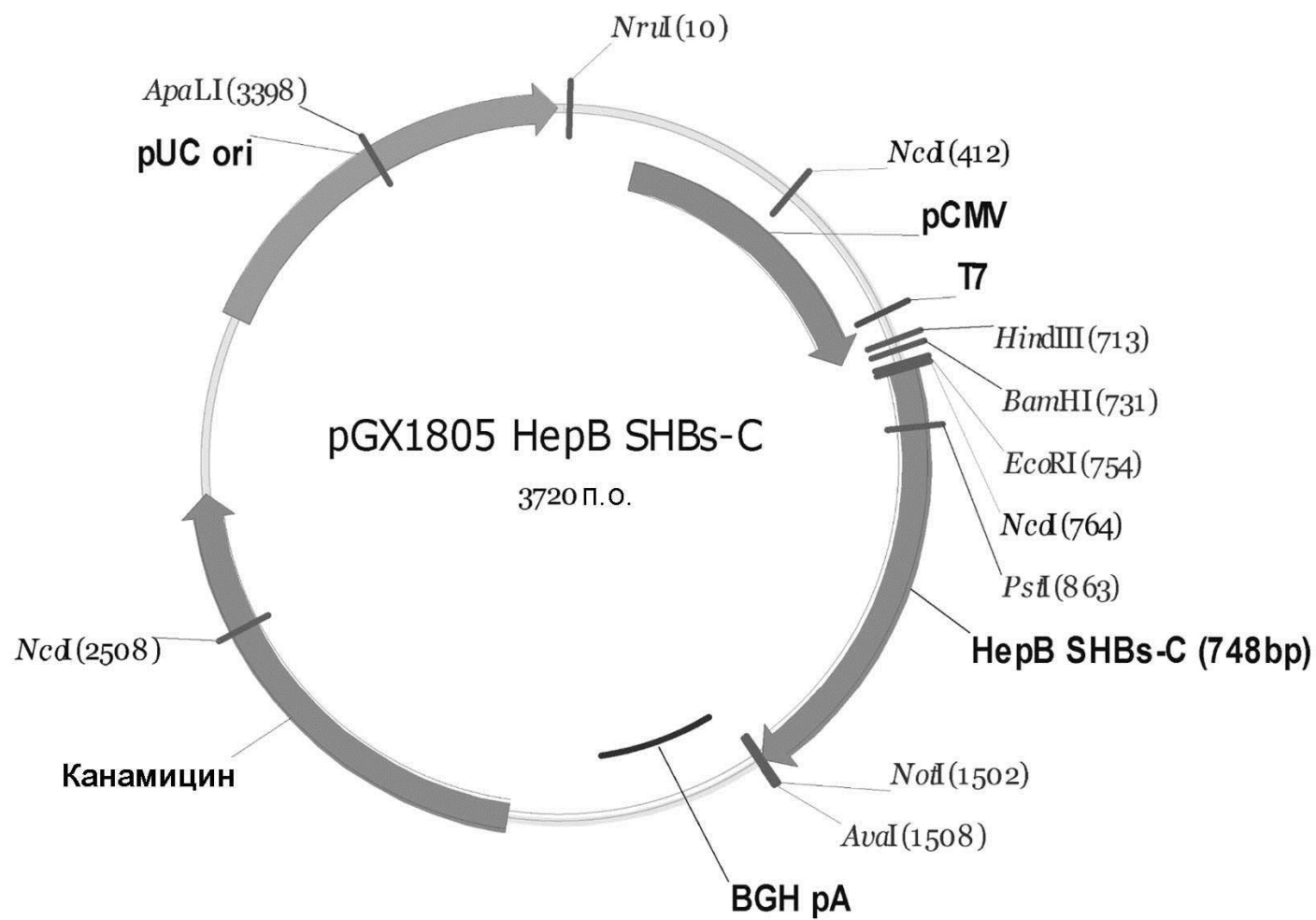
Фигура 6



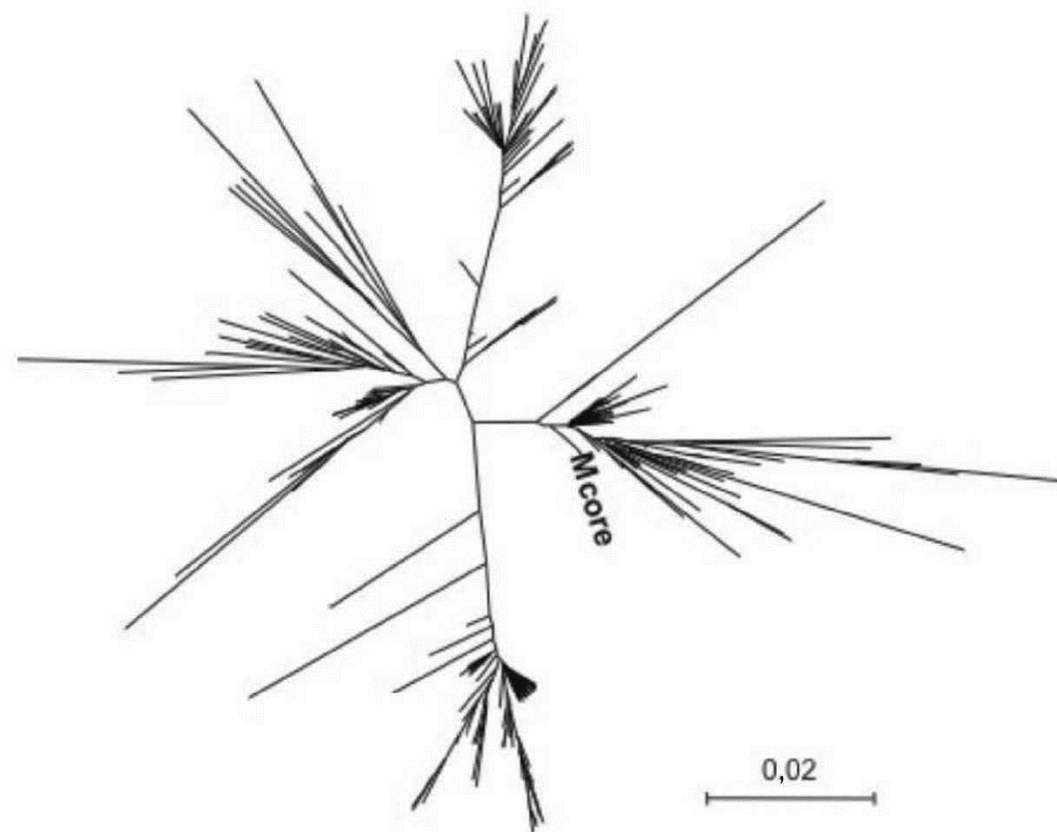
Фигура 7



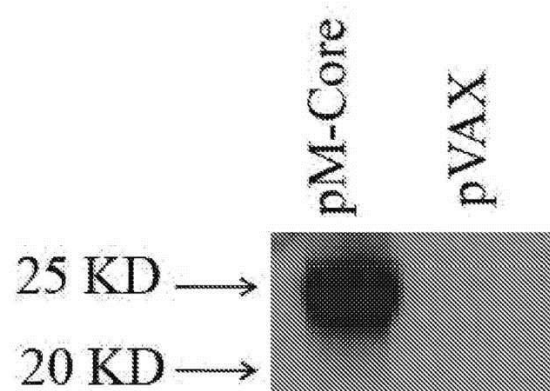
Фигура 8



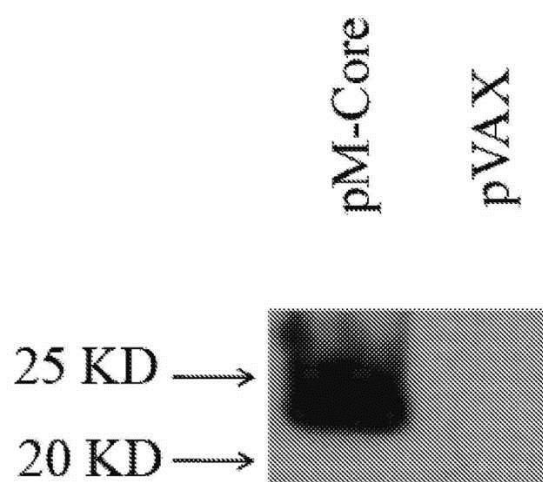
Фигура 9



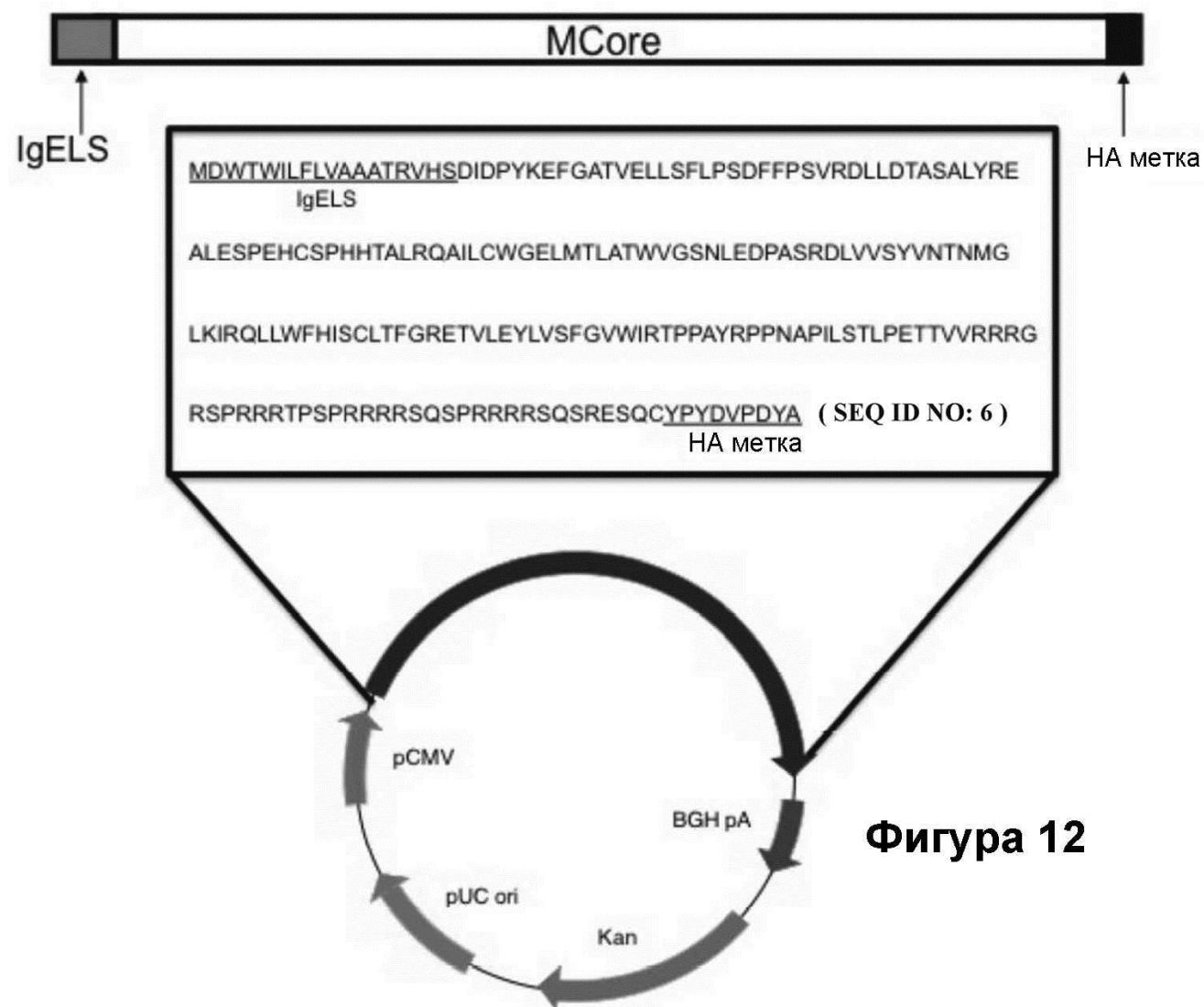
Фигура 10



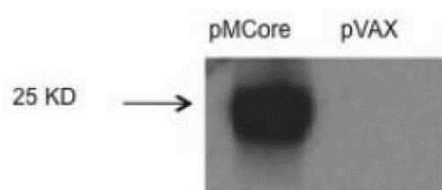
Фигура 11А



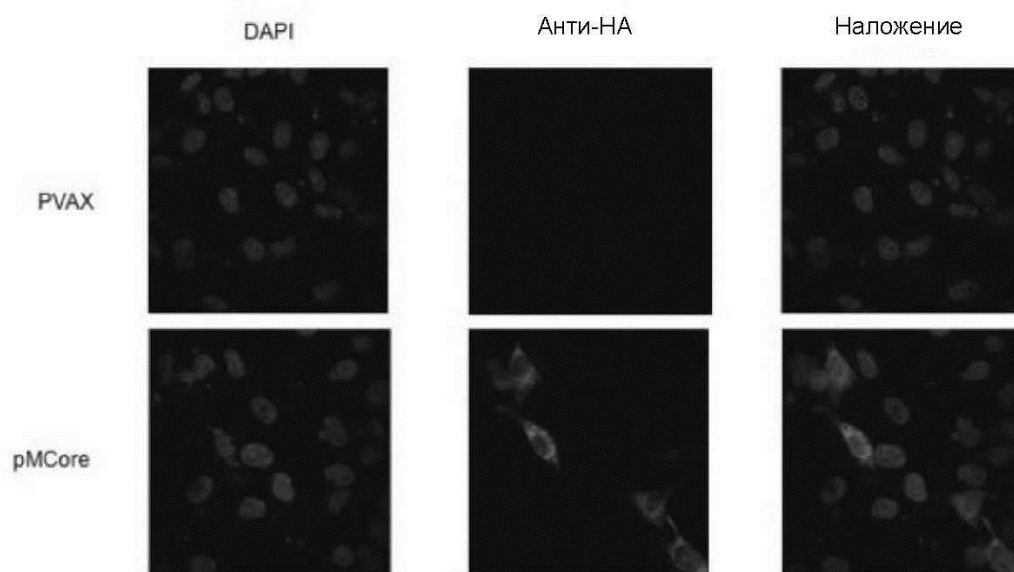
Фигура 11В



Фигура 12



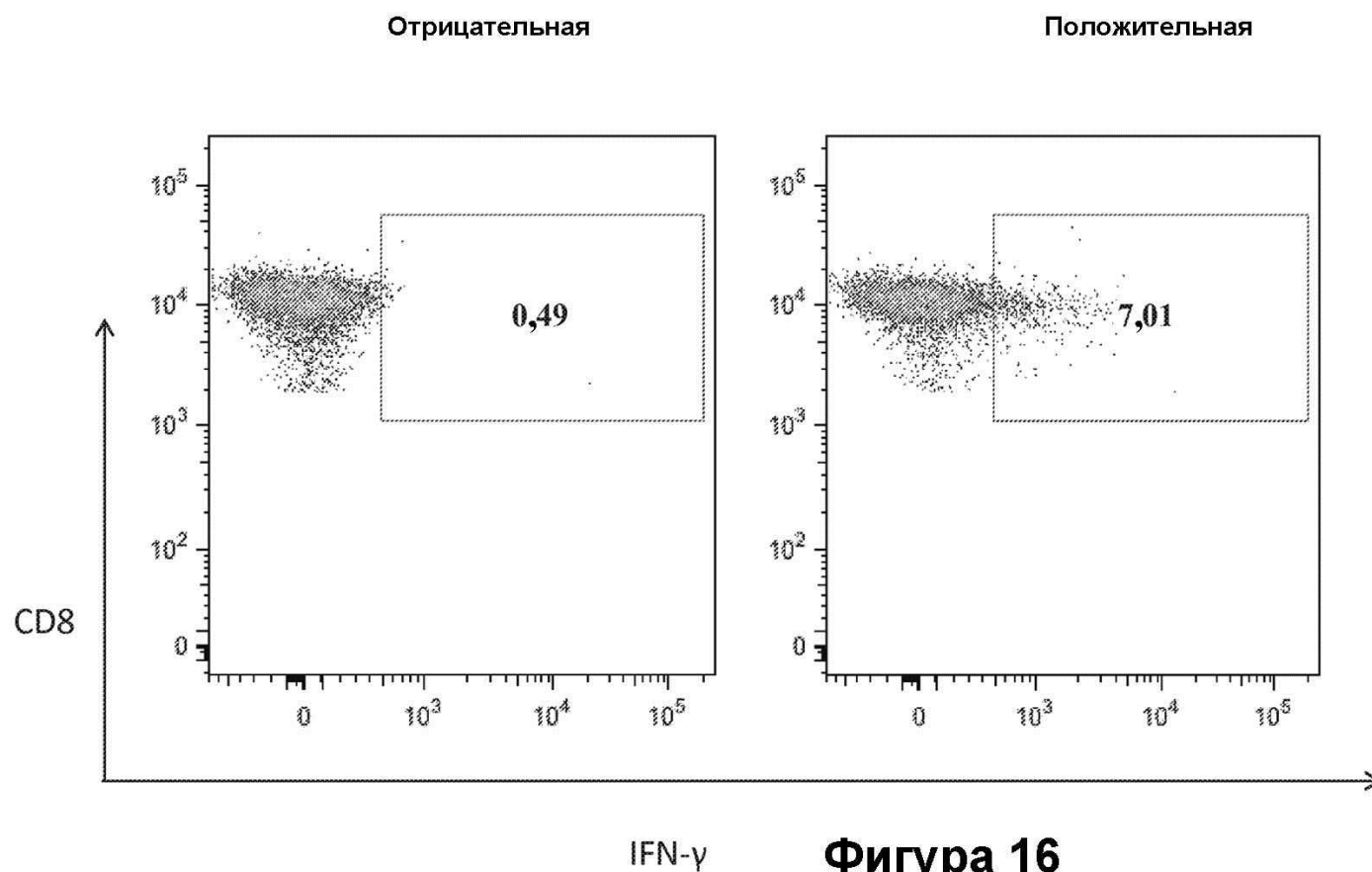
Фигура 13



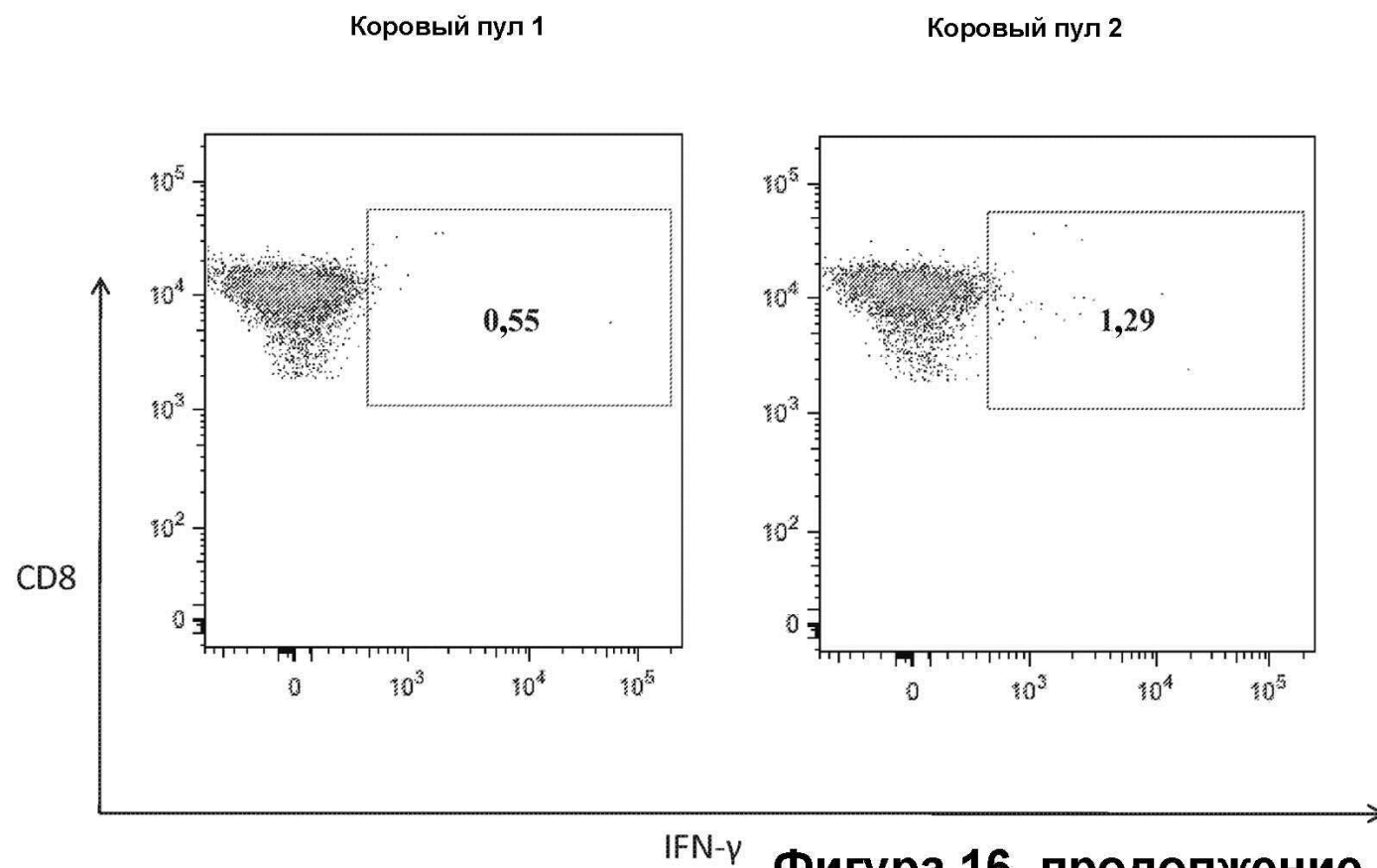
Фигура 14



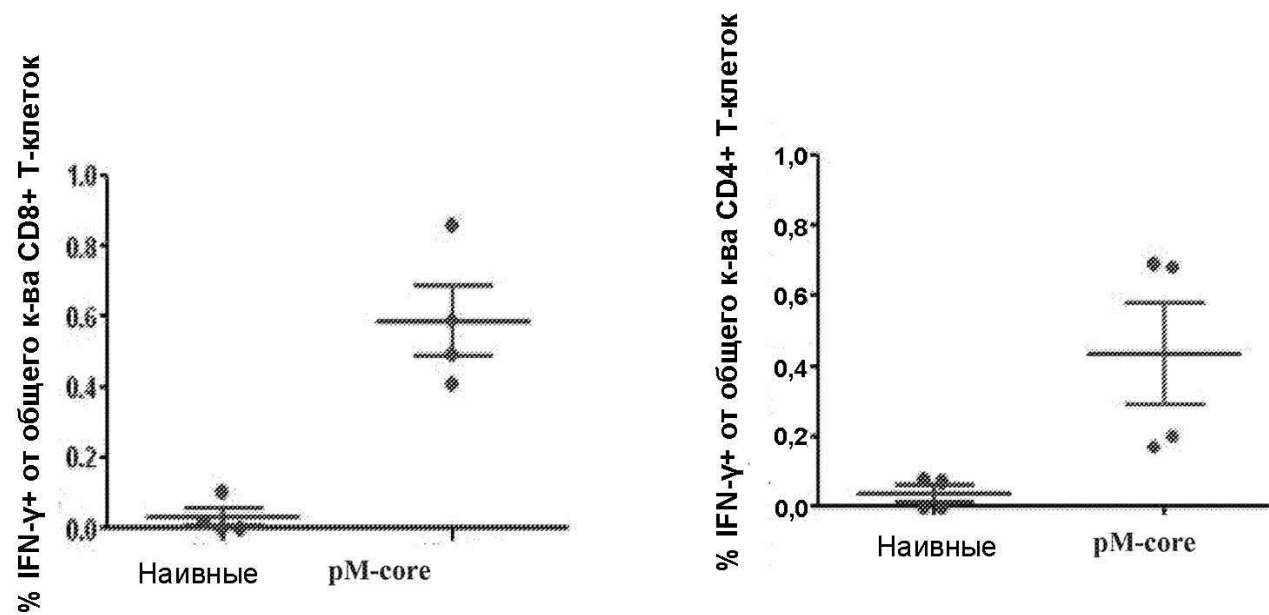
Фигура 15



Фигура 16
(Страница 1 из 2)



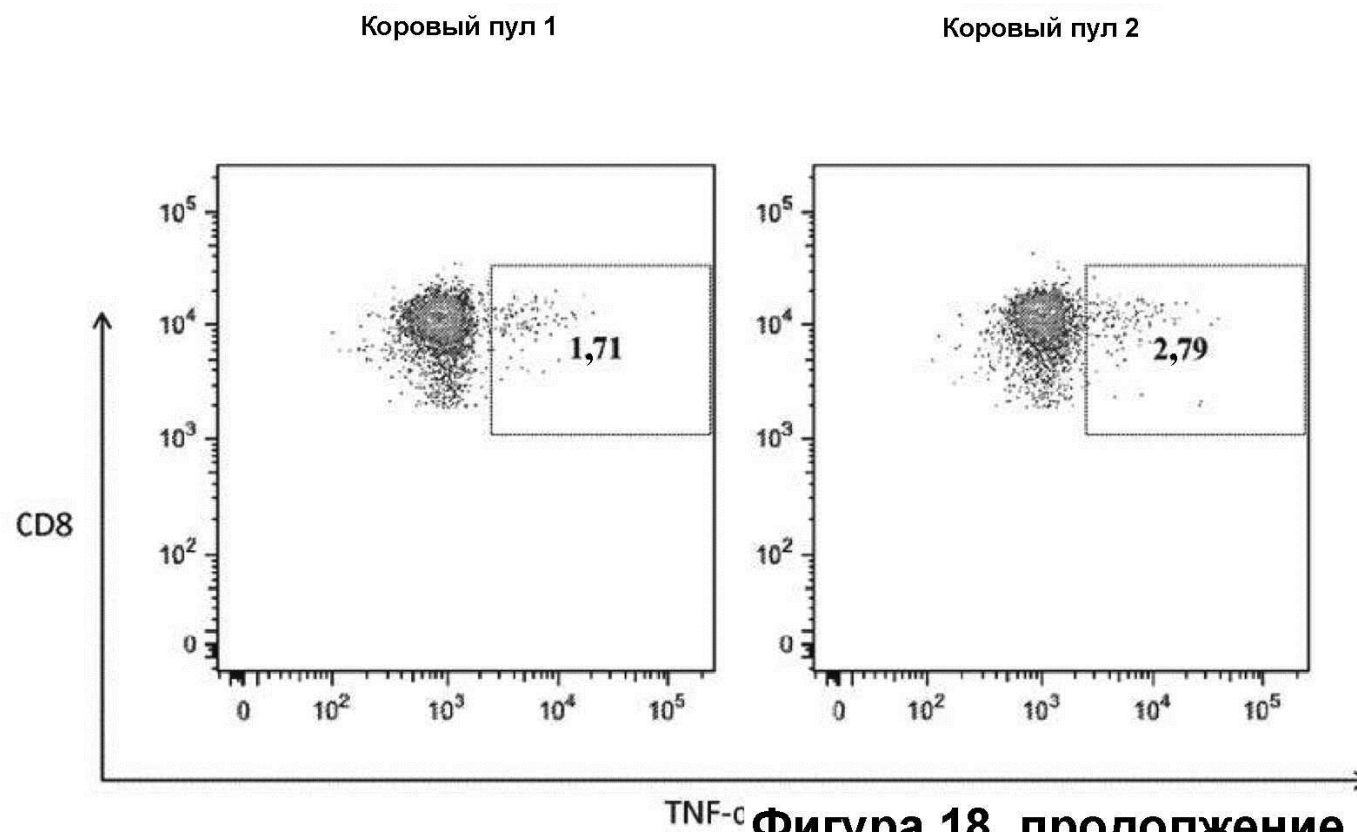
Фигура 16, продолжение
(Страница 2 из 2)



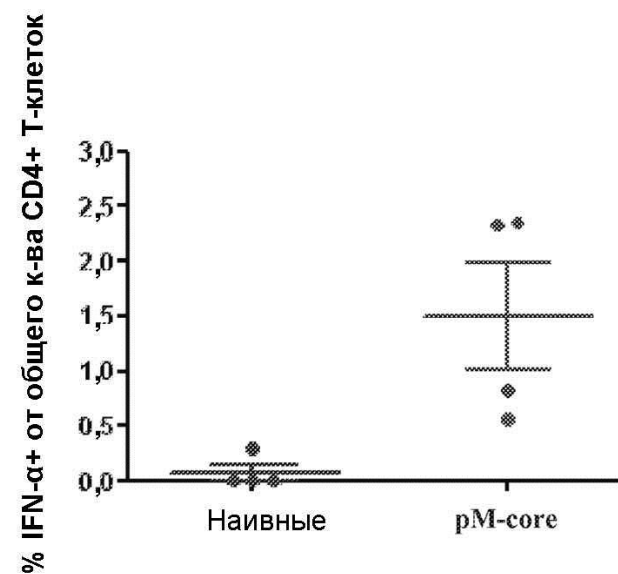
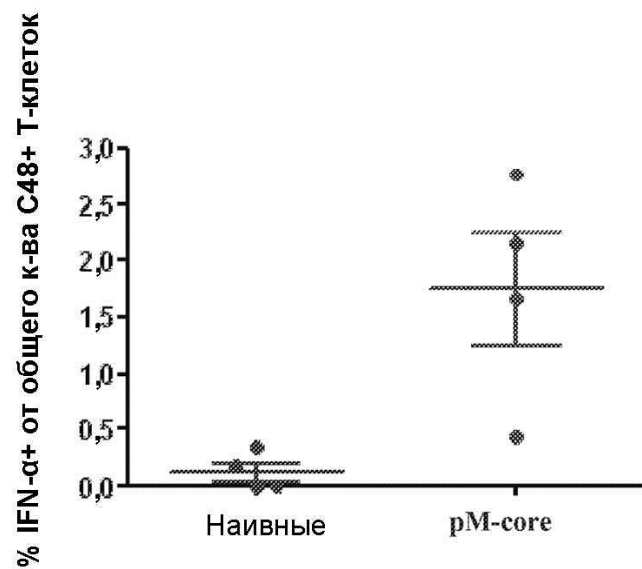
Фигура 17



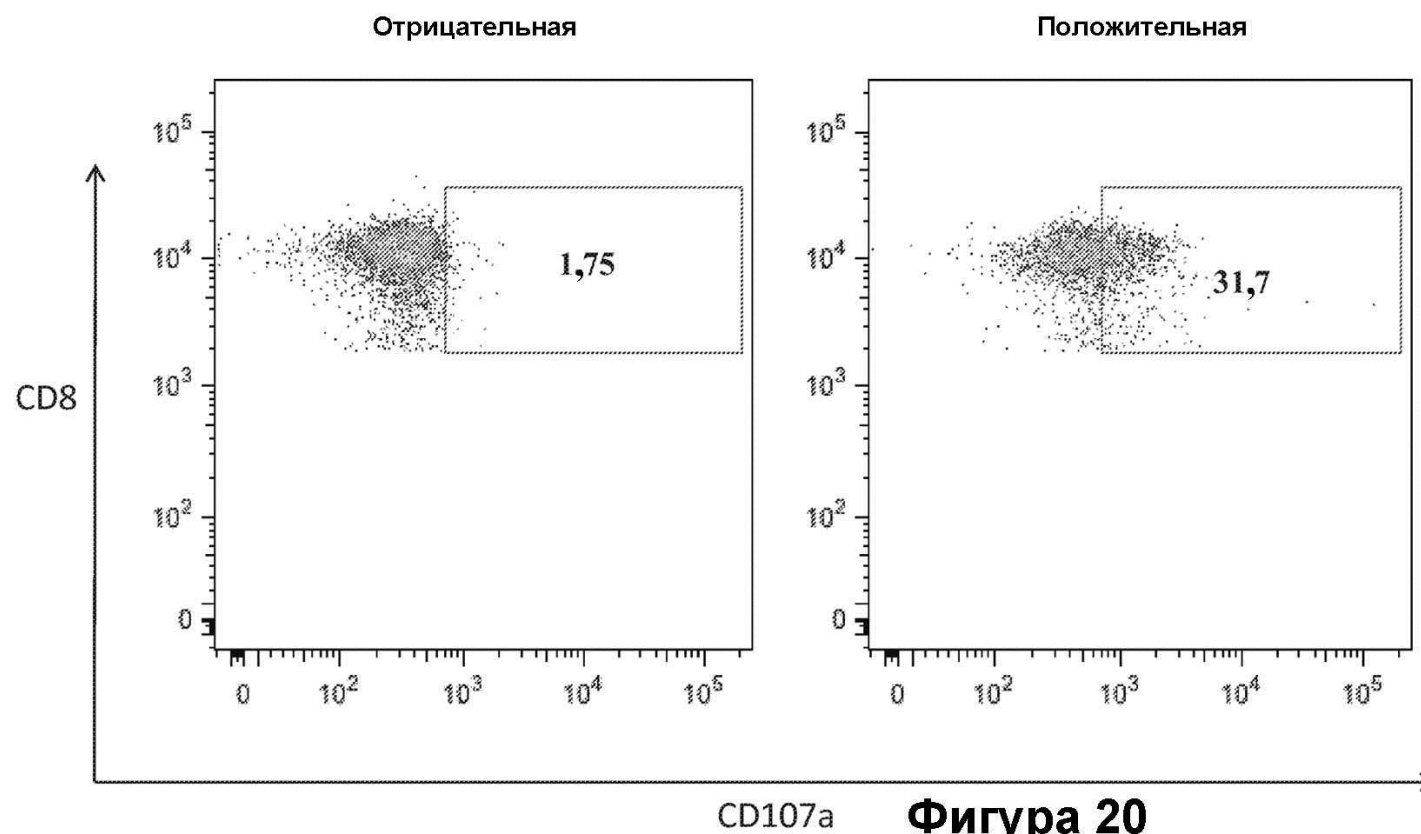
Фигура 18
(Страница 1 из 2)



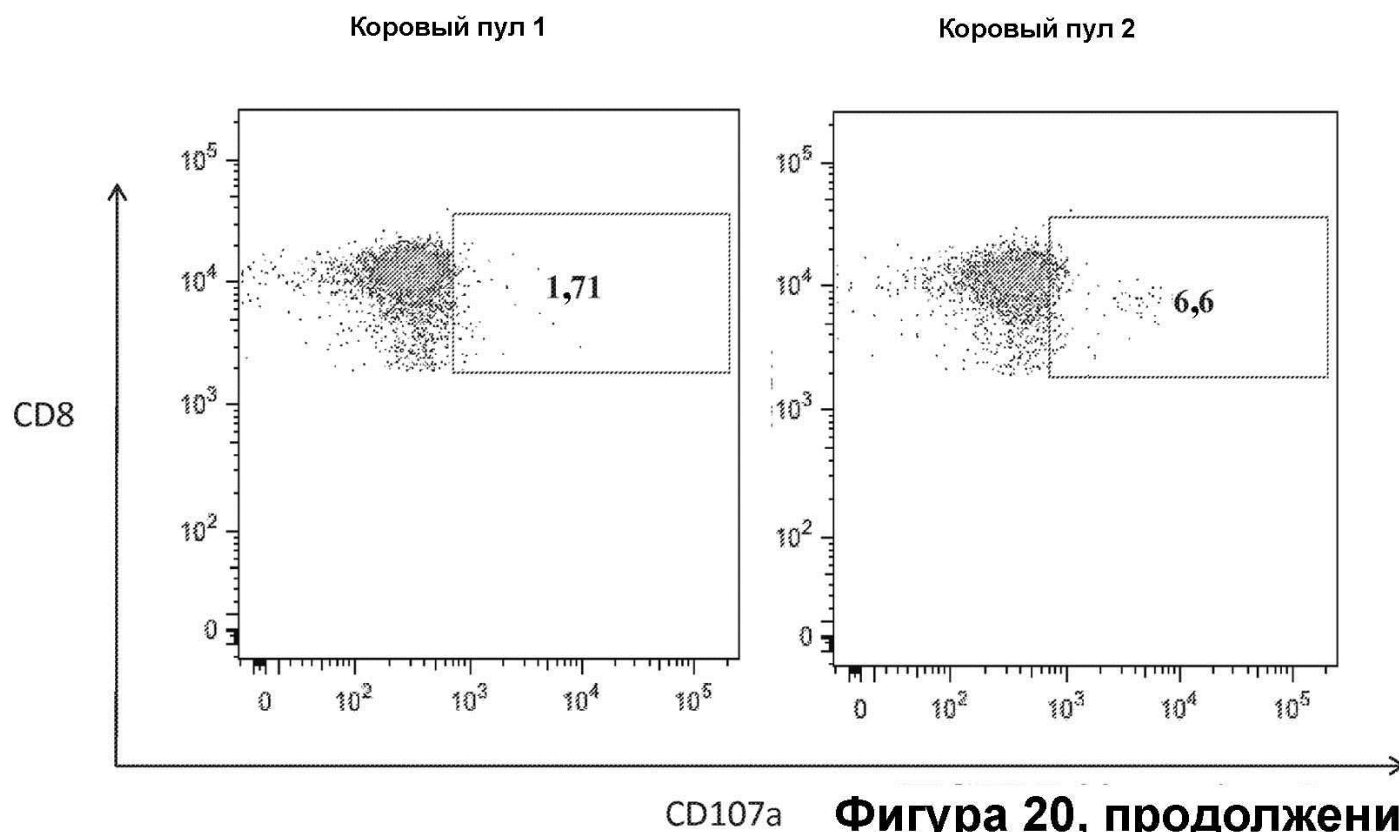
Фигура 18, продолжение
(Страница 2 из 2)



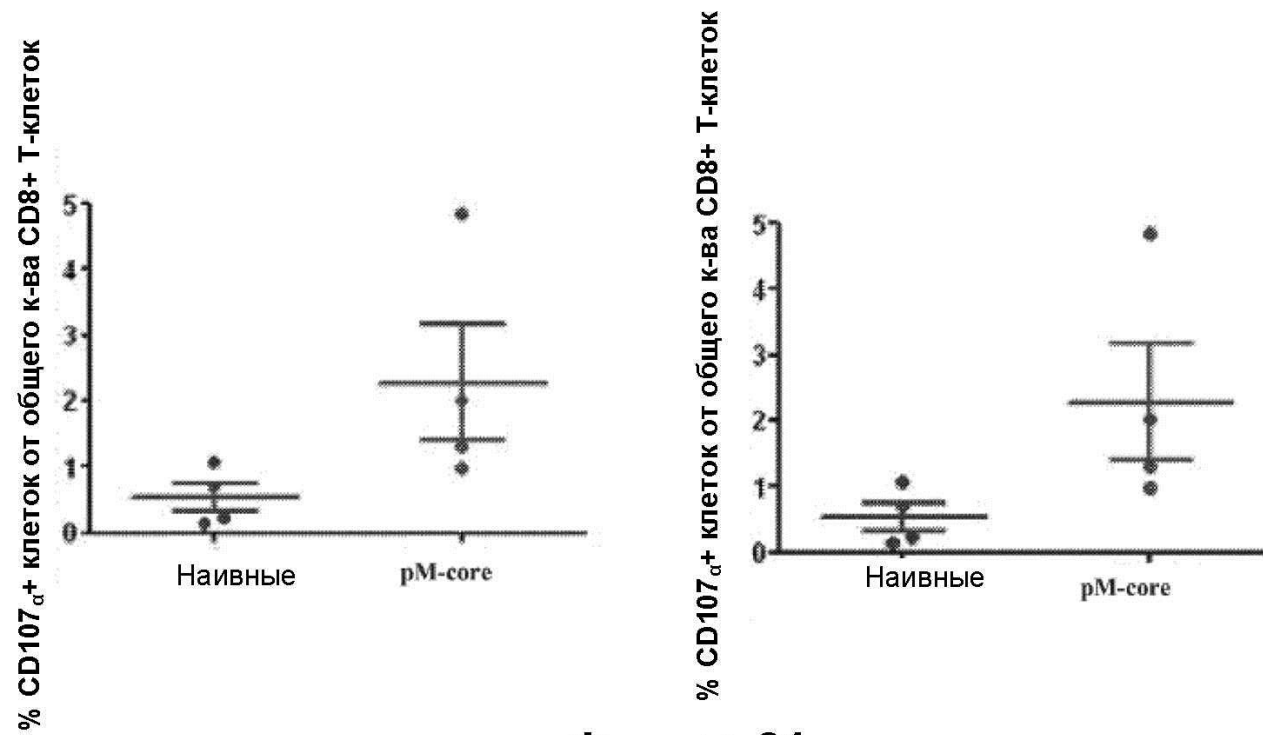
Фигура 19



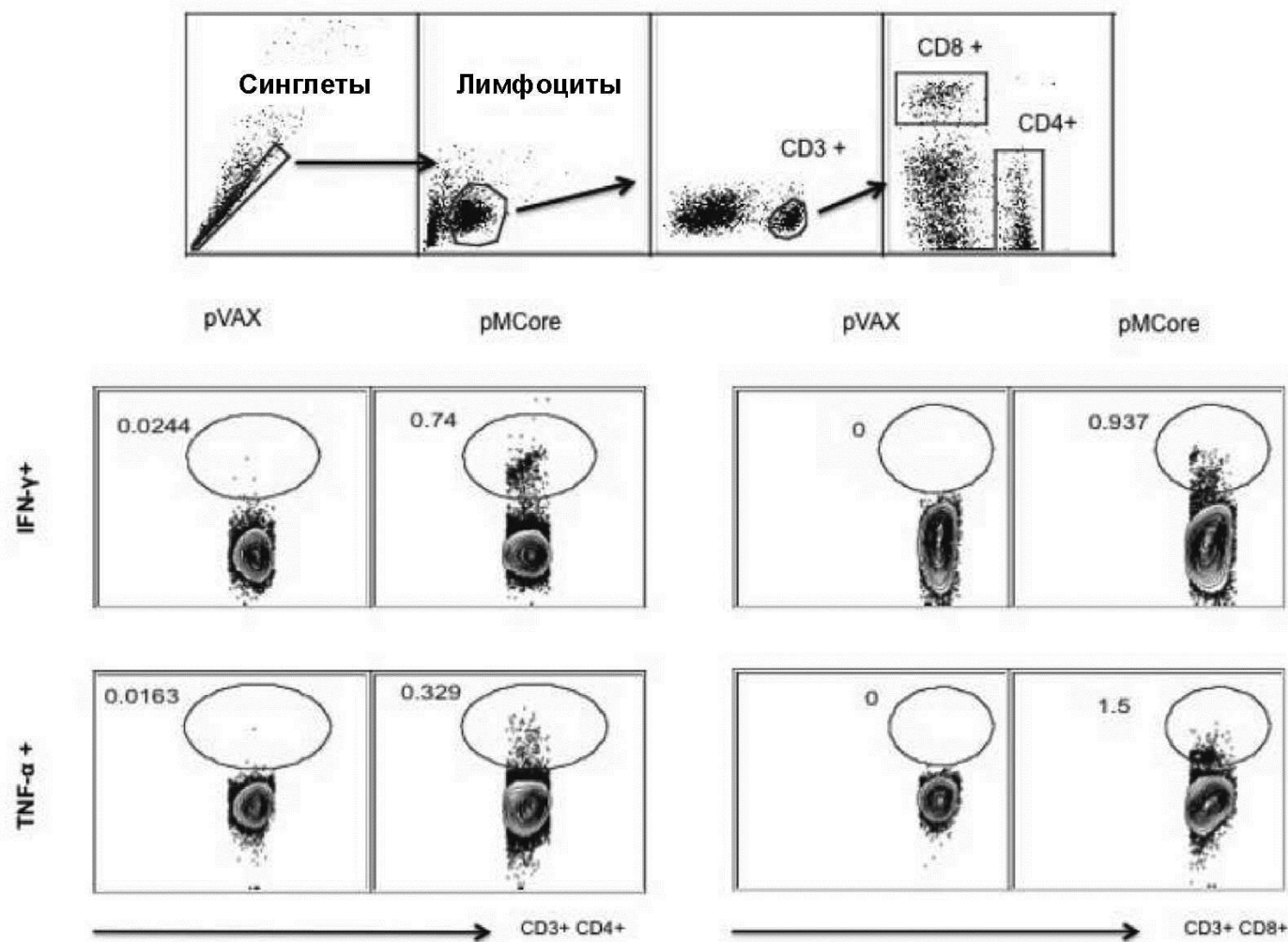
Фигура 20
(Страница 1 из 2)



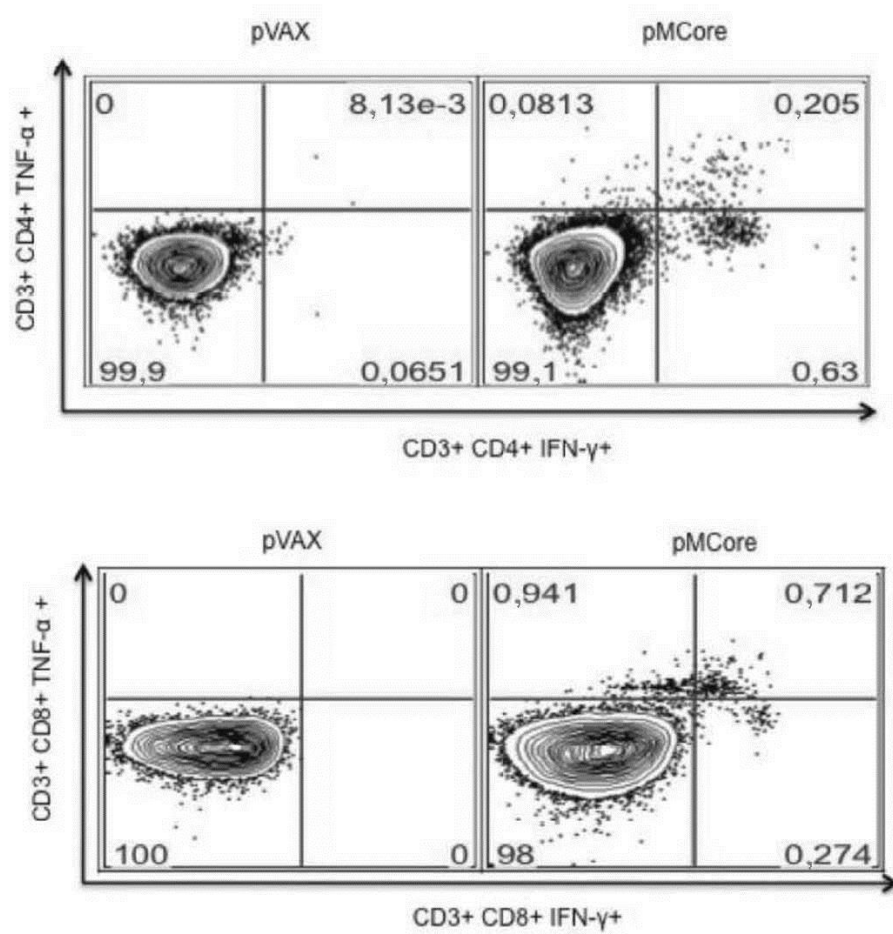
Фигура 20, продолжение
(Страница 2 из 2)



Фигура 21

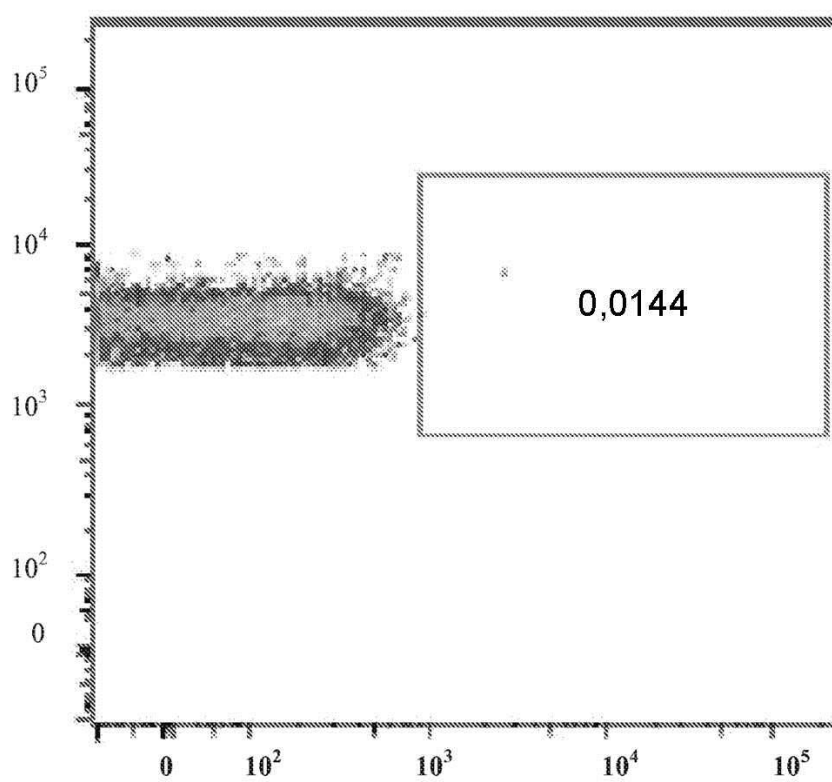


Фигура 22

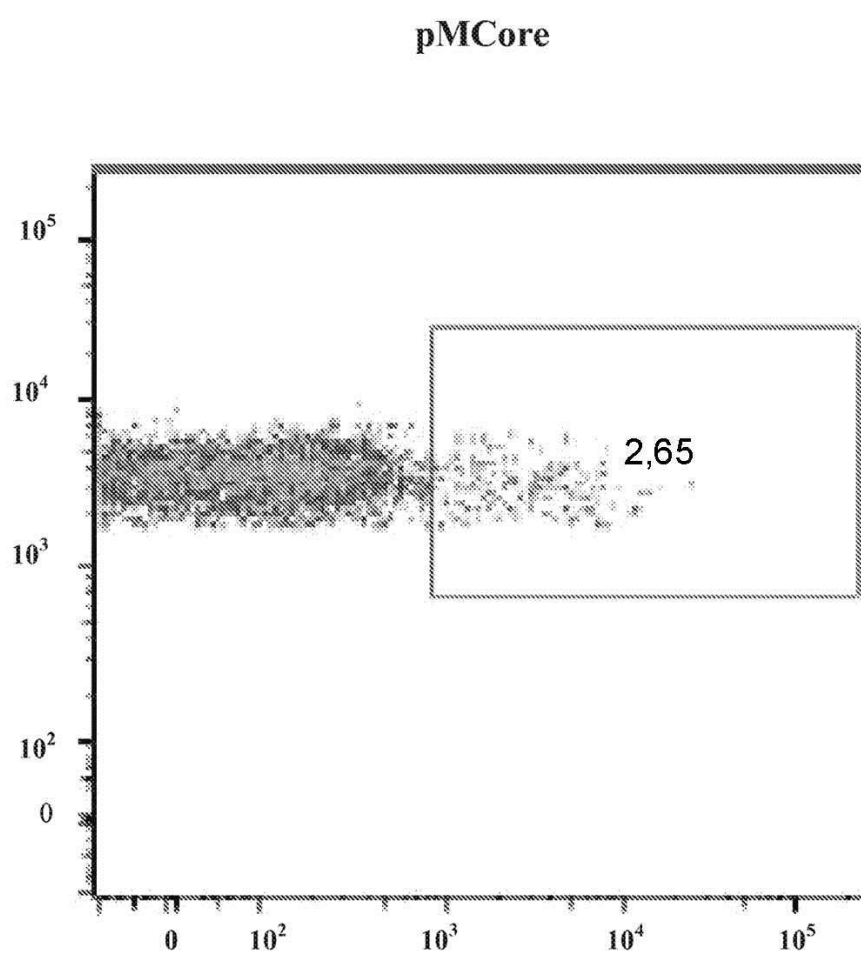


Фигура 23

pVAX

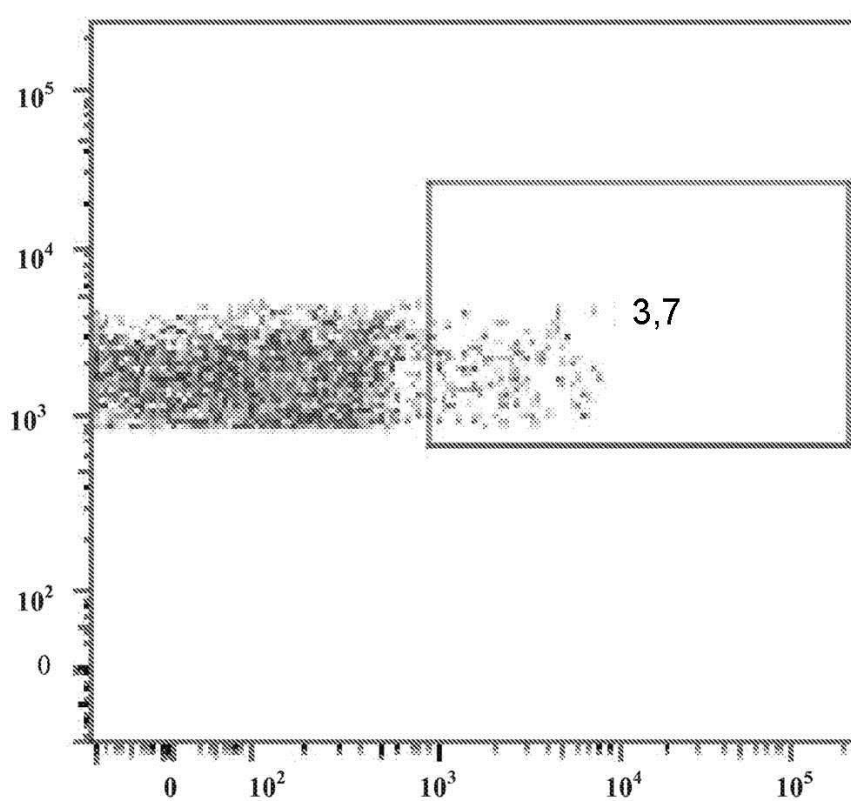


Фигура 24
(Страница 1 из 3)

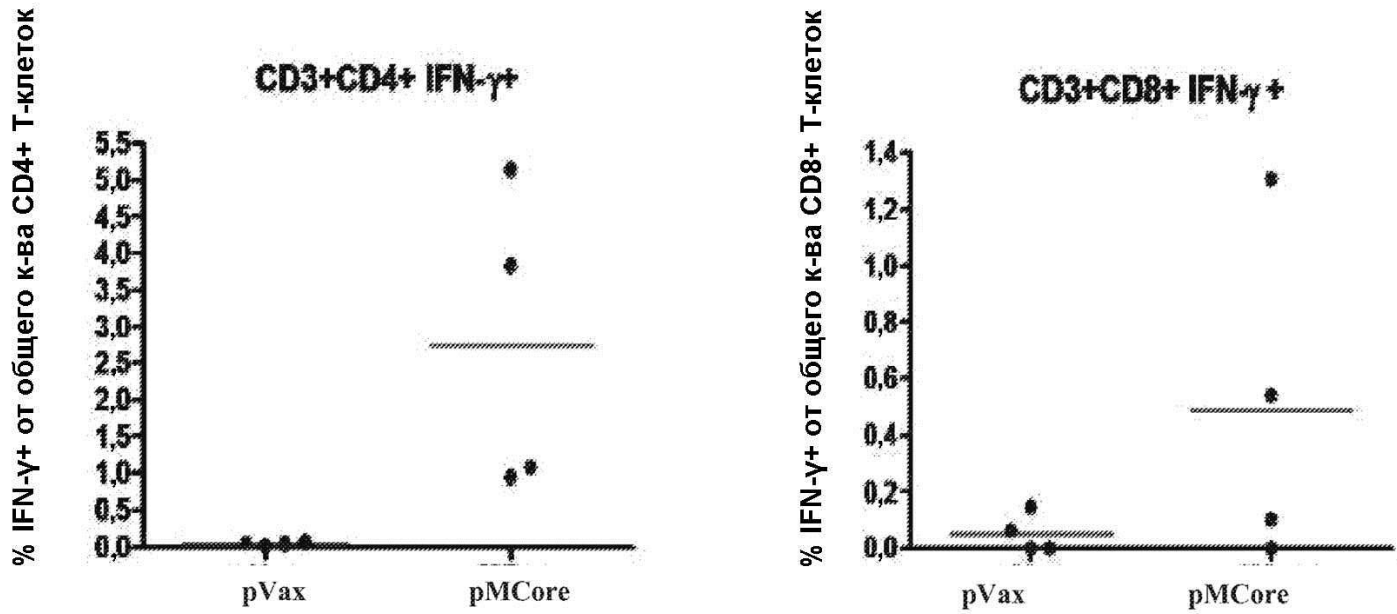


Фигура 24, продолжение
(Страница 2 из 3)

Pos. Контроль

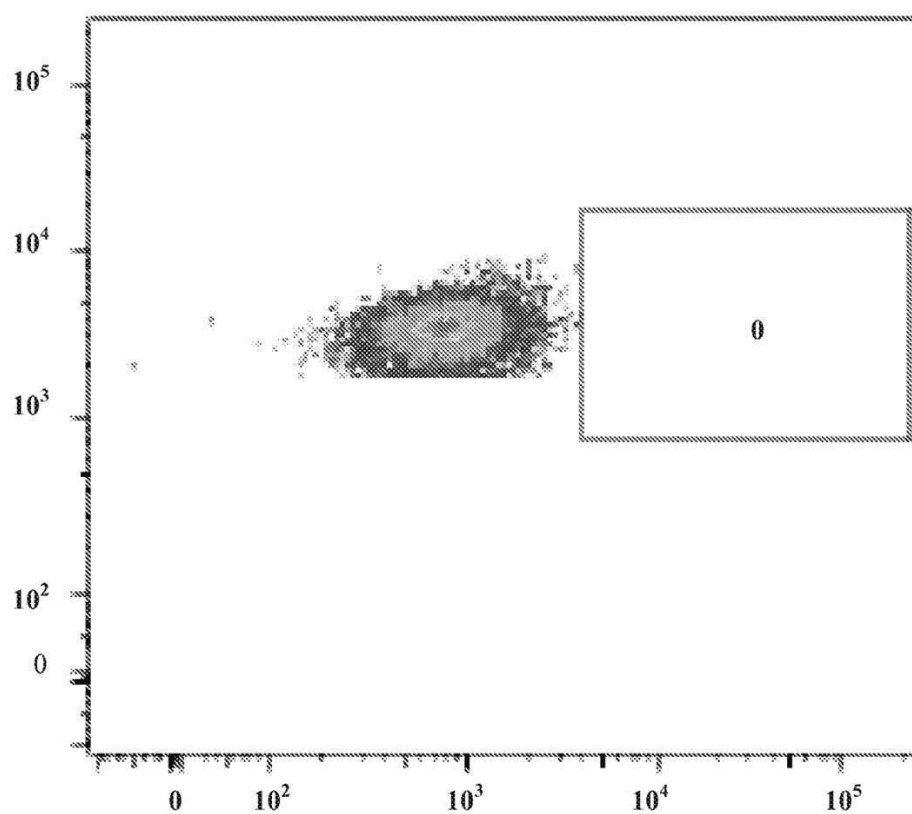


Фигура 24, продолжение
(Страница 3 из 3)

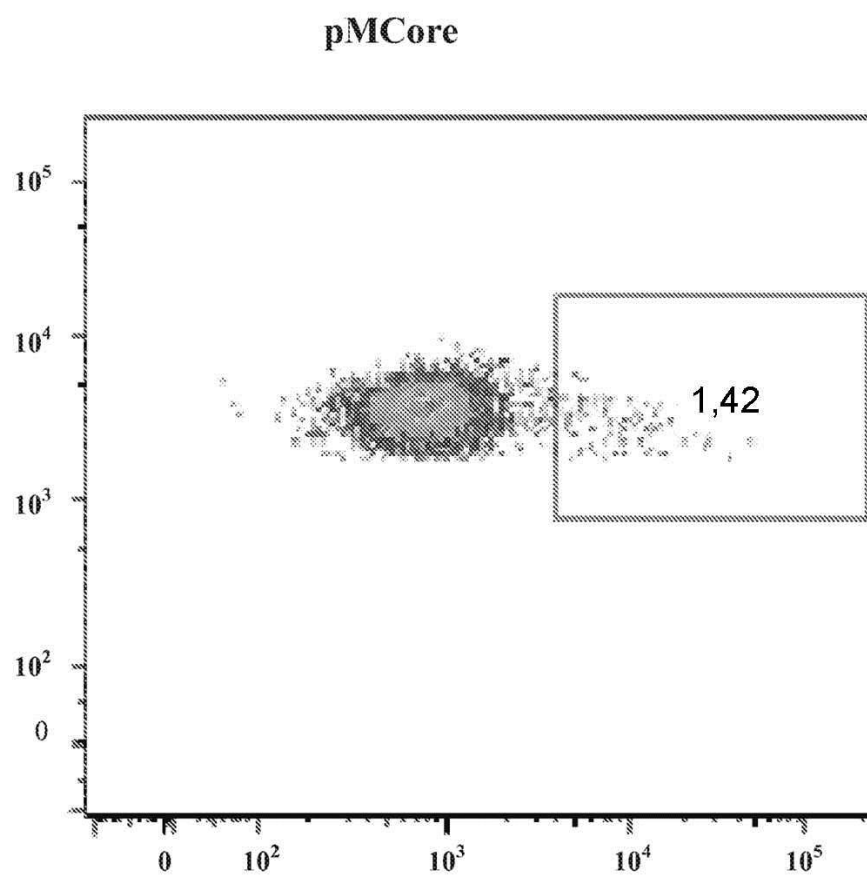


Фигура 25

pVAX

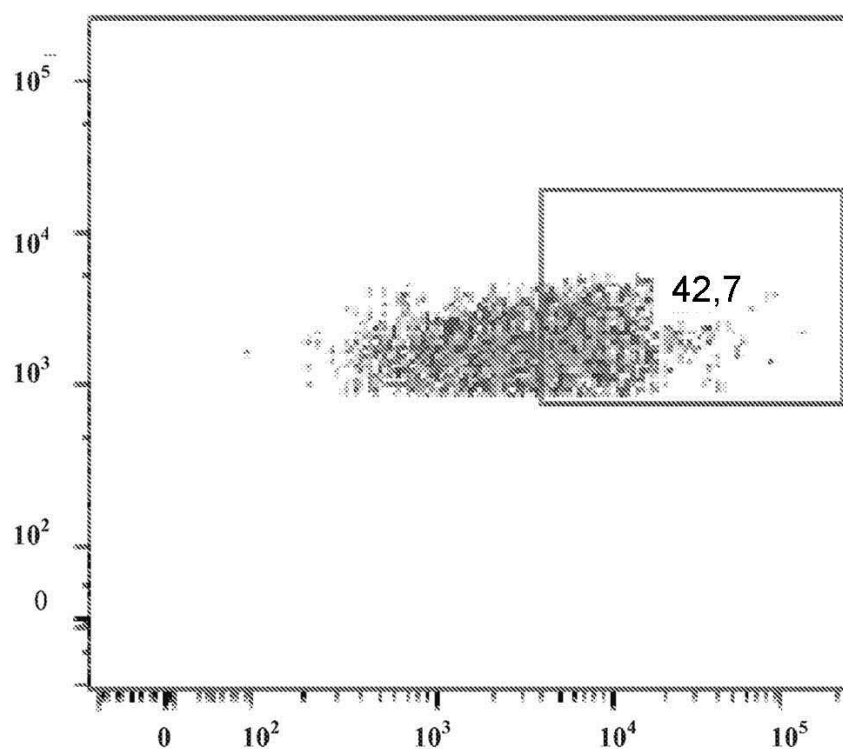


Фигура 26
(Страница 1 из 3)



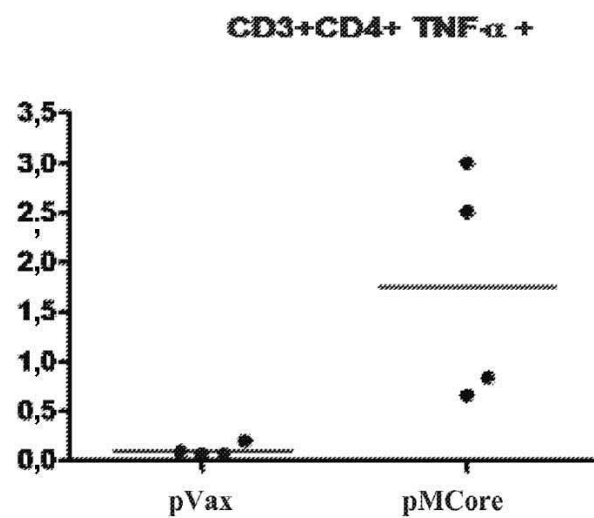
Фигура 26, продолжение
(Страница 2 из 3)

Pos. Контроль

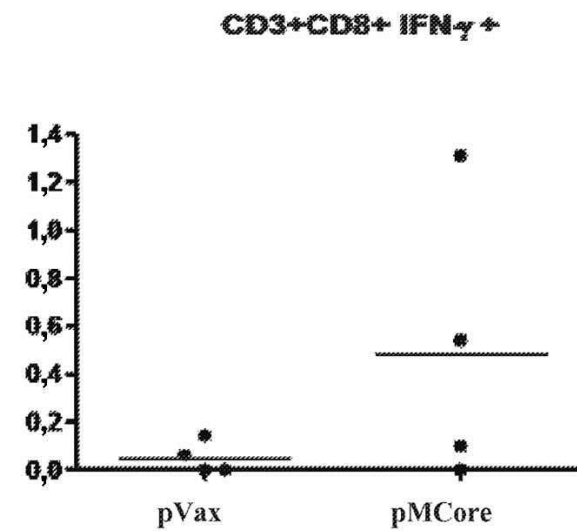


Фигура 26, продолжение
(Страница 3 из 3)

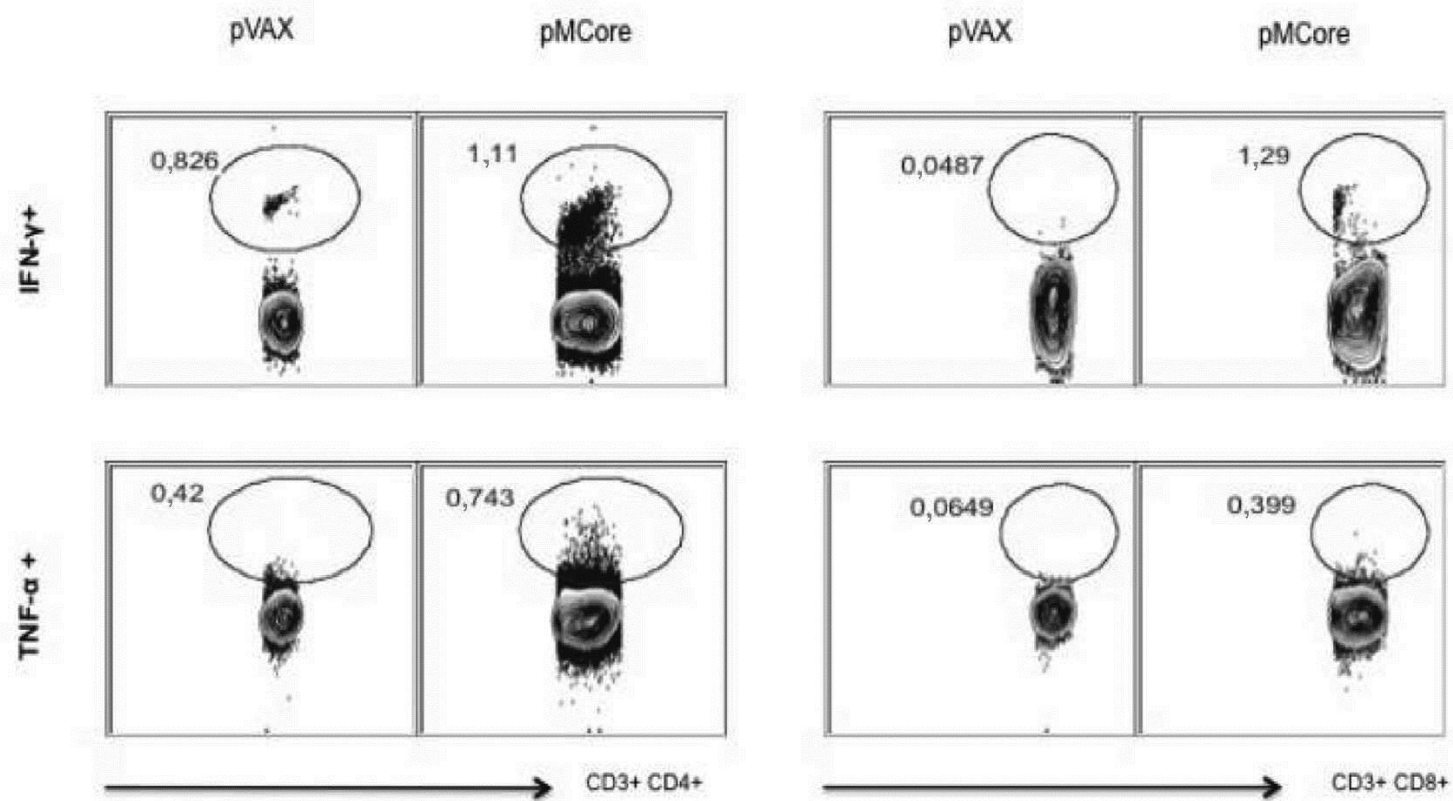
% IFN- γ + от общего к-ва CD4+ Т-клеток



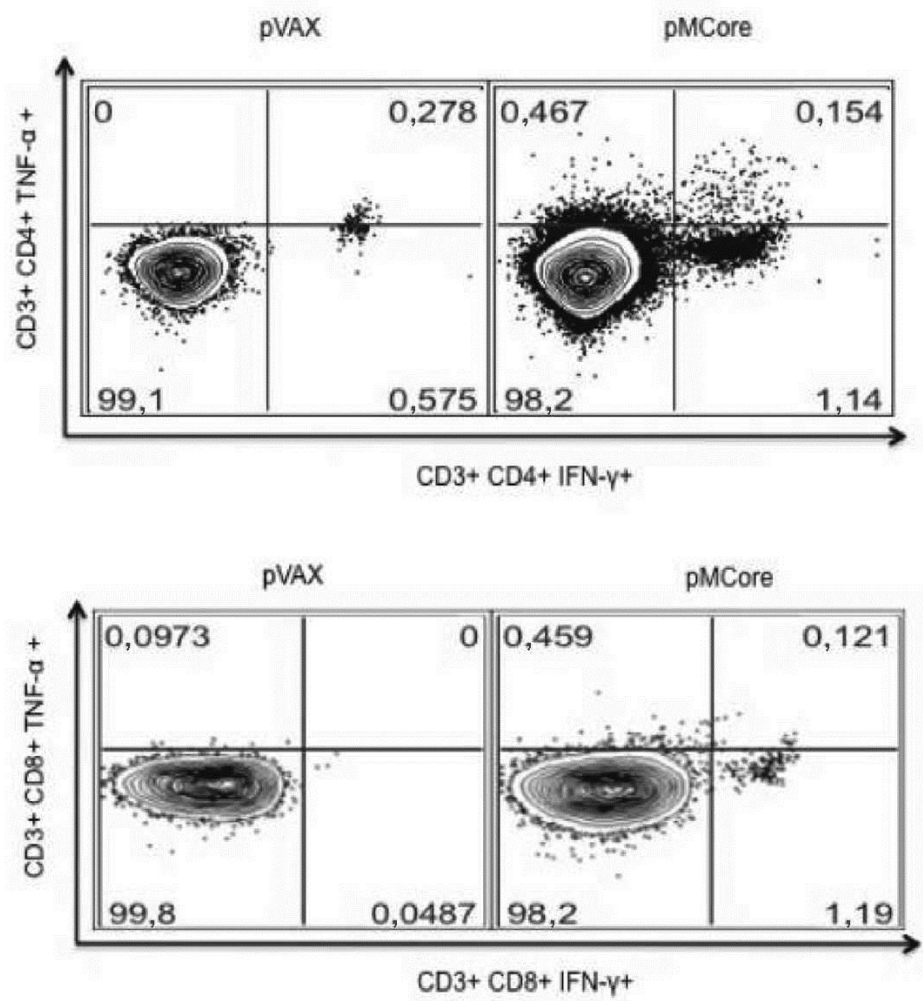
% IFN- γ + от общего к-ва CD8+ Т-клеток



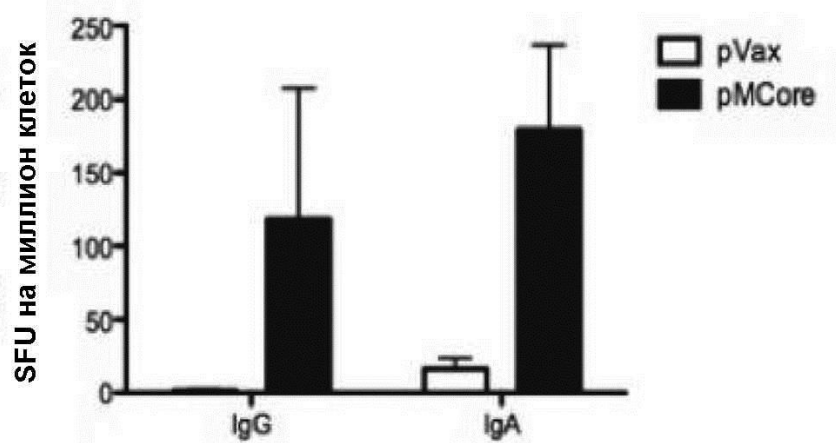
Фигура 27



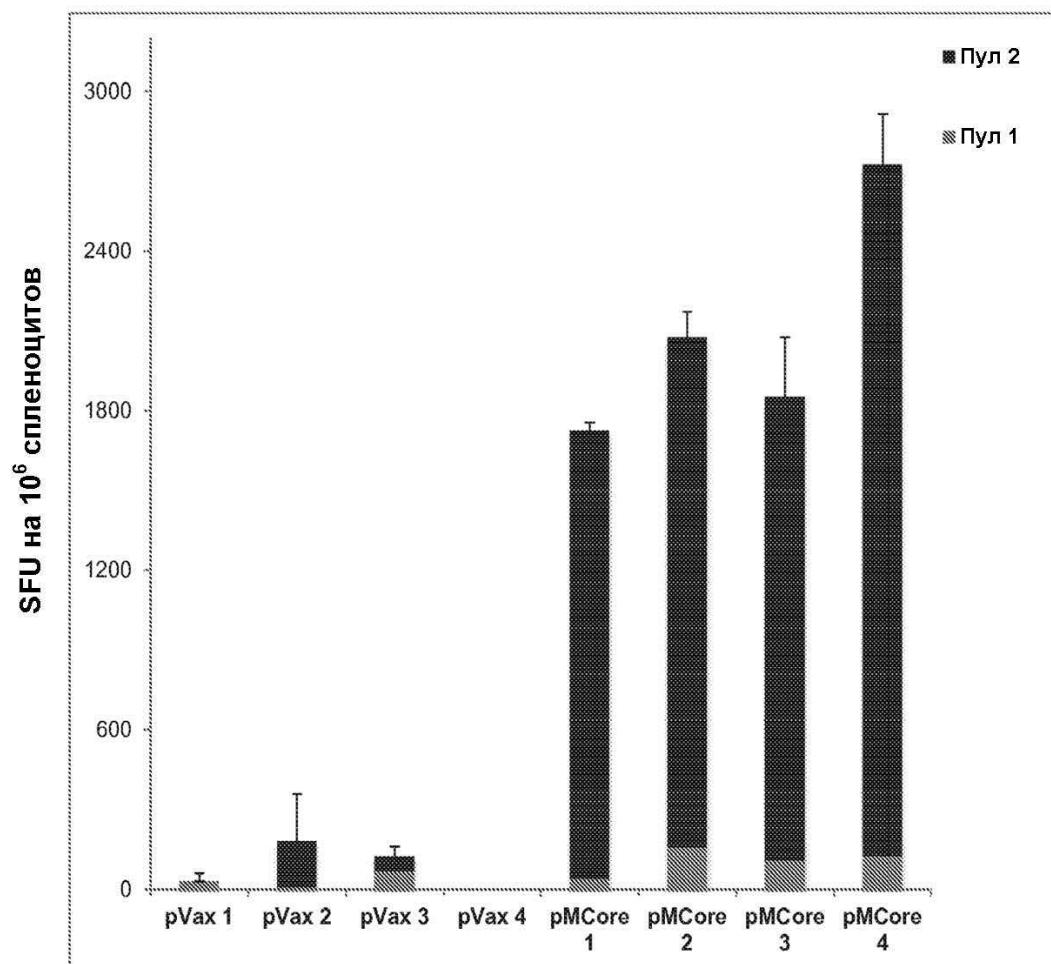
Фигура 28



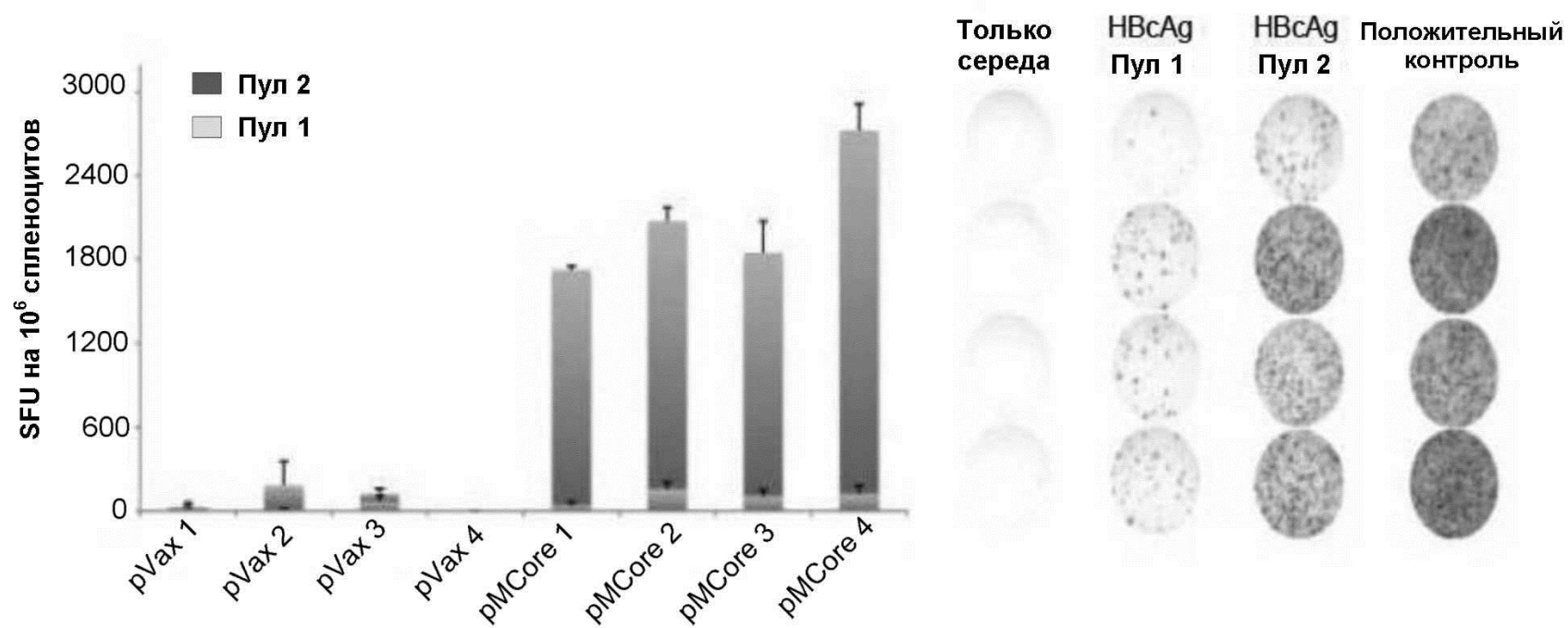
Фигура 29



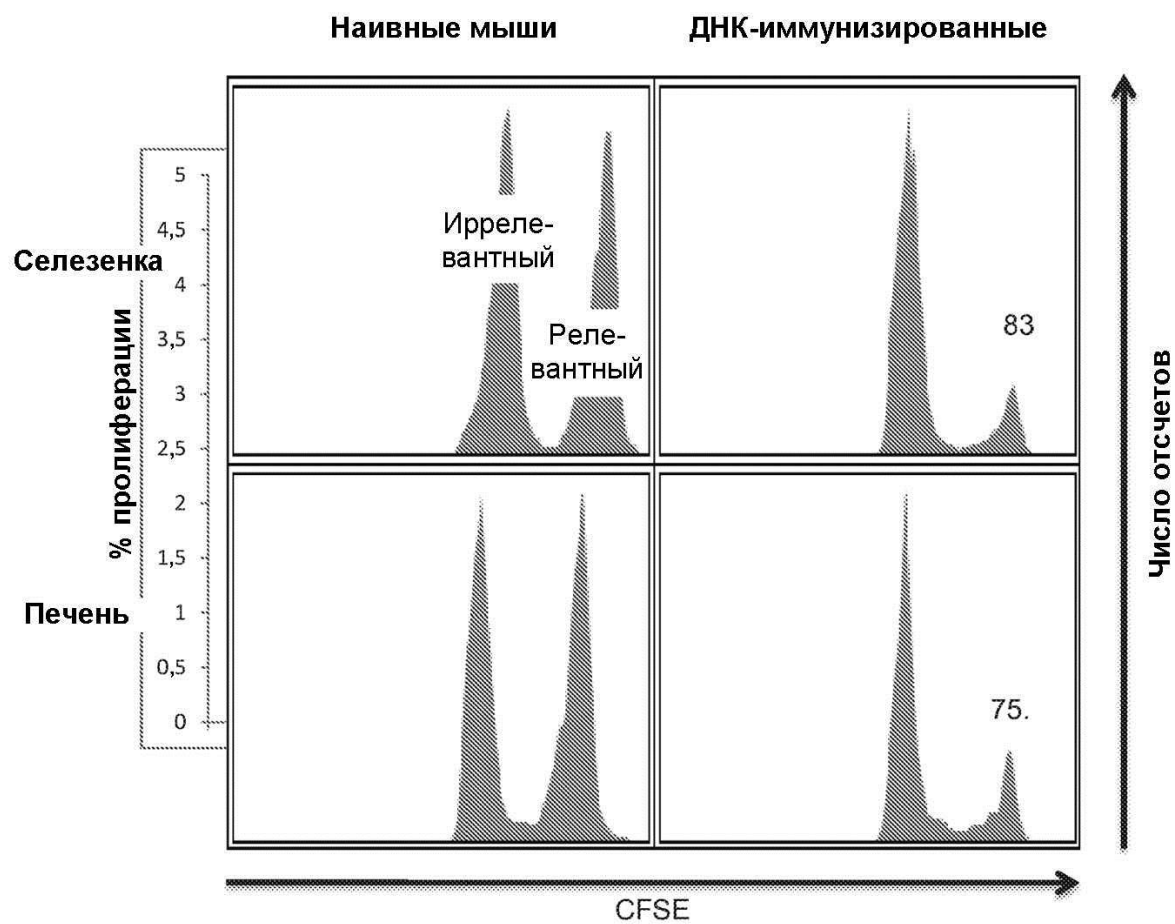
Фигура 30



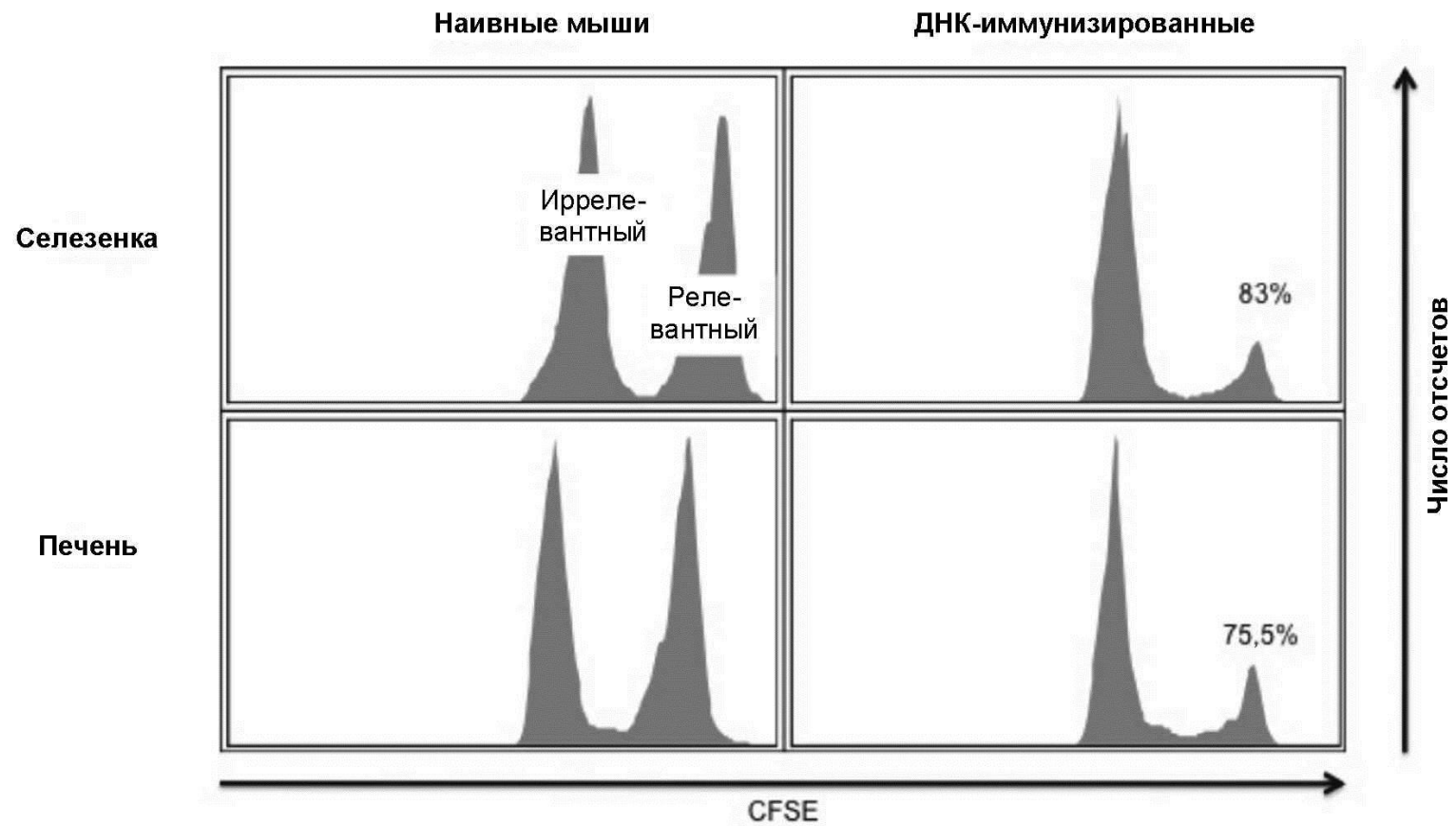
Фигура 31



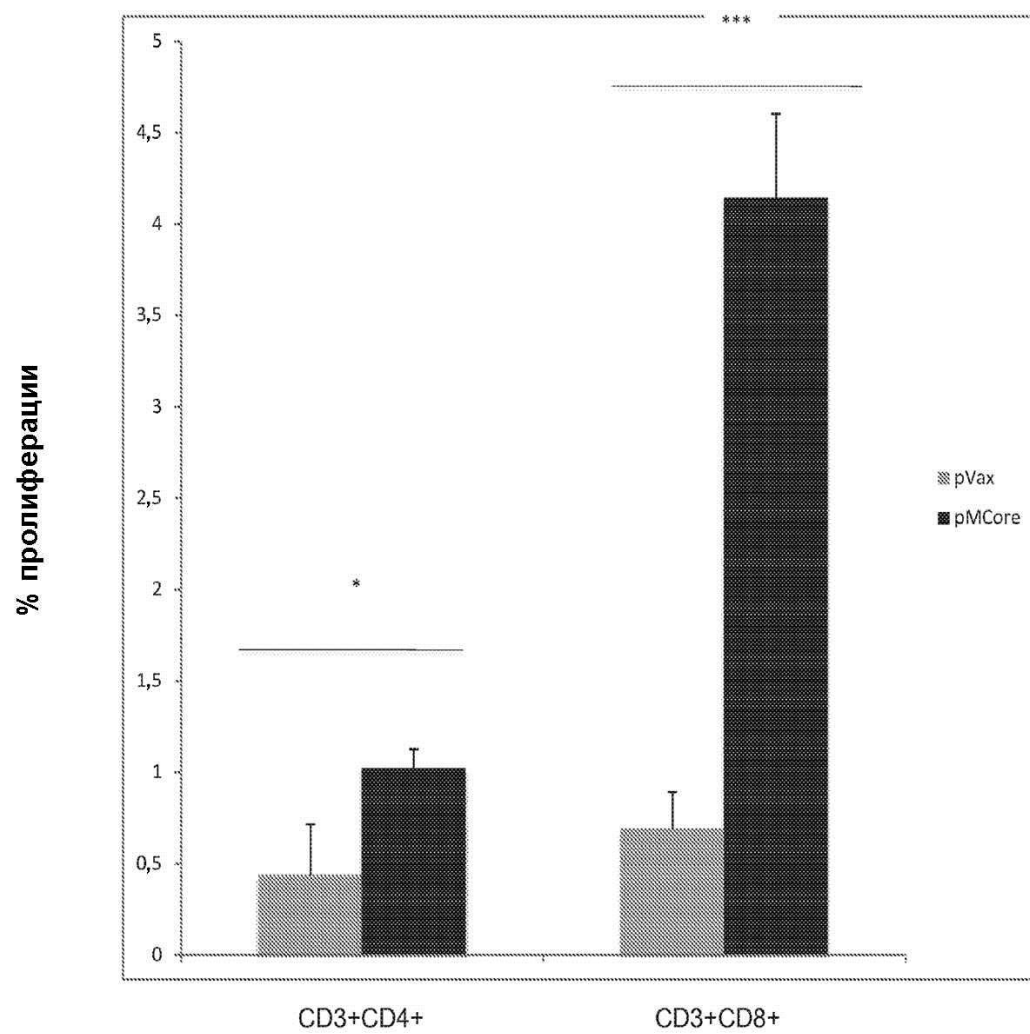
Фигура 32



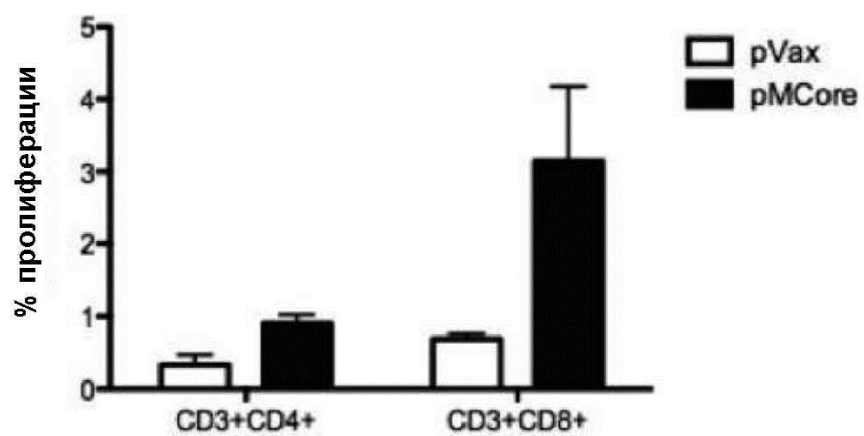
Фигура 33



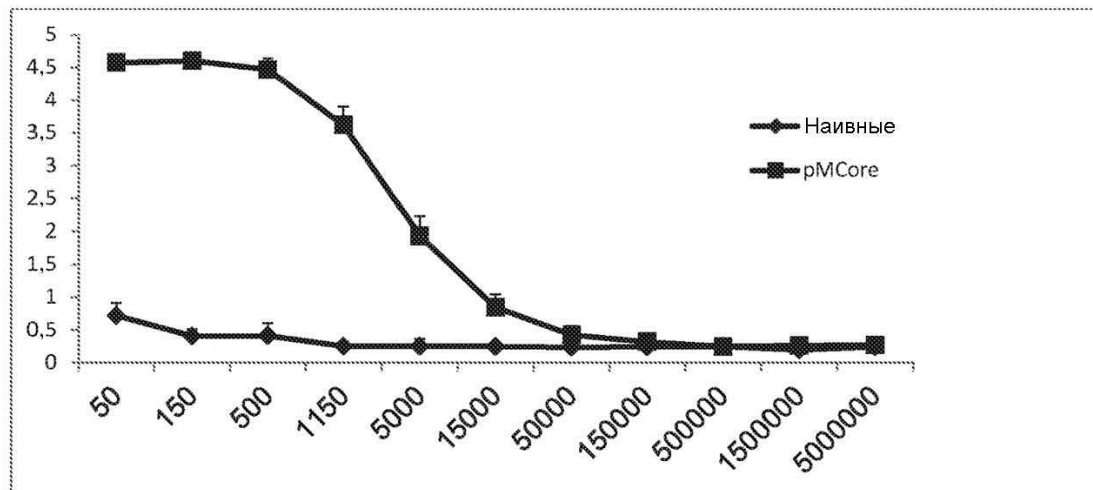
Фигура 34



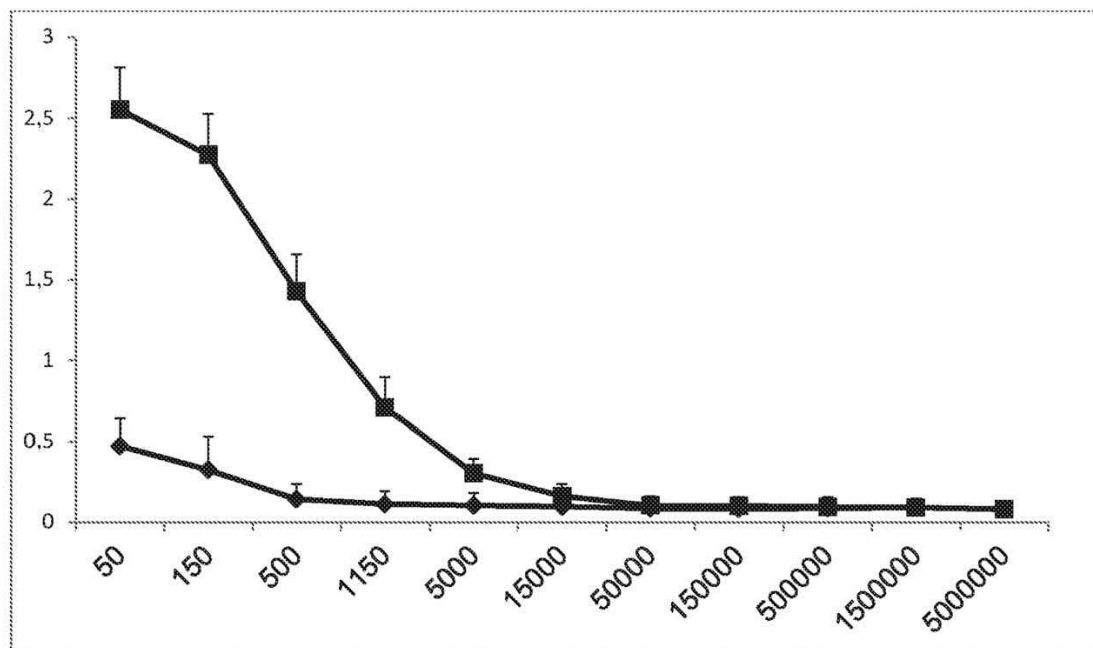
Фигура 35



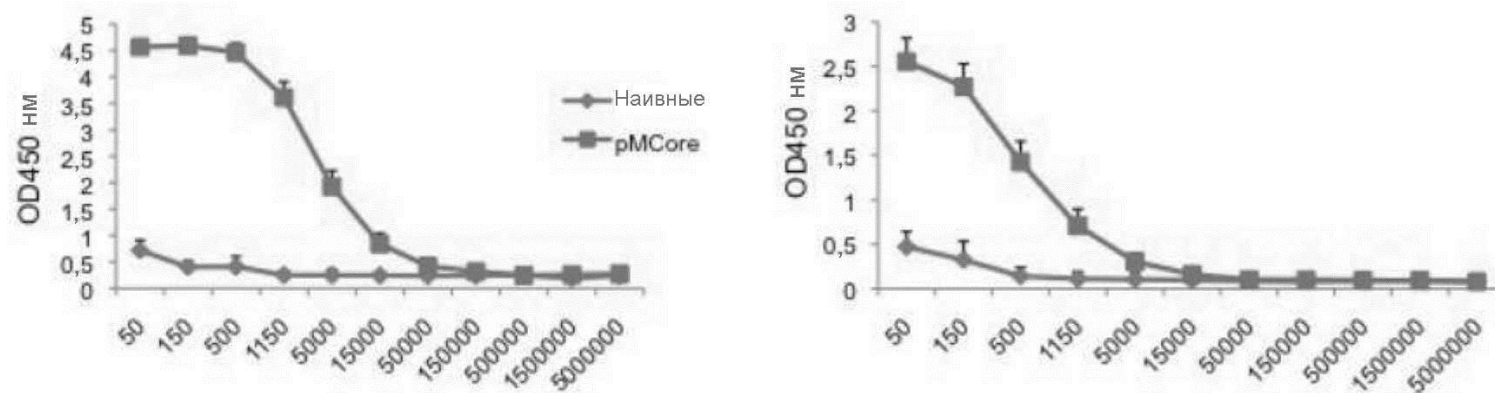
Фигура 36



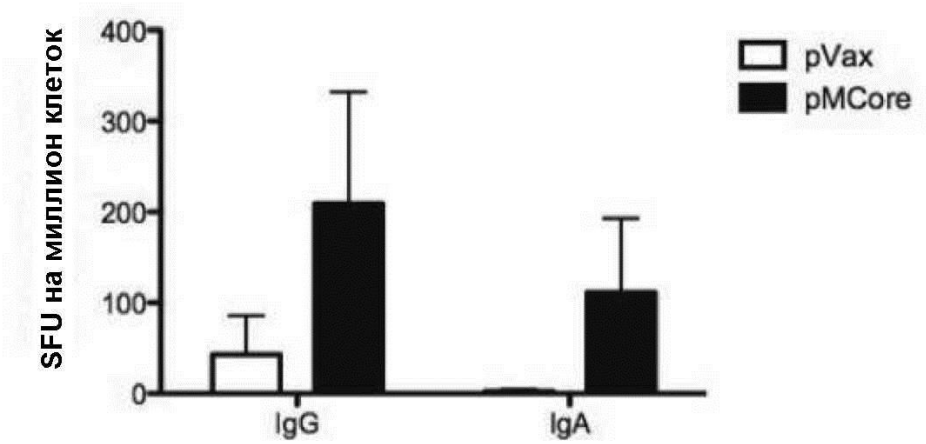
Фигура 37А



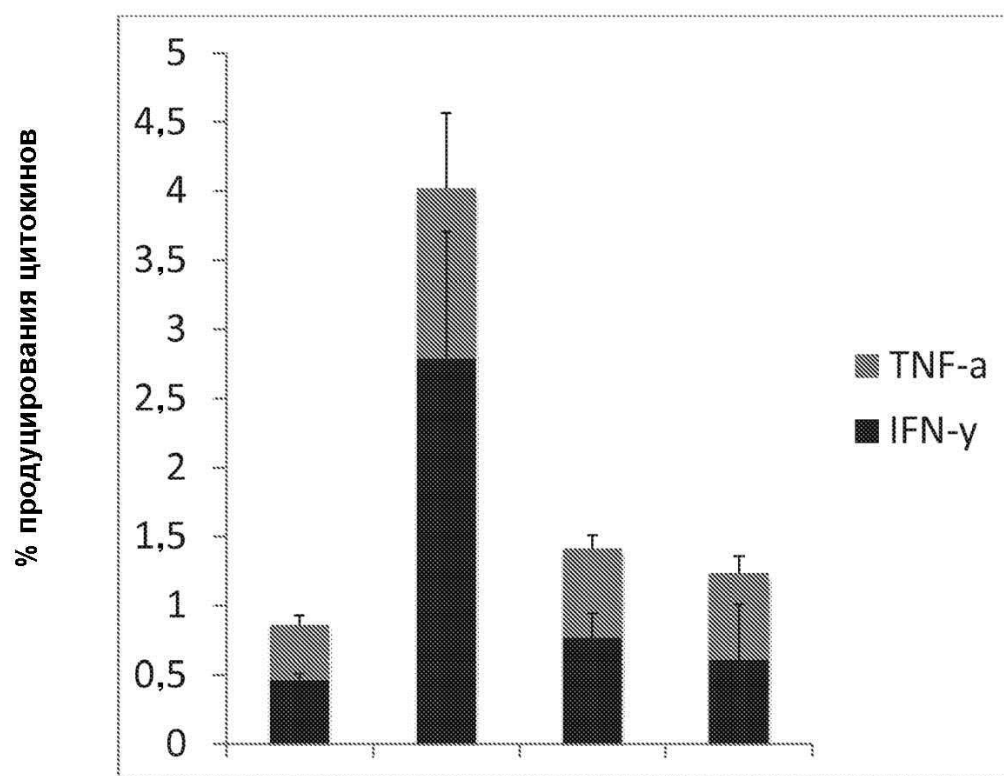
Фигура 37В



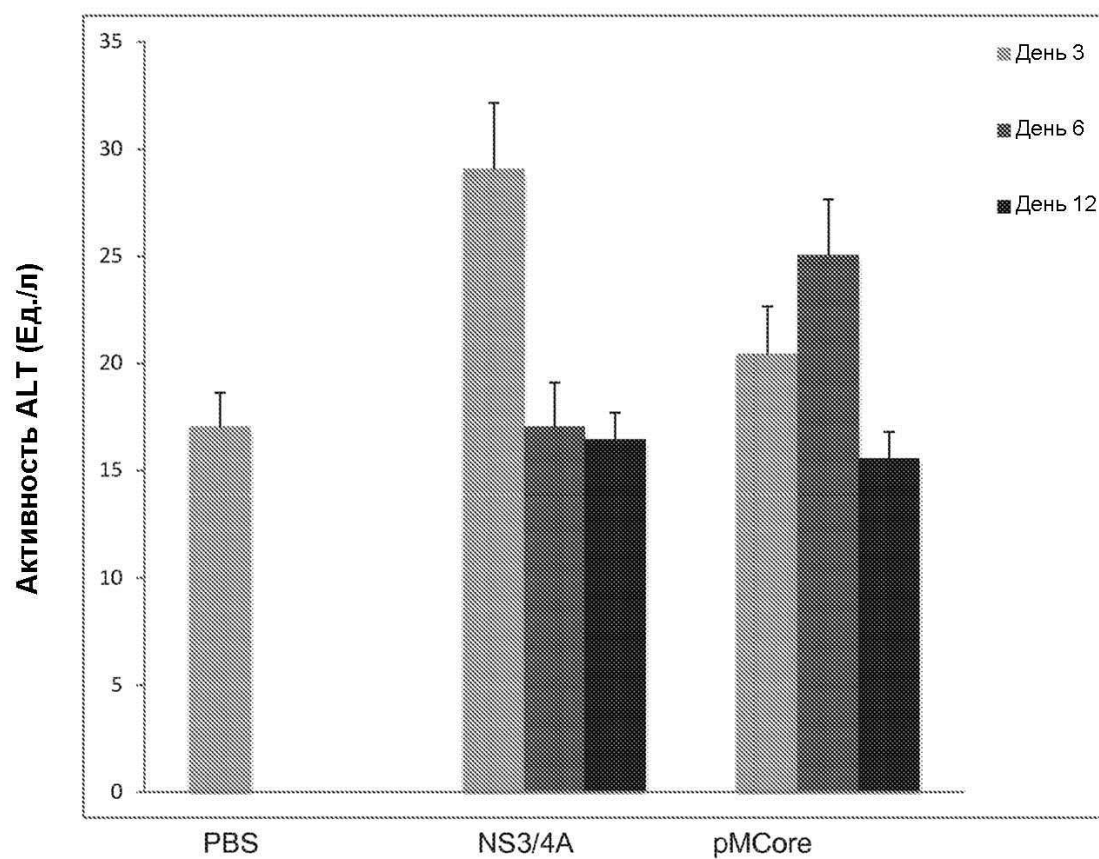
Фигура 38



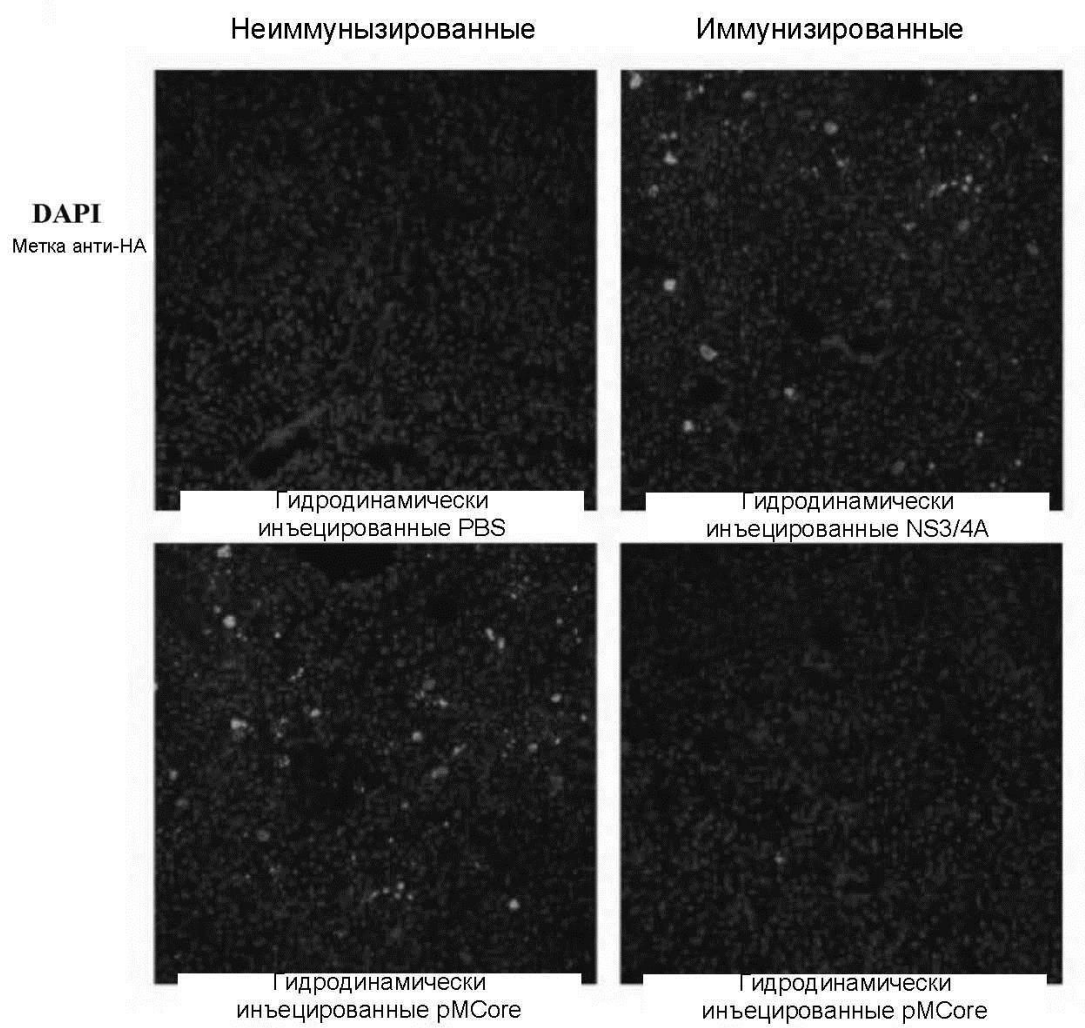
Фигура 39



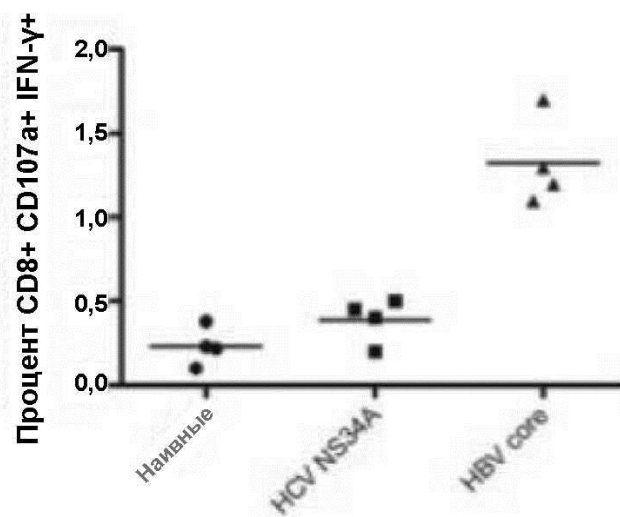
Фигура 40



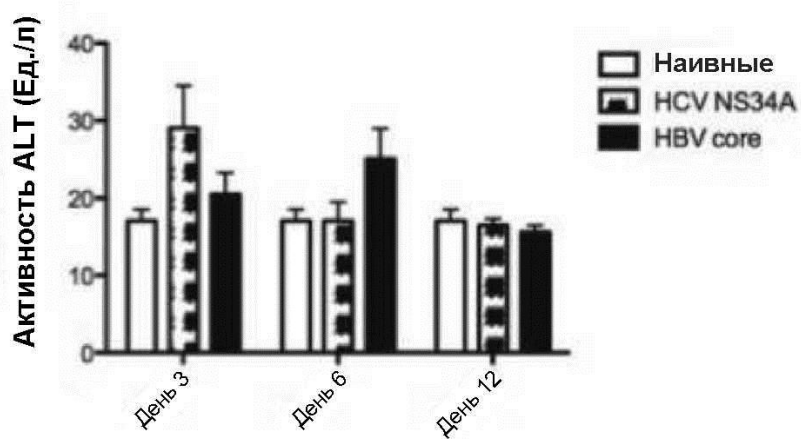
Фигура 41



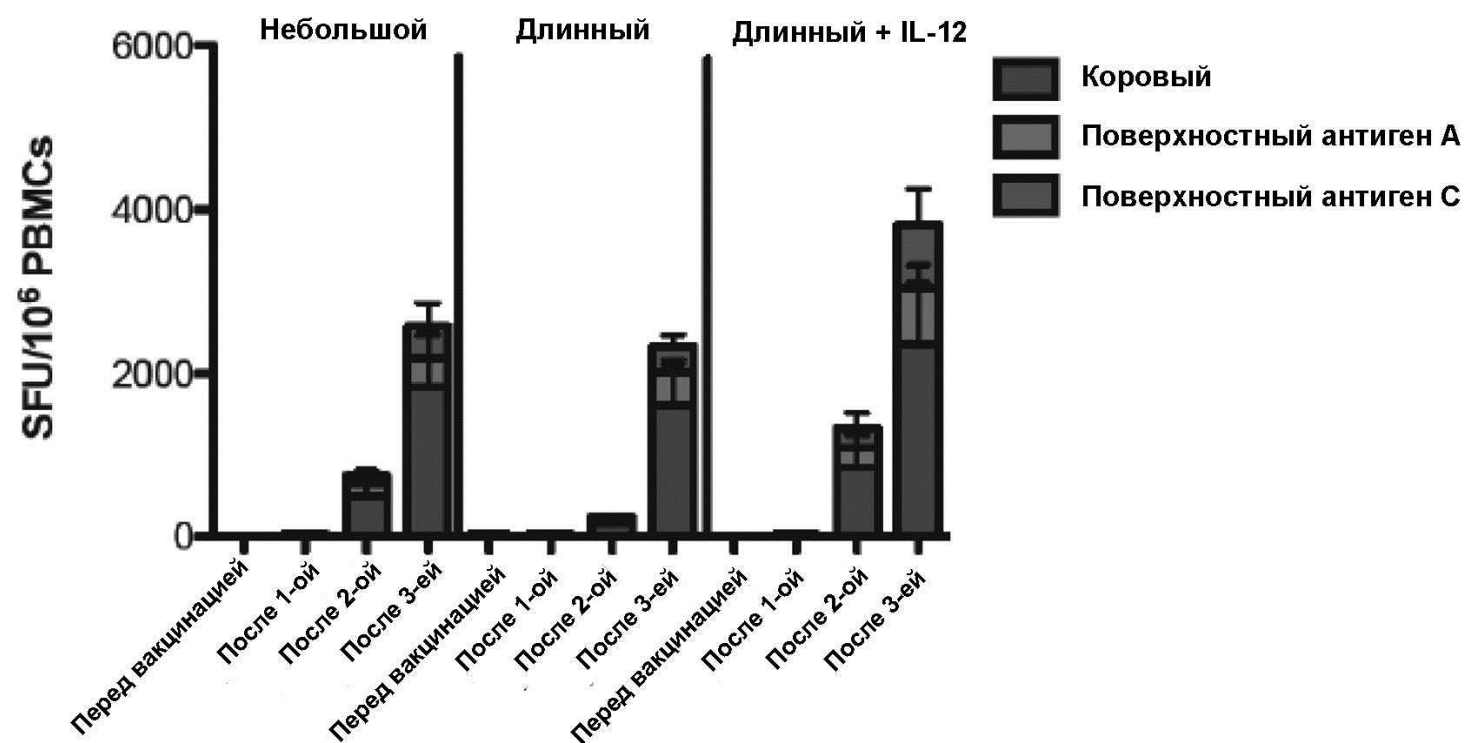
Фигура 42



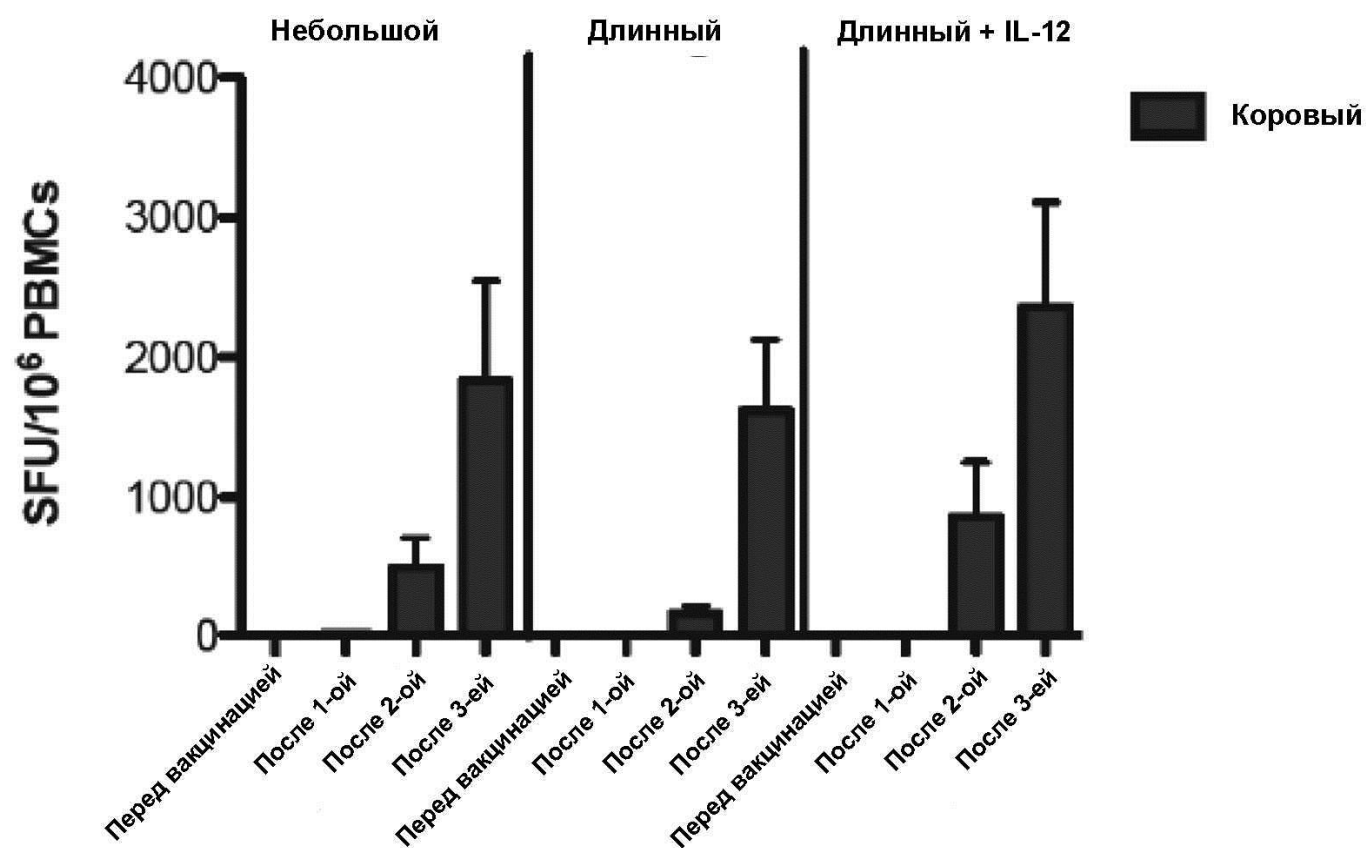
Фигура 43



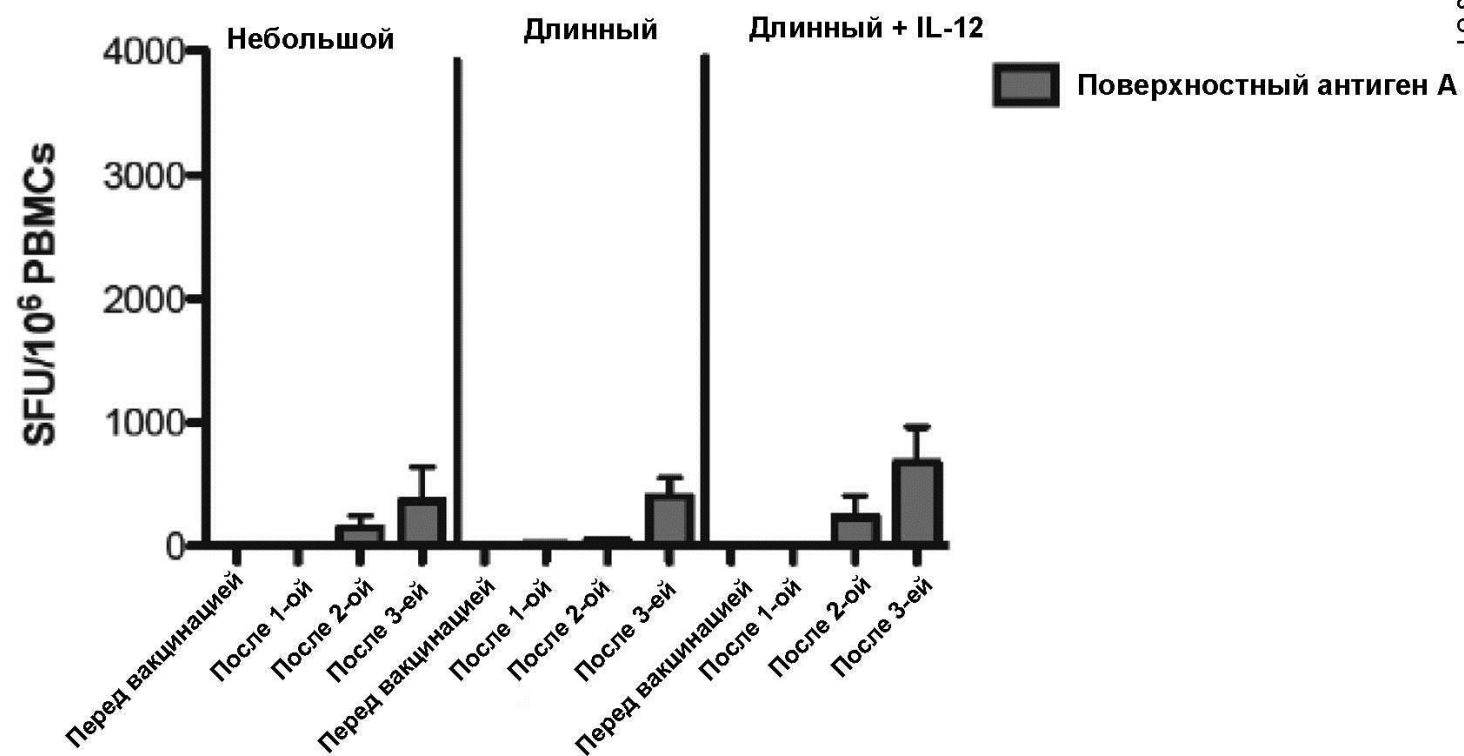
Фигура 44



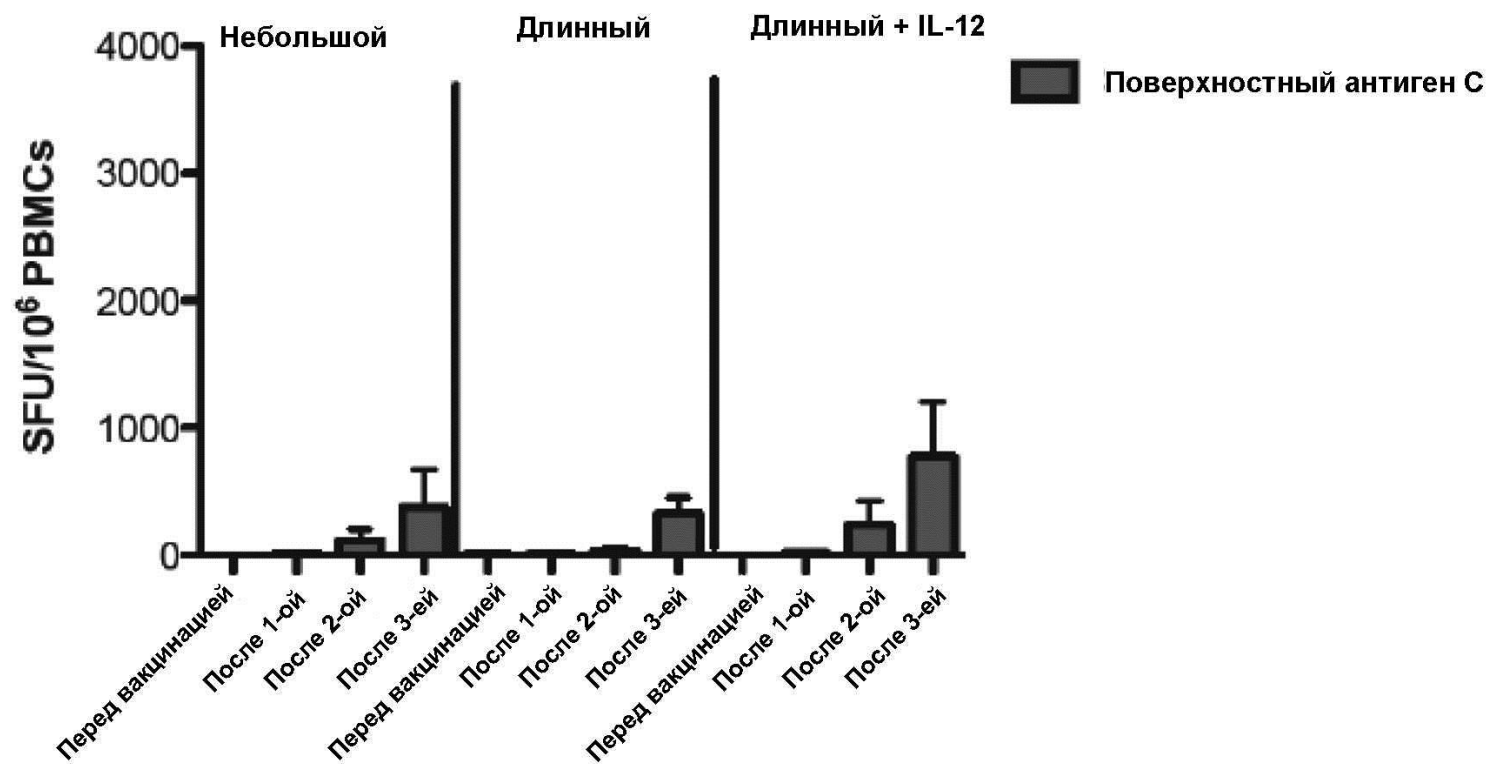
Фигура 45



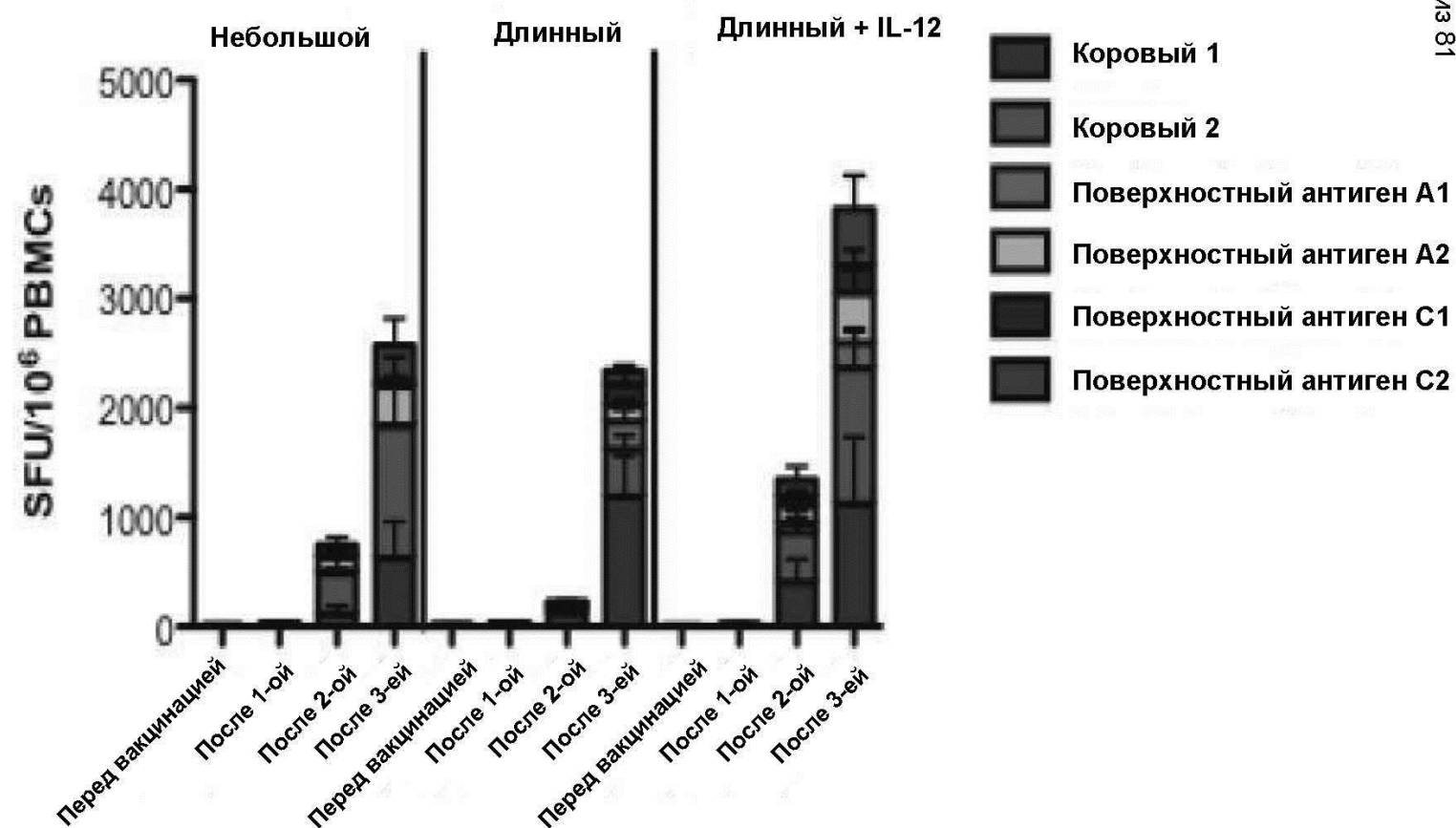
Фигура 46



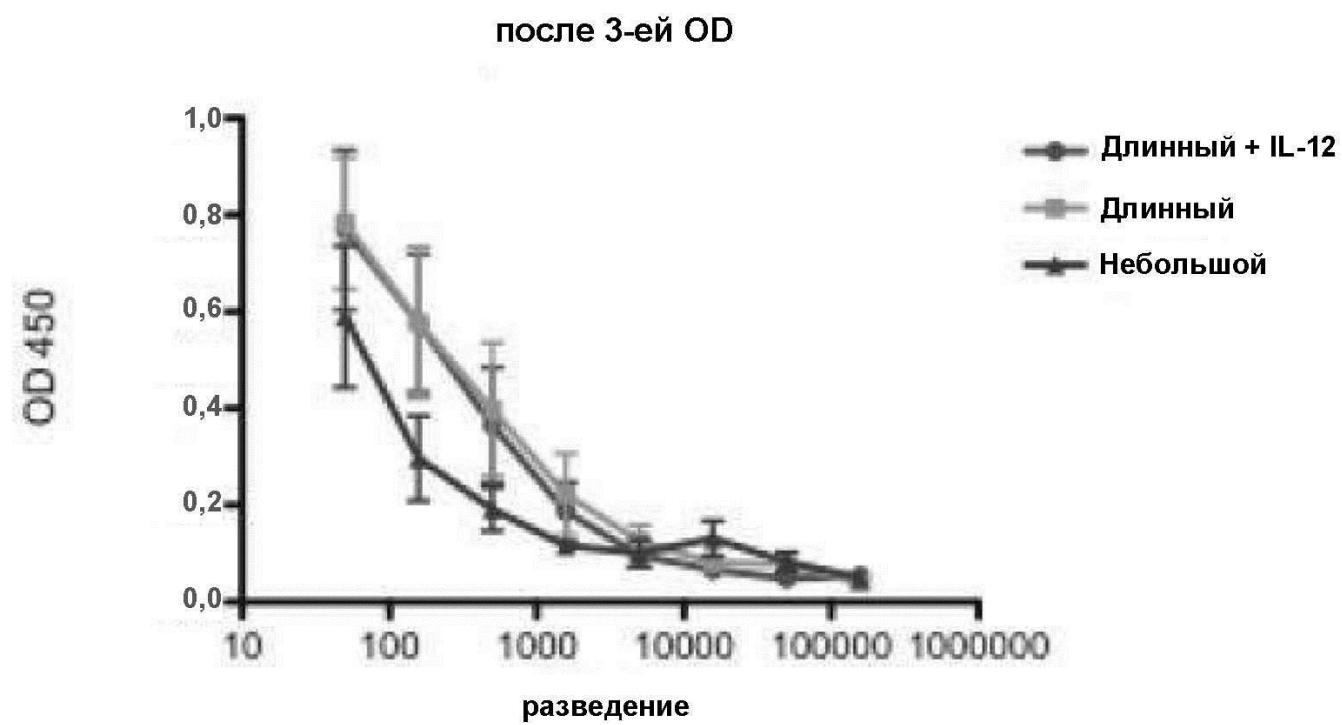
Фигура 47



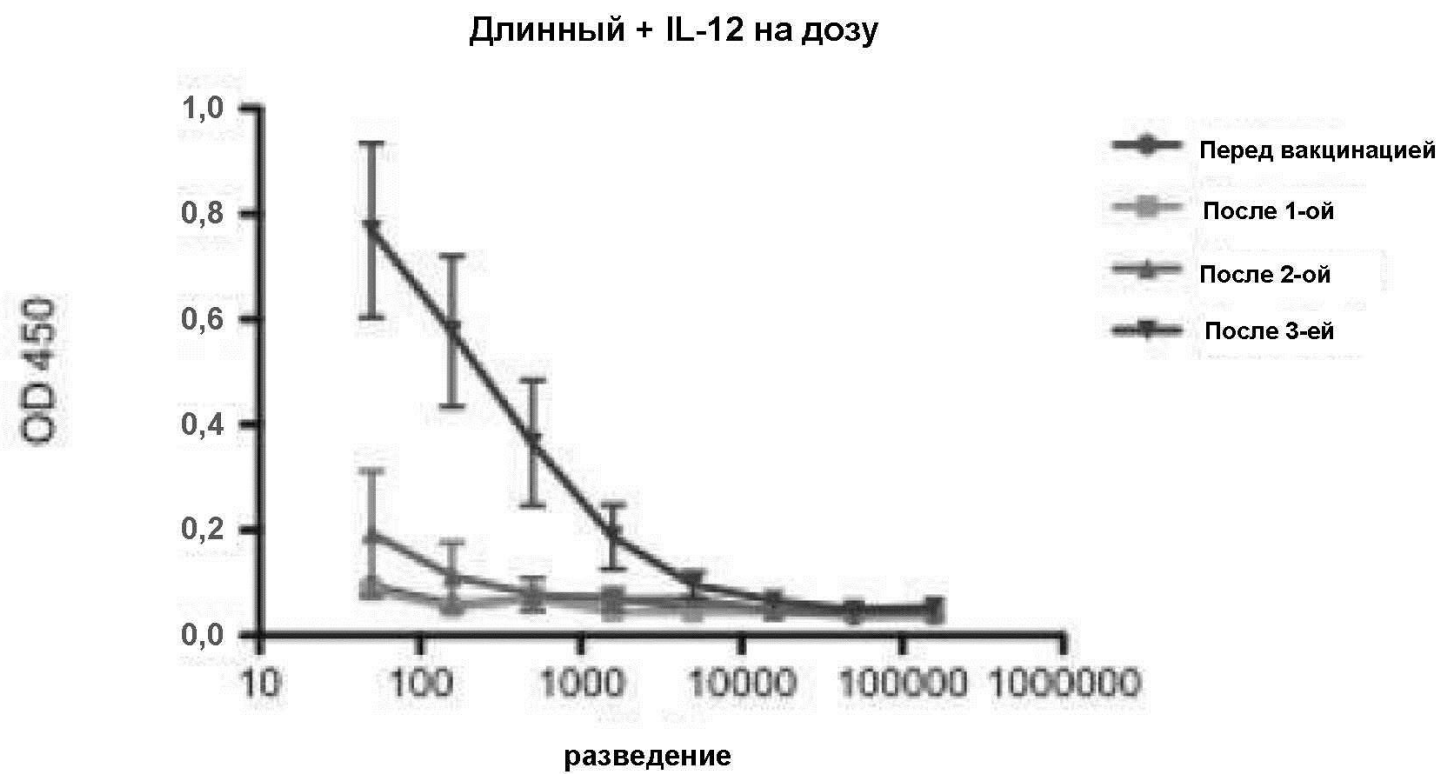
Фигура 48



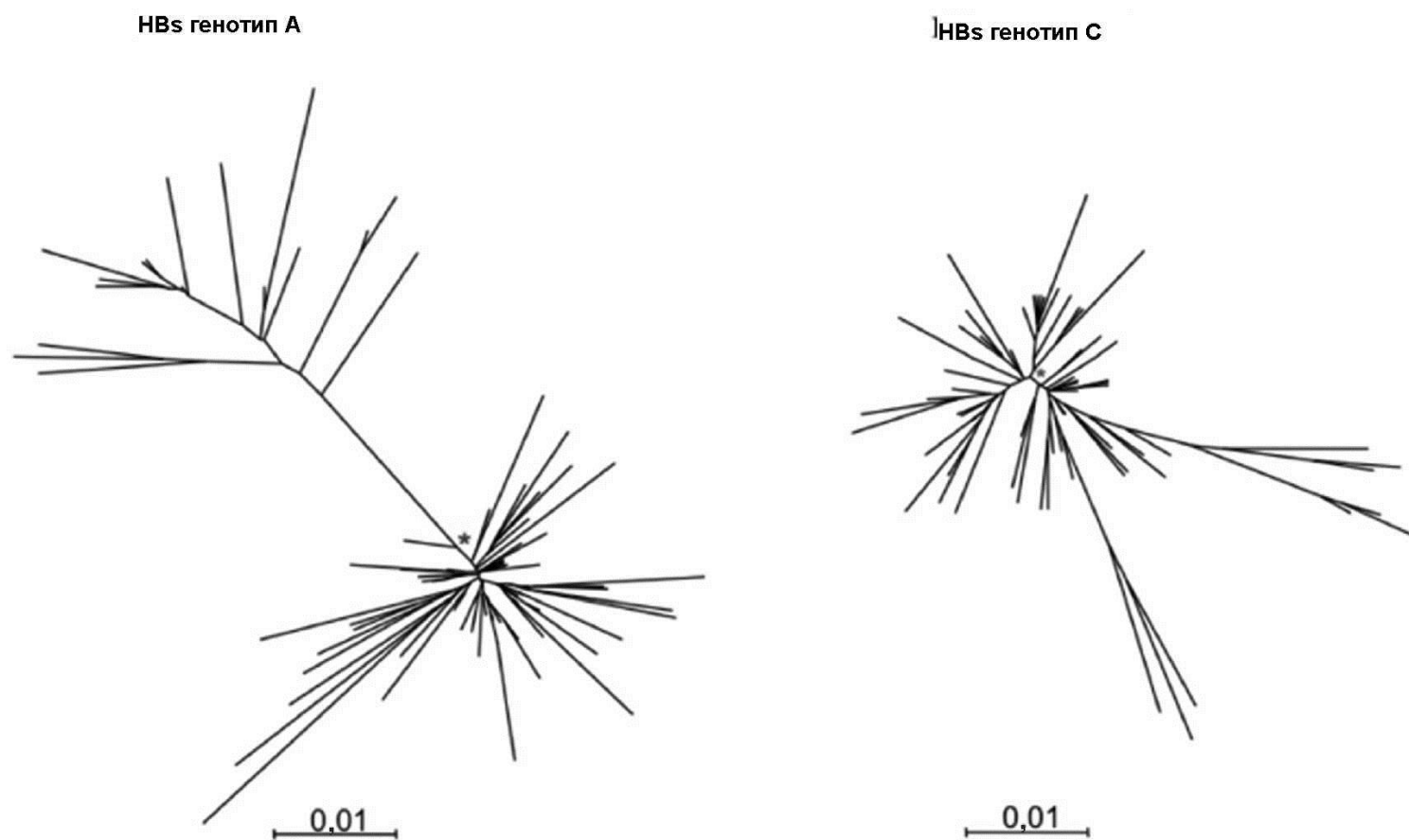
Фигура 49



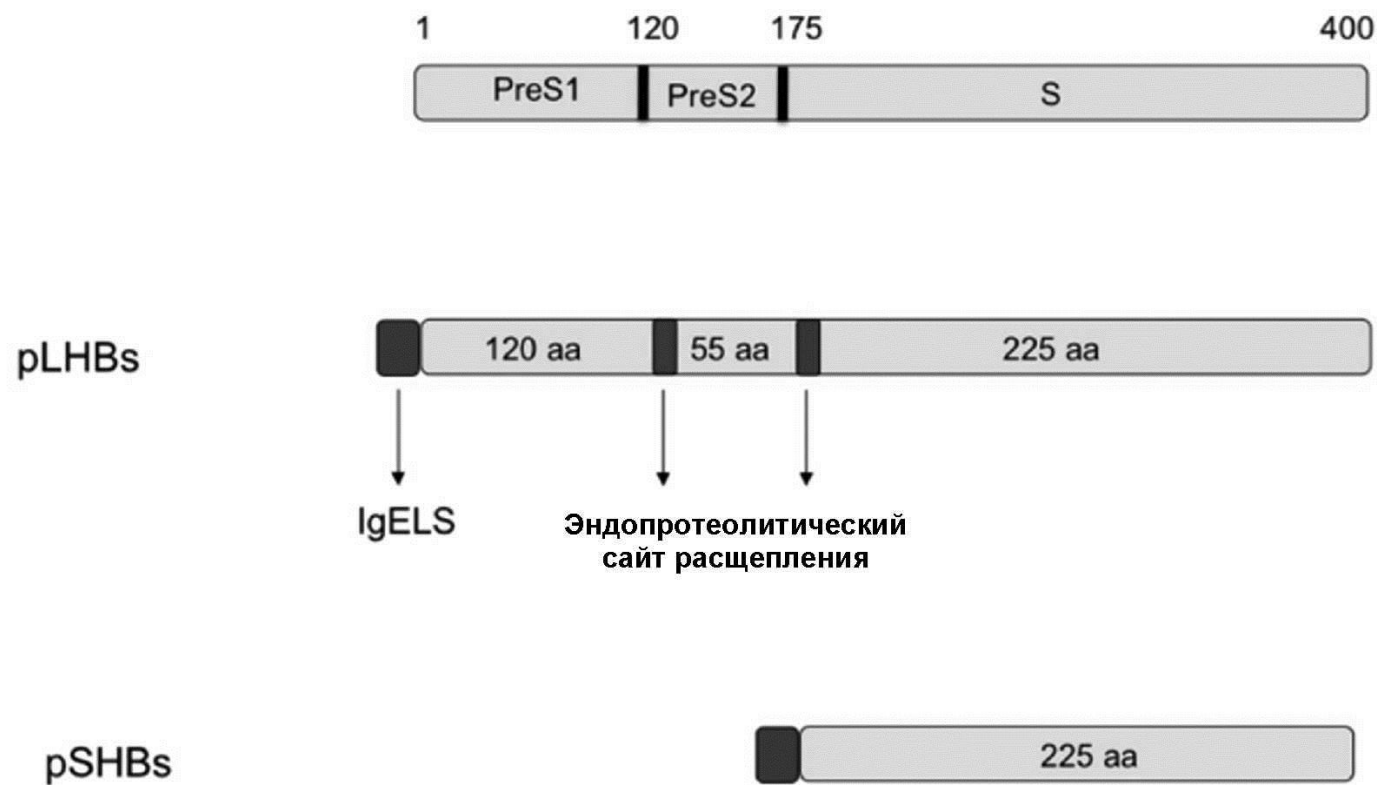
Фигура 50



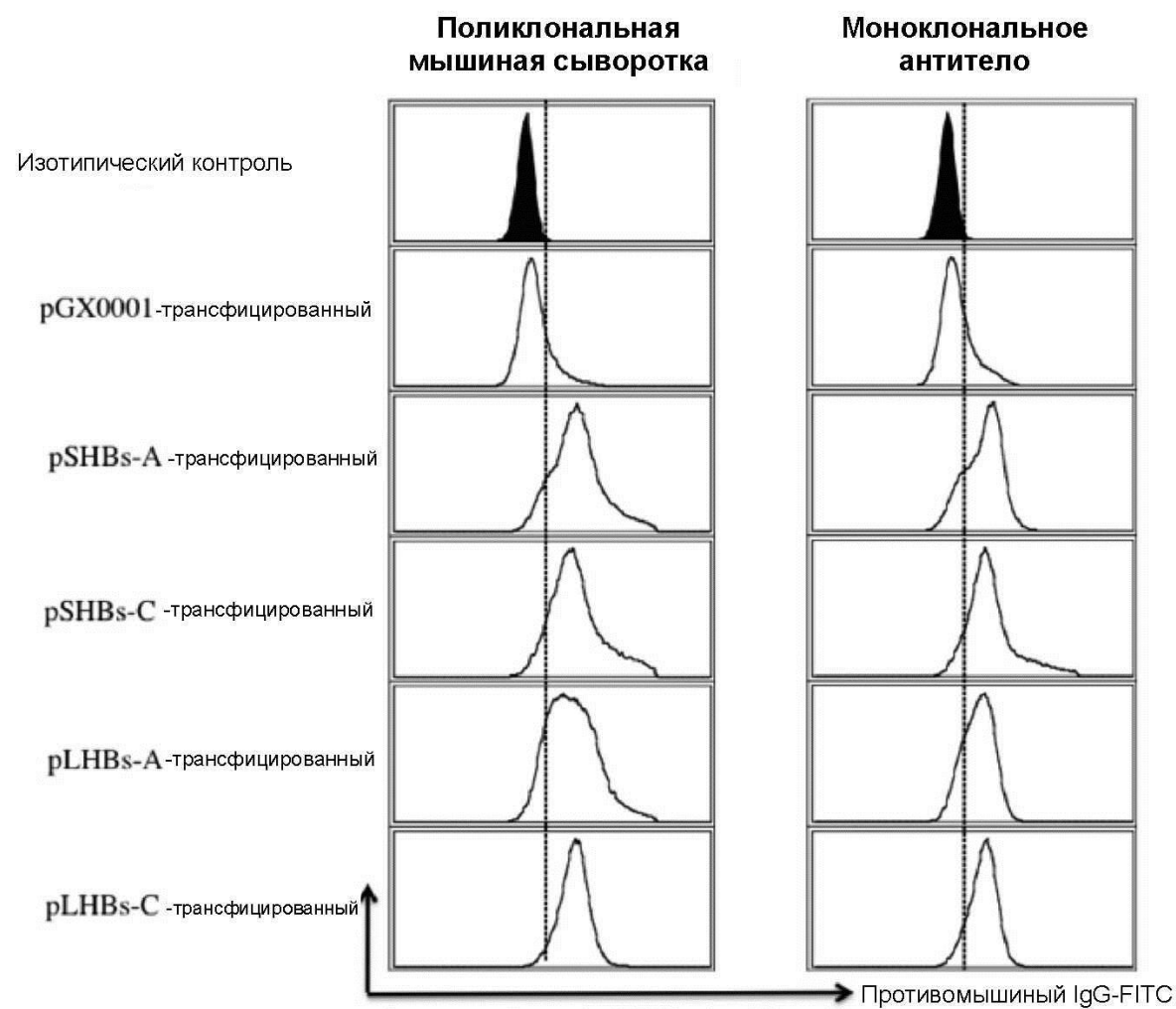
Фигура 51



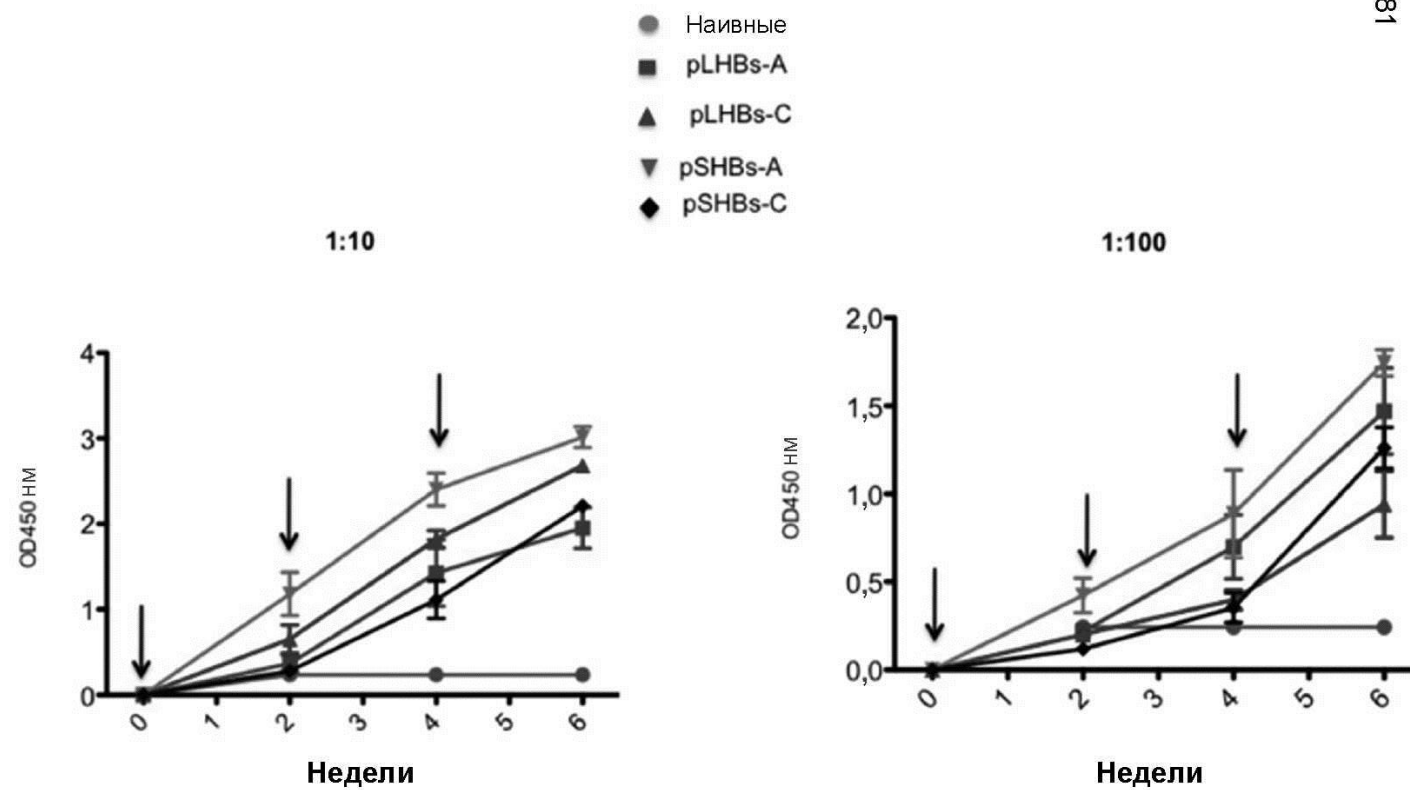
Фигура 52А



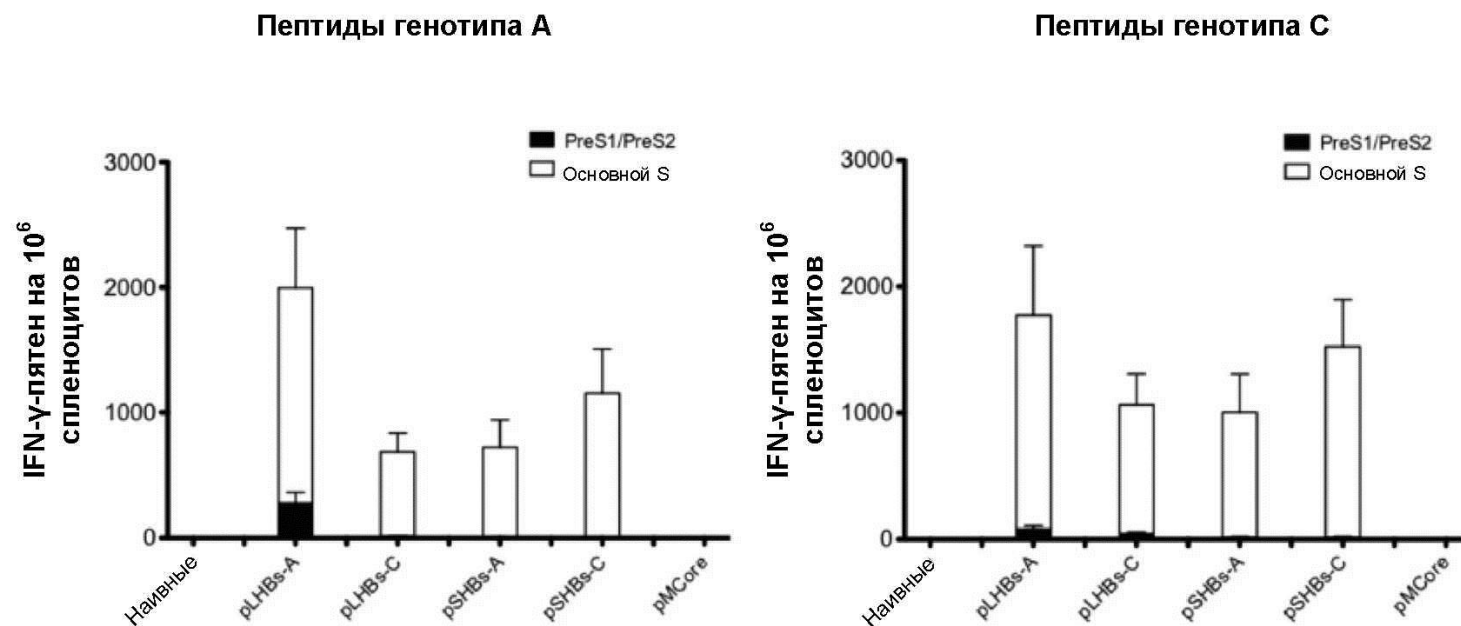
Фигура 52В



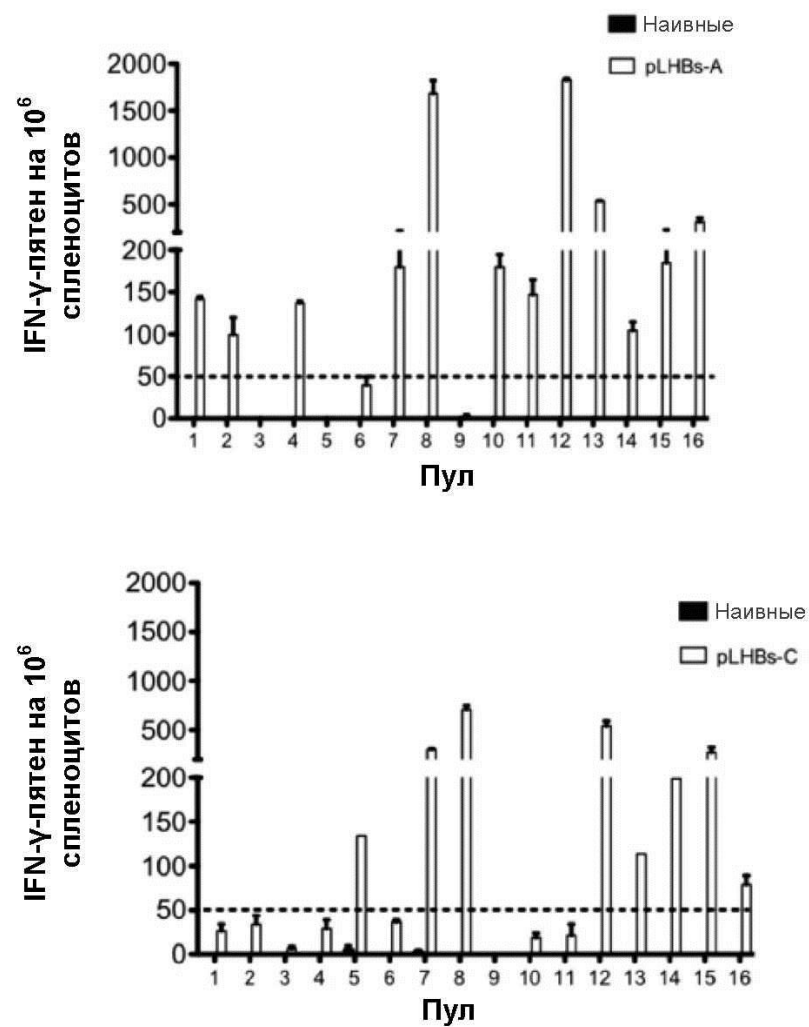
Фигура 52С



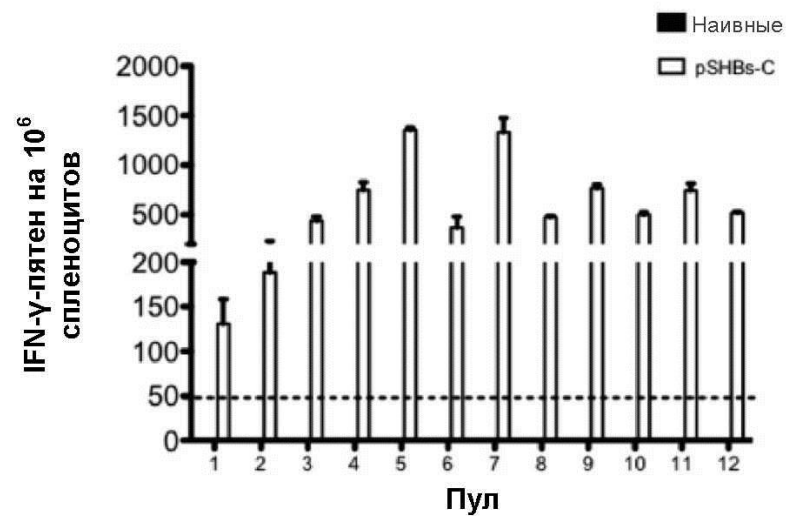
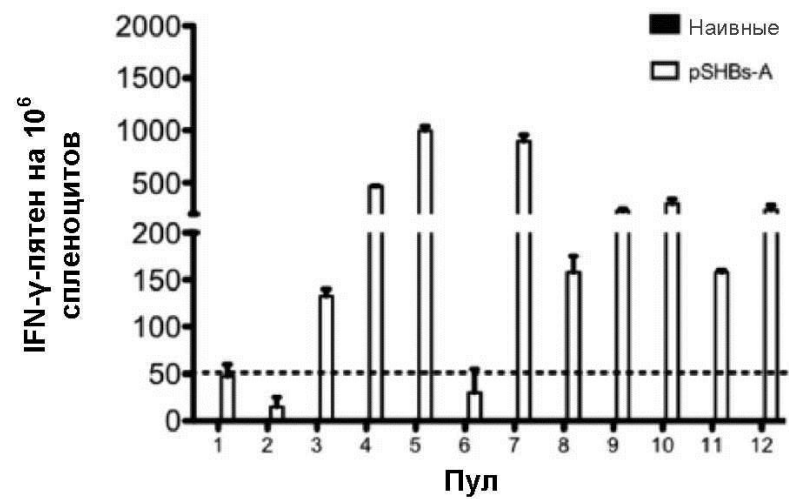
Фигура 53А



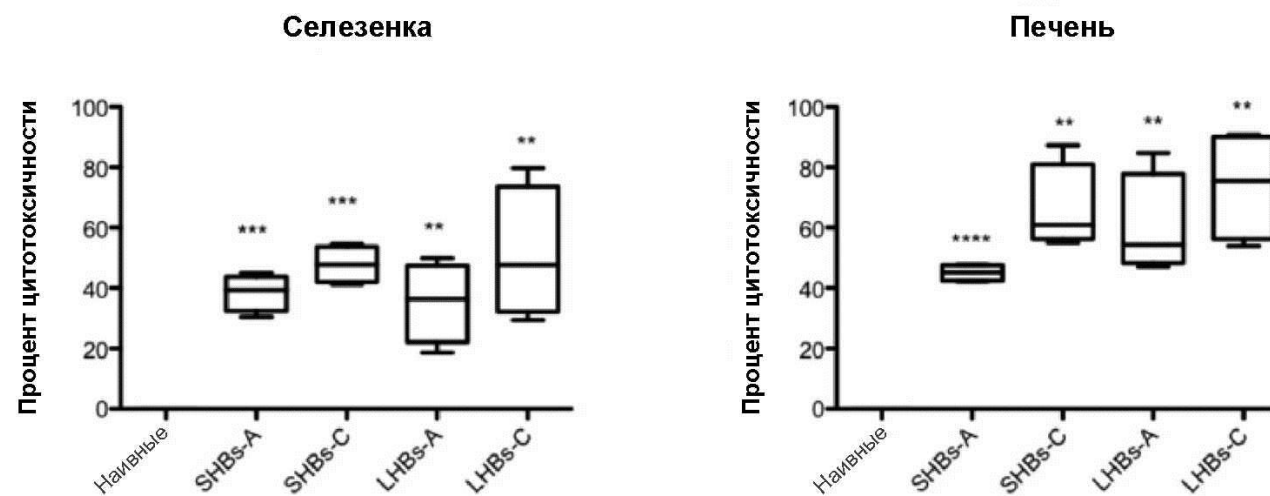
Фигура 53В



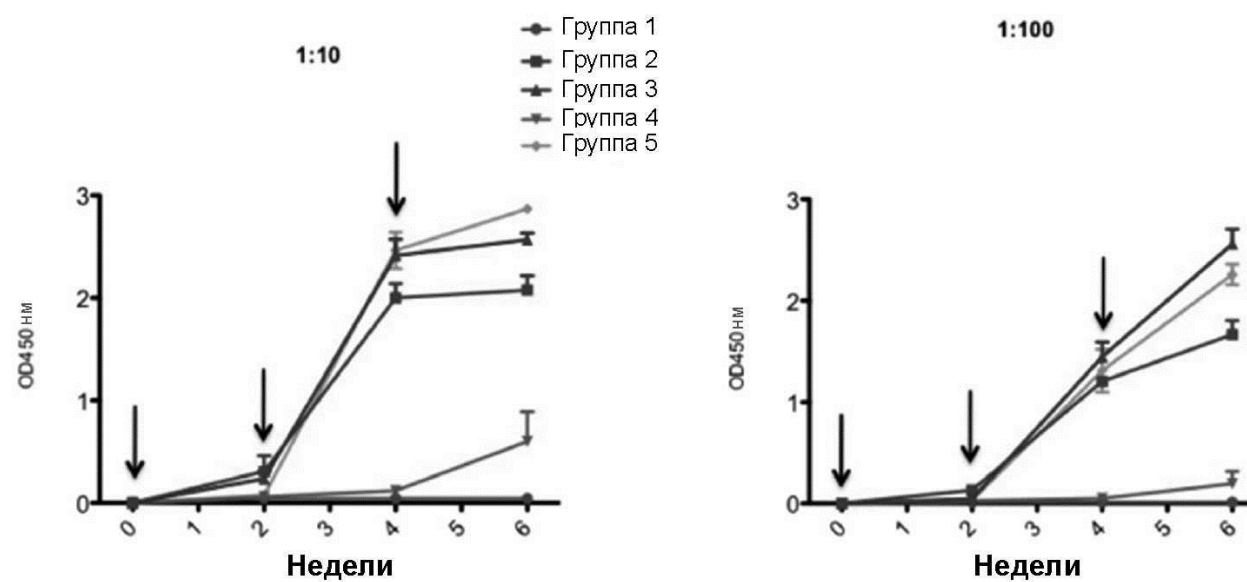
Фигура 53С



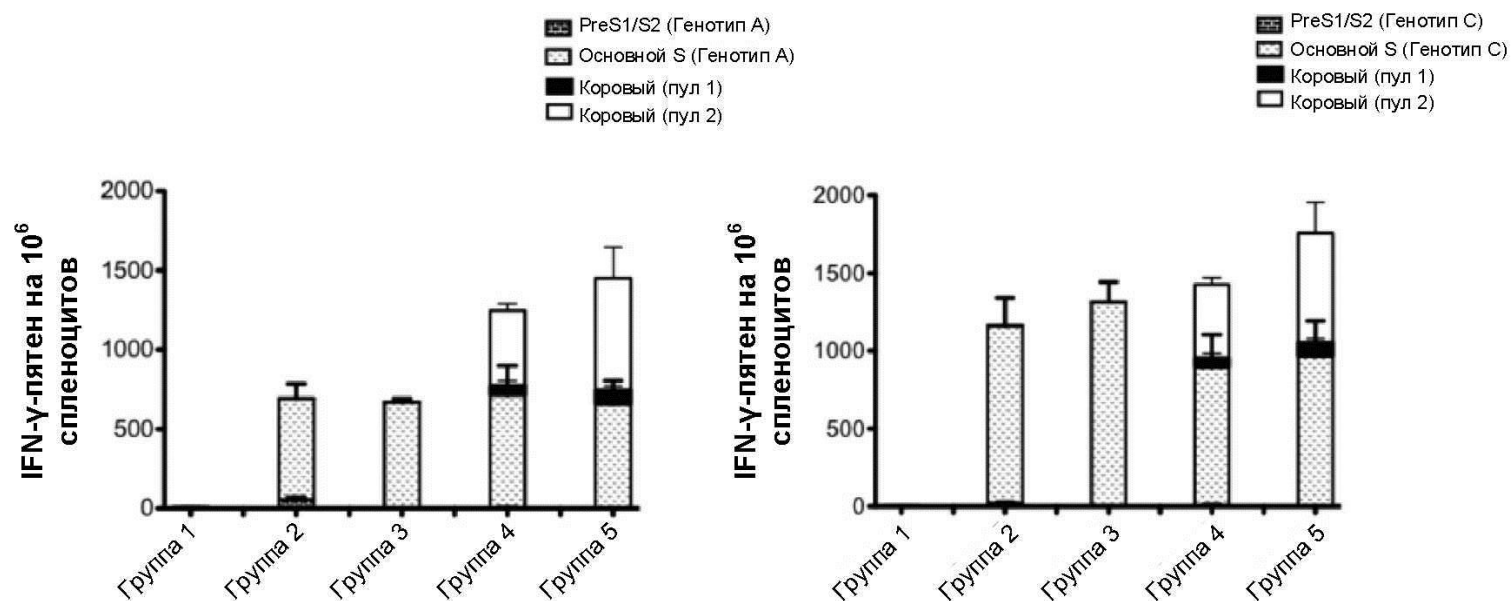
Фигура 53С (прод.)



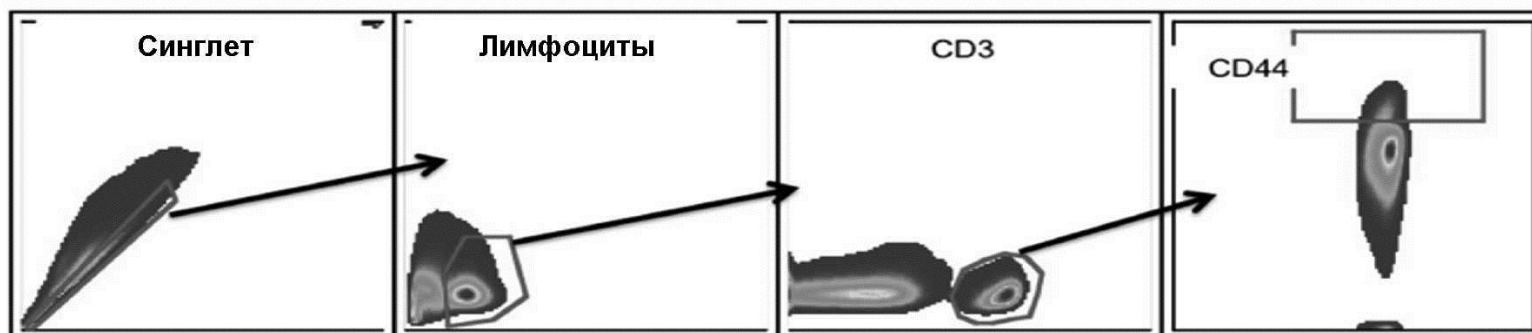
Фигура 54



Фигура 55А

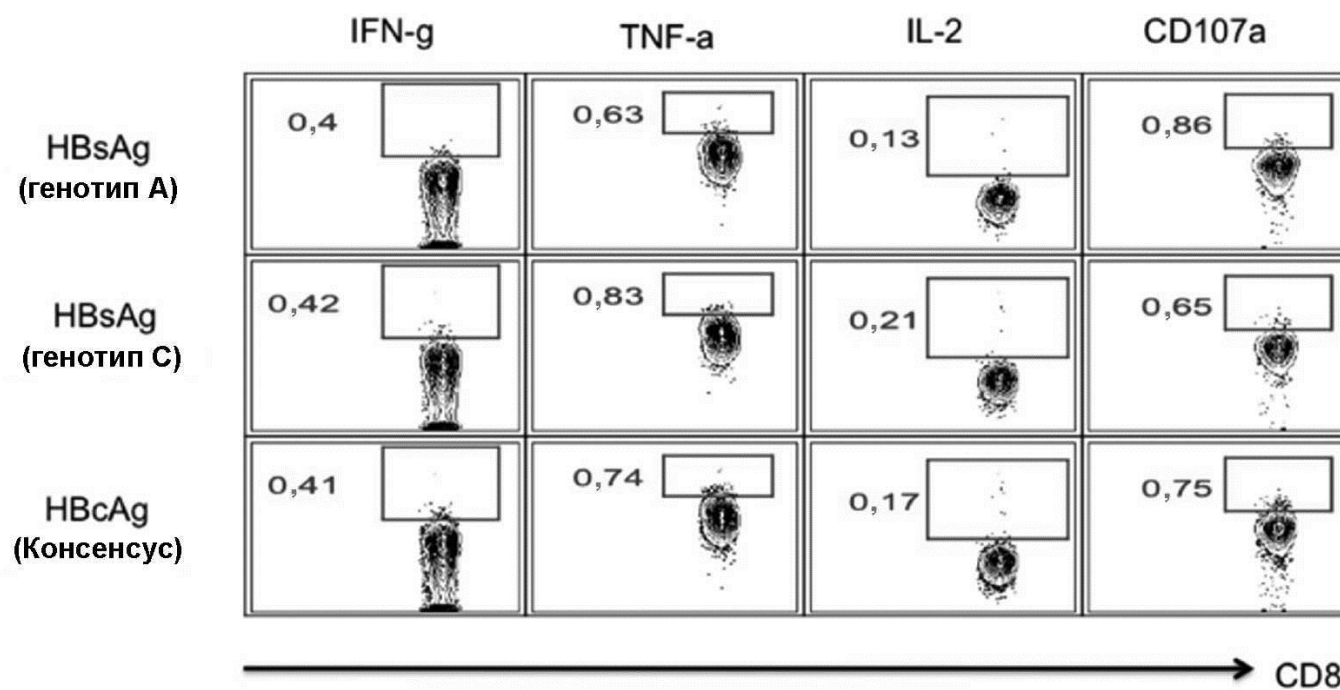


Фигура 55В

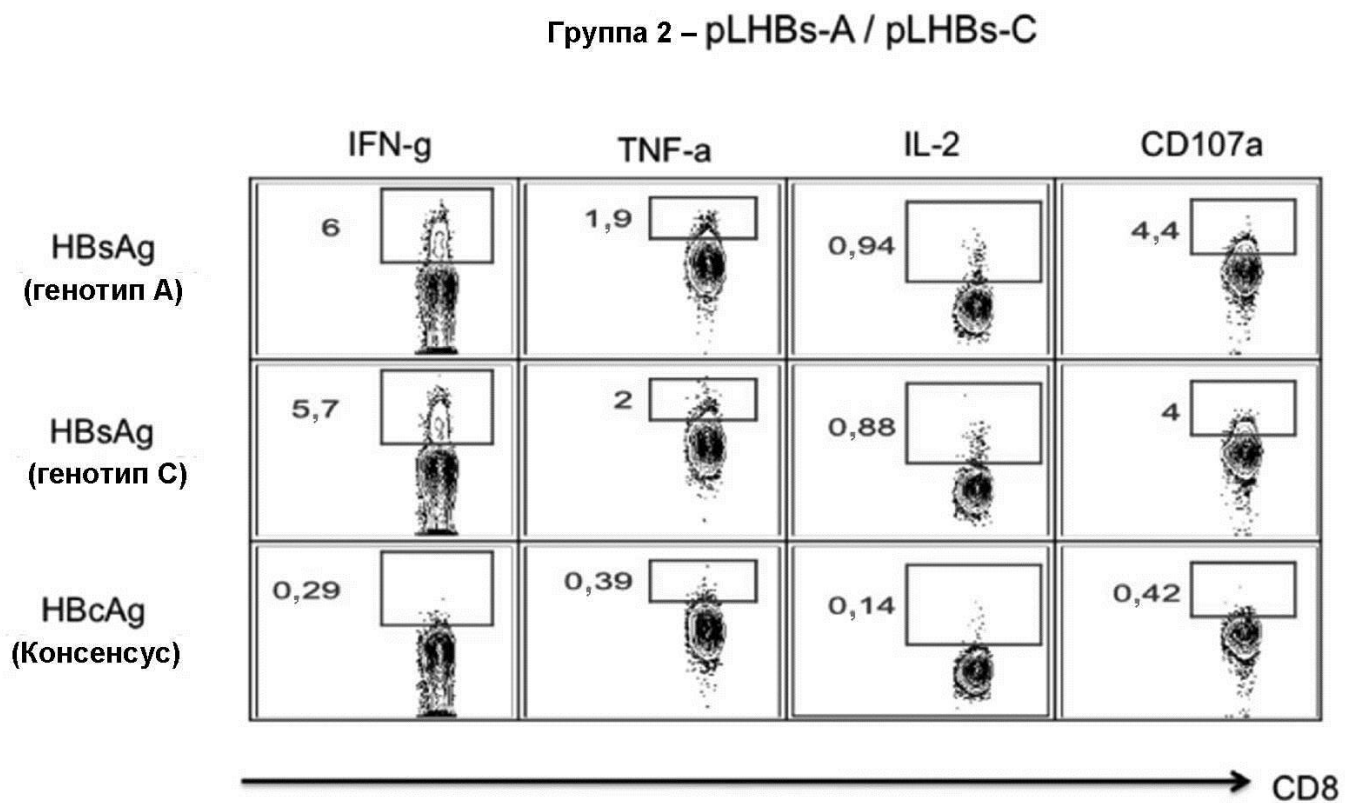


Фигура 56А

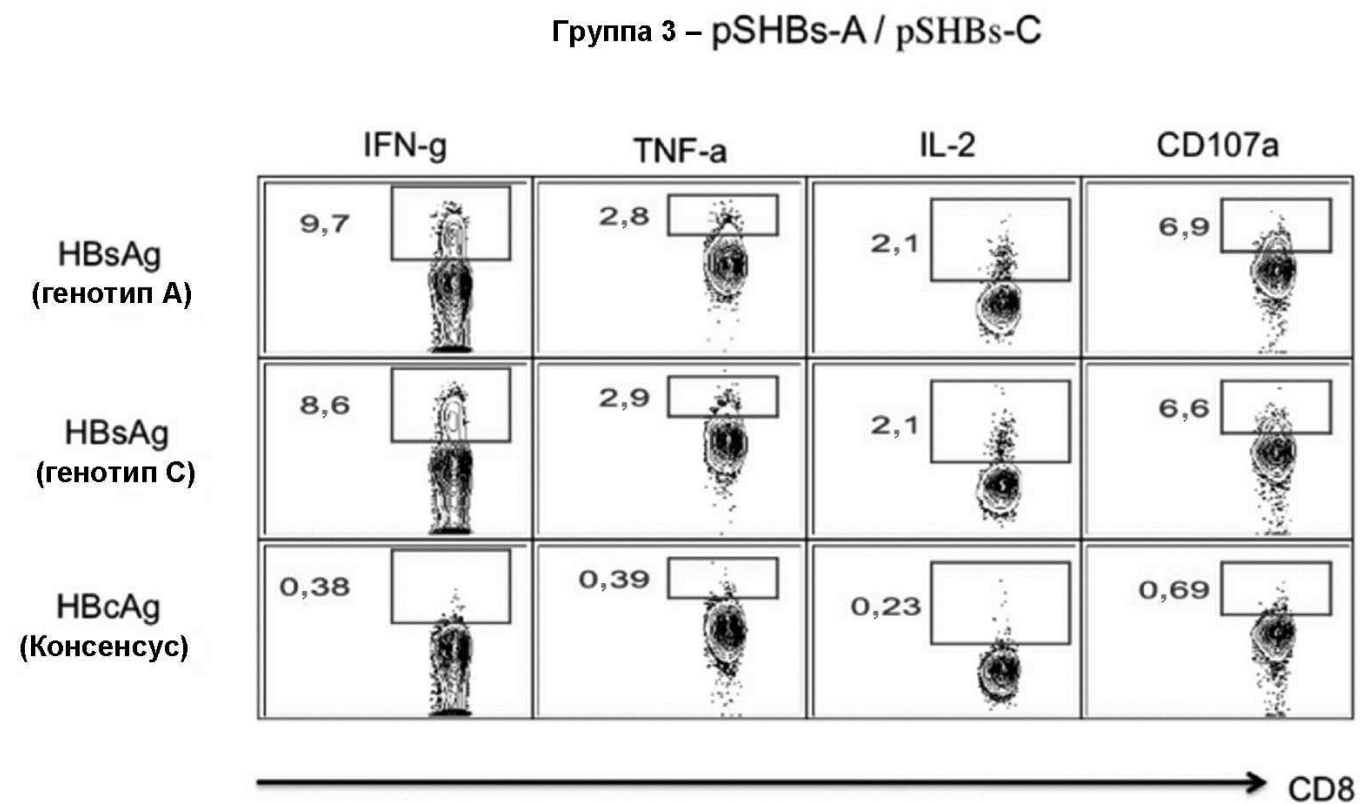
Группа 1 – только rGX0001



Фигура 56В

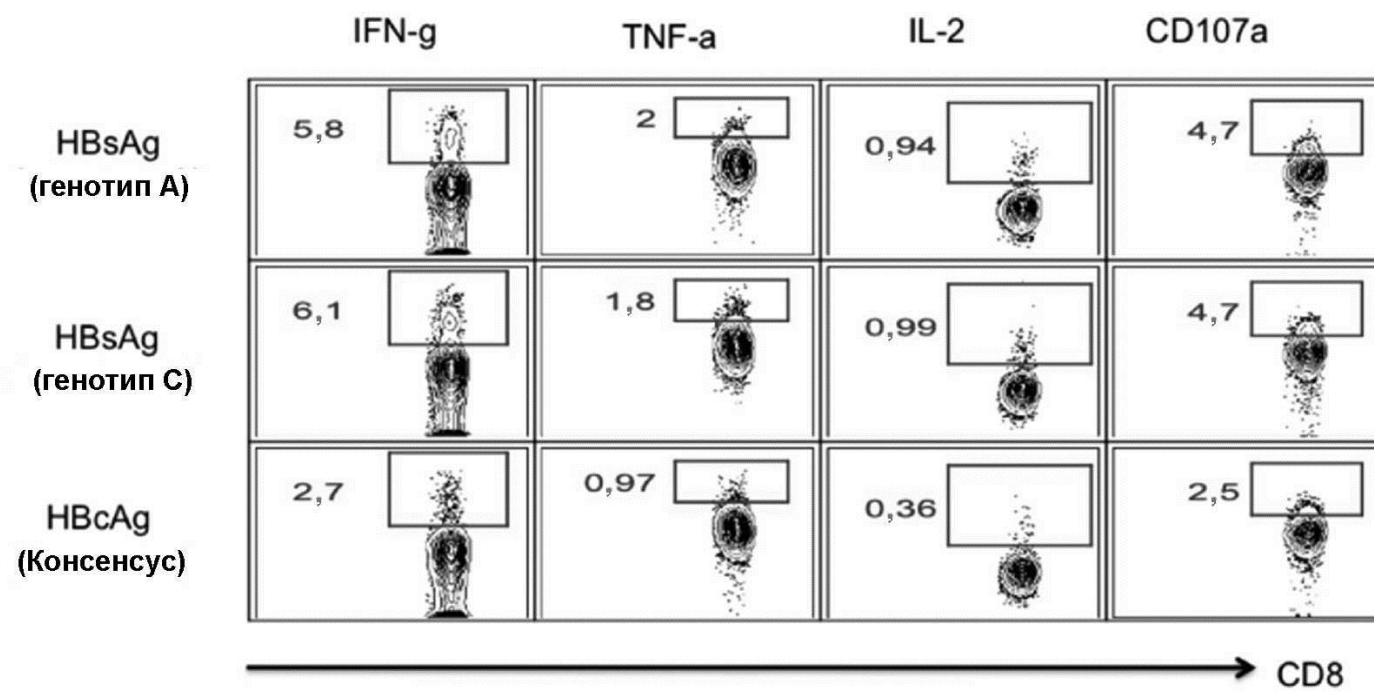


Фигура 56С



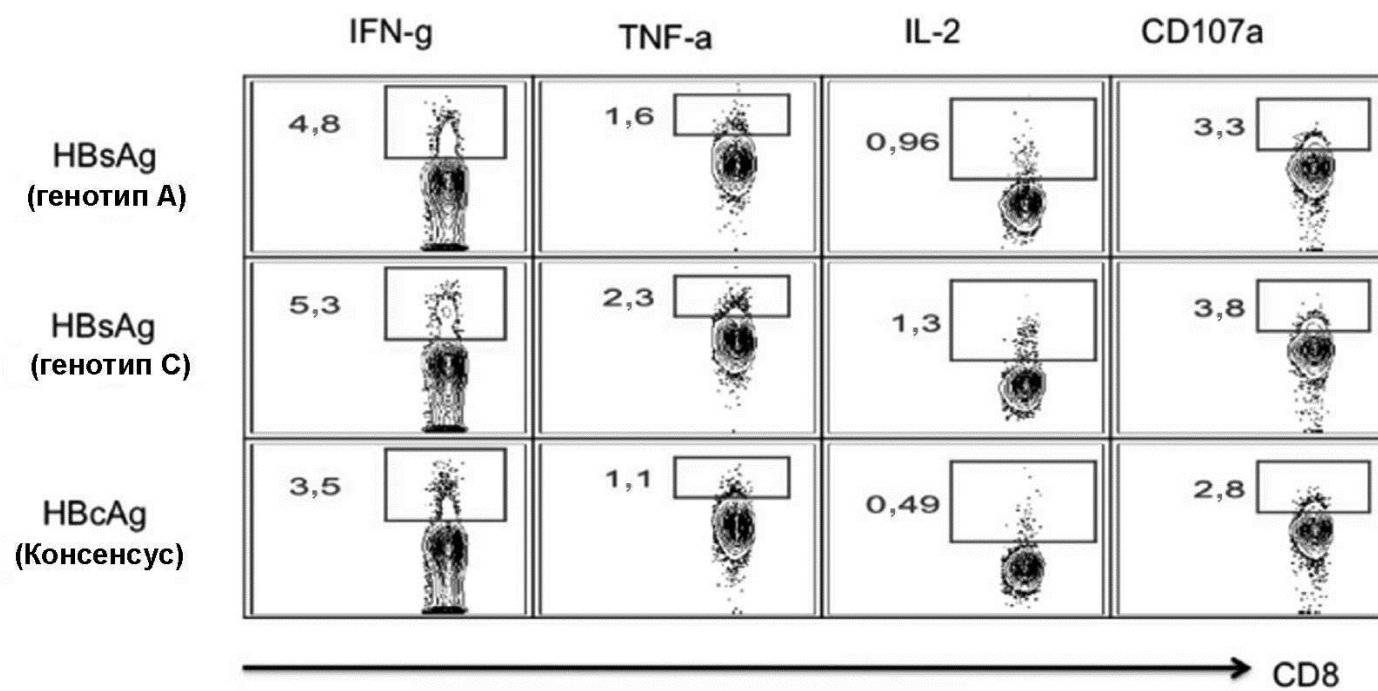
Фигура 56D

Группа 4 – pLHBs-A / pLHBs-C / pMCore

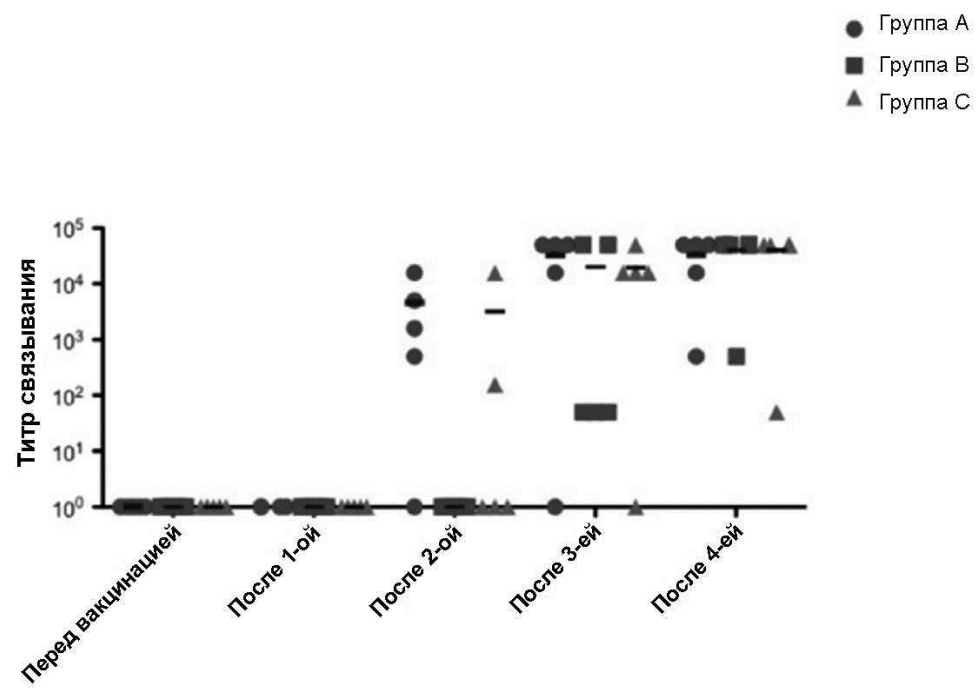


Фигура 56Е

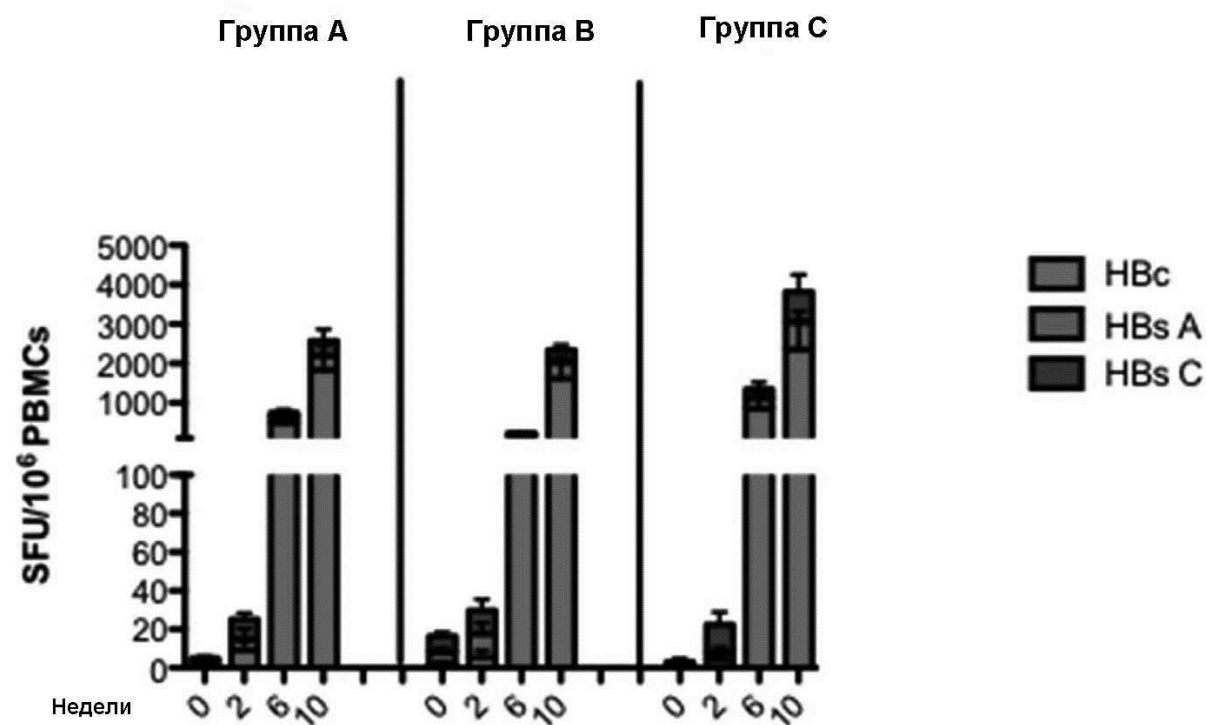
Группа 5 – pSHBs-A / pSHBs-C / pMCore



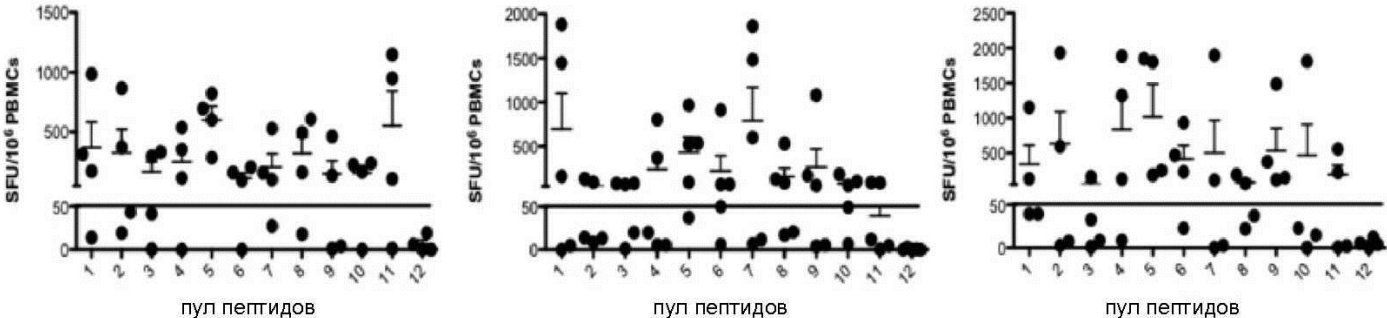
Фигура 56F



Фигура 57А

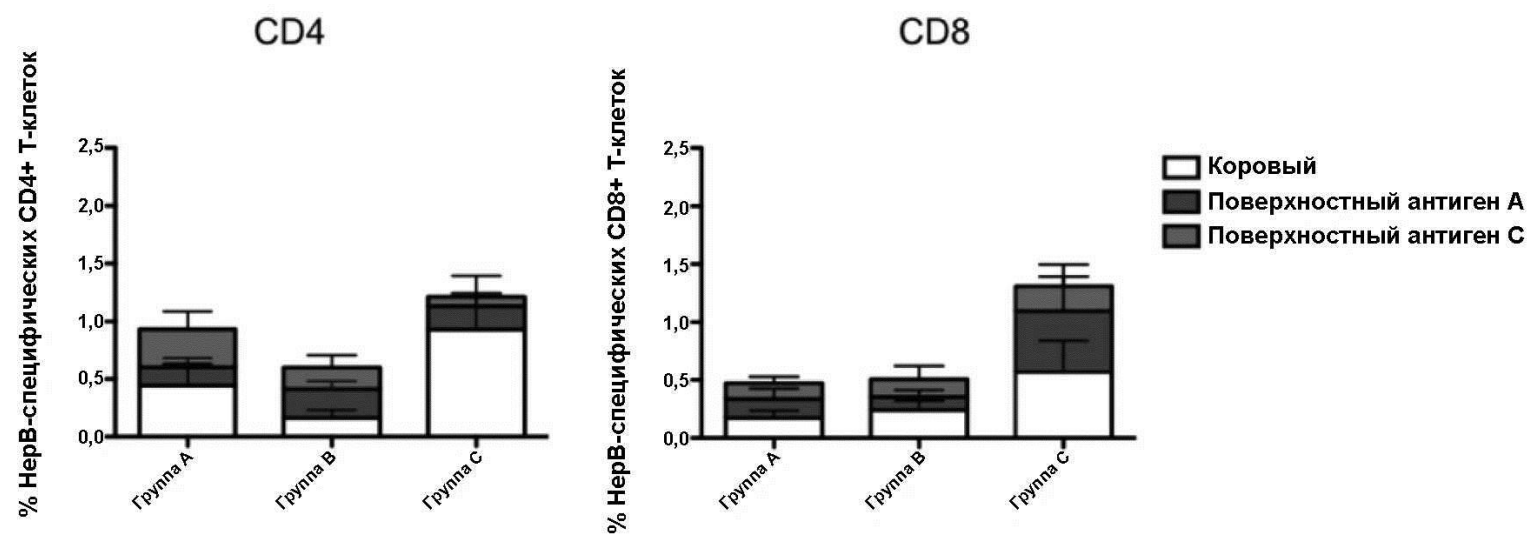


Фигура 57В

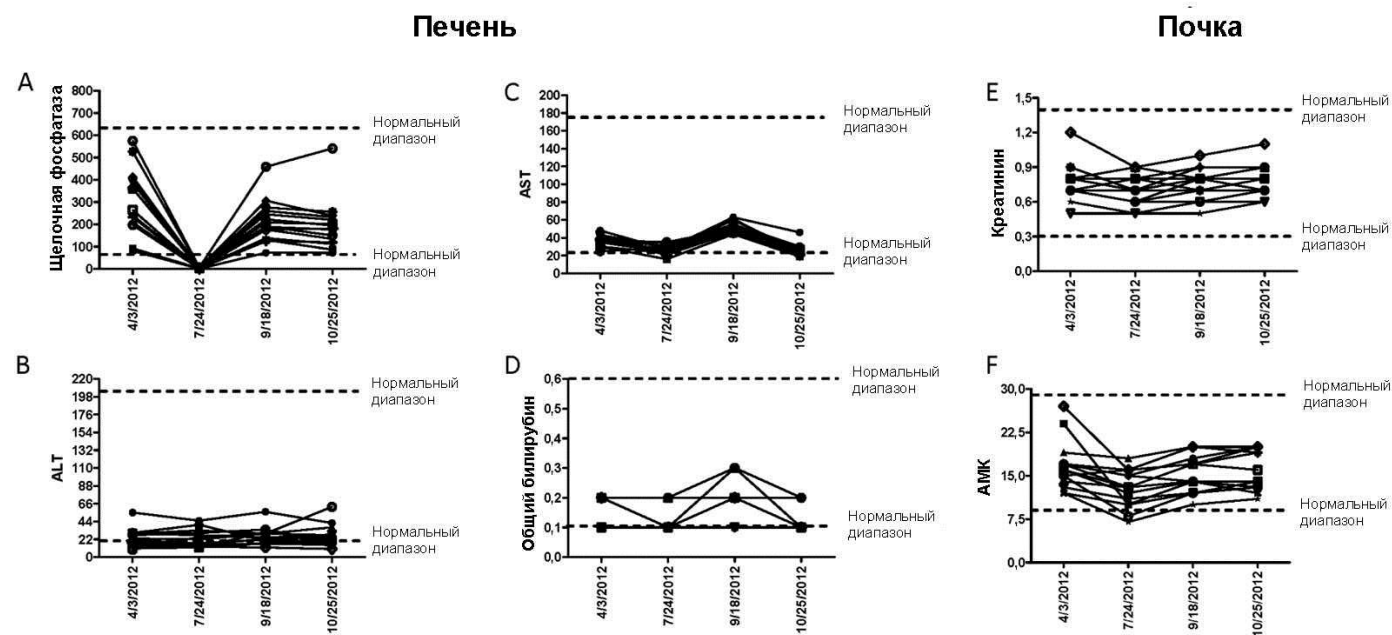


Группа	ID обезьяны	Положительные матричные пулы	Положительные пептидные эпитопы
Группа А	4634	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	30
	5022	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	16
	4943	1, 2, 5, 6, 7, 8, 11	12
	4942	1, 2, 4, 5, 10, 11	10
	4954	2, 5, 10	2
Группа В	4628	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	20
	5018	1, 2, 3, 7, 10	6
	4941	5, 6, 8, 11	4
	4938	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11	12
	4939	5, 6, 9	2
Группа С	4639	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11	16
	4945	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11	18
	4946	5, 6, 7, 8, 9	6
	5015	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11	20
	5019	4, 5, 9	3

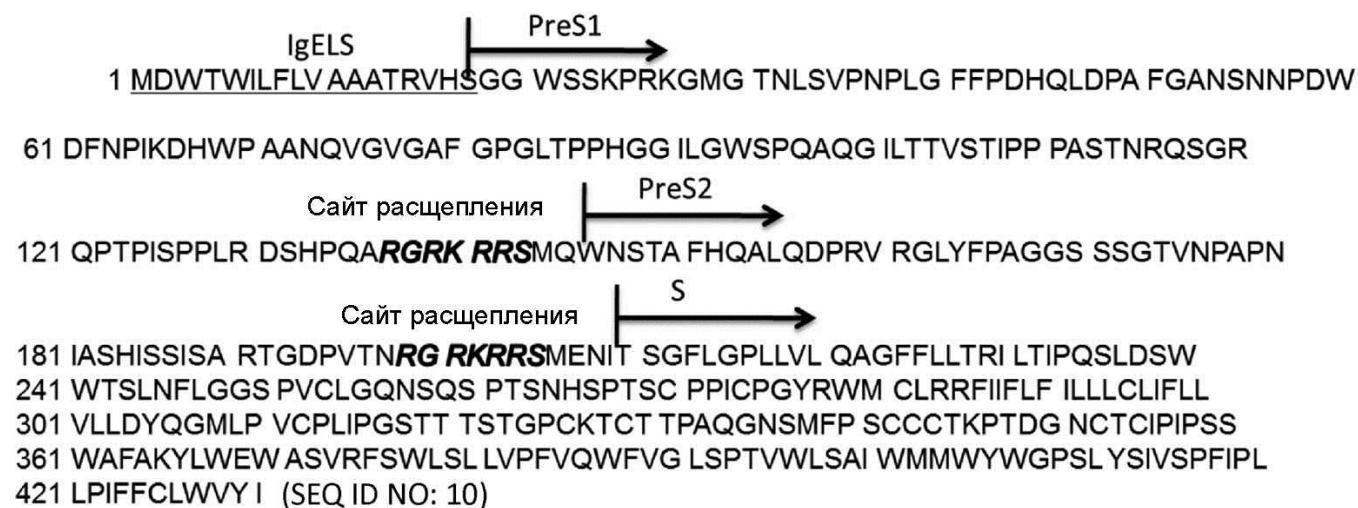
Фигура 57С



Фигура 57D



Фигура 58



Фигура 59А

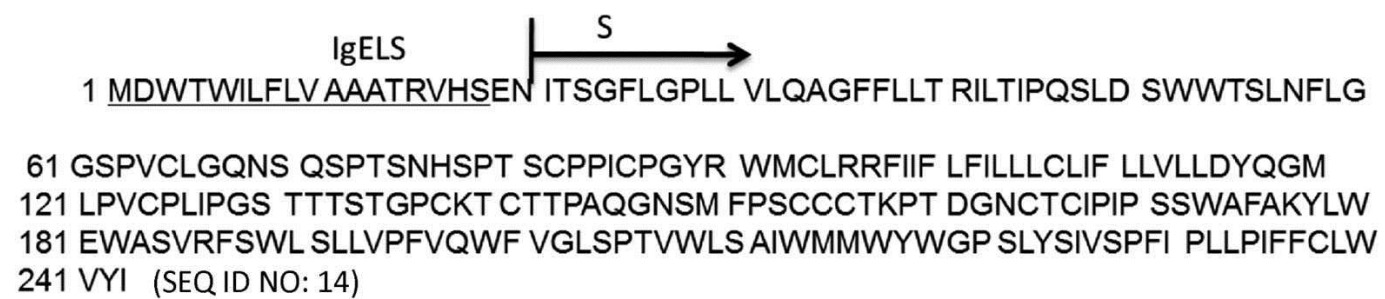
1 MDWTWILFLV AAATRVHSEN ITSGFLGPLL VLQAGFFLLT RILTIPQSLD SWWTSLNFLG

61 GSPVCLGQNS QSPTSNHSPT SCPPICPGYR WMCLRRFIIF LFILLCLIF LLVLLDYQGM

121 LPVCPLIPGS TTTSTGPCKT CTTPAQGNSM FPSCCCTKPT DGNCTCIPIP SSWAFACYLW

181 EWASVRFSWL SLLVPFVQWF VGLSPTVWLS AIWMMWYWGP SLYSIVSPFI PLLPIFFCLW

241 VYI (SEQ ID NO: 14)



The diagram shows a protein sequence with a signal peptide (IgELS) and a cleavage site (S). The signal peptide is located at the beginning of the sequence, followed by a vertical line indicating the cleavage site. An arrow labeled 'S' points to the right, indicating the direction of the signal. The sequence is divided into four segments: 1-241, 61-121, 121-181, and 181-241. The first segment (1-241) is underlined, indicating it is the signal peptide. The other segments are not underlined.

Фигура 59В

Фигура 59С

1 MDWTWILFLVAAATRVHSES T TSGFLGPLL VLQAGFFLLT RILTIPQSLD SWWTSNLNFG

61 GAPTCPGQNS QSPTSNHSPT SCPPICPGYR WMCLRRFIIF LFILLCLIF LLVLLDYQGM

121 LPVCPLLP GT STTSTGPCKT CTIPAQGTSM FPSCCCTKPS DGNCTCIPIP SSWAFARFLW

181 EWASVRFSWL SLLVPFVQWF VGLSPTVWLS VIWMMWYWGP SLYNILSPFL PLLPIFFCLW

241 VYI (SEQ ID NO: 16)



Фигура 59D