

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036030**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.16

(21) Номер заявки
201590597

(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) ИММУНОГЕННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ HBV У ЧЕЛОВЕКА

(31) 13/622,965

(32) 2012.09.19

(33) US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/US2013/060618

(87) WO 2014/047286 2014.03.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:

**Уэйнер Дэвид Б., Янь Цзянь, Обенг-
Аджей Ниямекне (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) Q6VBP1, UniProtKB/TrEMBL entry Q6VBP1 HBV, 11 July 2012 [online]. [Retrieved on 06 February 2014]. Retrieved from the Internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6VBP1.txt?version=54>>

US-A1-20120034256

US-A1-20040146529

CN-A-101502650

JF439753, GenBank Accession No. JF439753, Hepatitis B virus isolate MAU95A2 polymerase (P) gene, complete cds, 01 May 2011 [online]. [Retrieved on 07 February 2014]. Retrieved from the Internet <URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF439753>>

WO-A2-2010016071

US-A1-20100291144

(57) Изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим длинный консенсусный поверхностный антигенный белок HBV, и содержащим их вакцинам для индуцирования иммунного ответа против HBV у человека, а также основанным на их использовании способам индукции у человека иммунного ответа против HBV, способам защиты человека от HBV-инфекции и способам ее лечения у человека.

B1

036030

036030

B1

Область изобретения

Изобретение относится к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим поверхностные антигенные белки вируса гепатита В (HBV), их фрагменты и комбинации, к 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

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.

Вирус подразделяется на четыре основных серотипа (adw, ayw, ауг, ауw), исходя из антигенных эпиптопов, присутствующих на его белковых оболочках. Имеется по меньшей мере восемь генотипов (А-Н) вируса гепатита согласно изменениям геномных последовательностей. Альтернативные генотипы HBV имеют преобладающее географическое распределение. В табл. 1 показано географическое распределение генотипов HBV.

Таблица 1. Географическое распределение генотипов HBV

<i>HBV' генотип</i>	<i>HBV' генотип</i>	<i>HBsAg подтип</i>	<i>Частота</i>	<i>Основное географическое распределение</i>
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
D	C4	ayw3	низкая	Дальний Восток, Тихоокеанский регион
	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 10.1002/jmv.

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. Одноцепочечная область на не-гибридизованных 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 (HBsAgs) и липидными молекулами.] Геном 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 ко второму стартовому кодону, кодирует коровый белок, а последовательность, которая содержит дополнительный апстрим стартовый кодон, кодирует последовательность, названную пре-C; 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 (фиг. 1). Эти белки включают 3 поверхностных белка или антигена (HBsAg): preS1, preS2 и основной S.

Характеристики HBsAgs проиллюстрированы на фиг. 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 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.

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.

Chisari 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 PCT WO 2004026899 раскрывает использование иммуногена, содержащего полипептидную последовательность с аминокислотной последовательностью HBV. Опубликованная заявка PCT WO 2008093976 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 PCT WO 2009130588 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 PCT WO 2010127115 раскрывает доставку последовательностей HBV с использованием рекомбинантных векторов.

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. Имеющиеся в настоящее время вакцины на основе HBsAg, полученные из дрожжей, трансфицированных 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.

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).

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.

ДНК-вакцины делают возможным эндогенный антигенный синтез, который индуцирует CD8 + гистосовместимый комплекс, цитотоксические Т-лимфоциты, рестриктивные 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.

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]. 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 a120 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].

Антитела 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

Изобретение относится к вакцине, содержащей: (а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 10 и белка, который на 98% идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12 и белка, который на 98% идентичен по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. 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. Настоящее изобретение также может быть направлено на вакцину, содержащую (а) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 10 и белка, который на 95% идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и (b) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более белков, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12 и белка, который на 95% идентичен по всей длине аминокислотной последовательности полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. 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), TNF α ,

TNF β , 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.

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

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

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.

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

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.

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.

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

Молекула нуклеиновой кислоты может содержать одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: (a) последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; (b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая на 98% идентична по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; (c) их фрагментов, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные фрагменты, содержащие по меньшей мере 20 аминокислот, кодируемых последовательностью SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; 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 или SEQ ID NO: 11. 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.

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

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

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

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

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), $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, 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.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой карту, показывающую организацию генома HBV, который состоит из четырех перекрывающихся ORF;

фиг. 2 иллюстрирует организацию и особенности поверхностных антигенов HBV;

фиг. 3 иллюстрирует IgELS и эндопротеолитический сайт расщепления в консенсусном поверхностном антигене HBV;

фиг. 4 иллюстрирует длинный консенсусный поверхностный антиген HBV (LHBs) и небольшой консенсусный поверхностный антиген HBV (SHBs);

фиг. 5 представляет собой карту вектора pGX1801 HepB - Mcore (SEQ ID NO: 17);

фиг. 6 - карту вектора pGX1802 HepB pLHBs-A (SEQ ID NO: 18);

фиг. 7 - карту вектора pGX1803 HepB pLHBs-C (SEQ ID NO: 19);

фиг. 8 - карту вектора pGX1804 HepB pSHBs-A (SEQ ID NO: 20);

фиг. 9 - карту вектора pGX1805 HepB SHBs-C (SEQ ID NO: 21);

фиг. 10 иллюстрирует филогенетический анализ консенсусной последовательности HBcAg по сравнению с индивидуальными генотипами A, B, C, D и E;

фиг. 11A и 11B демонстрируют результаты экспериментов по поводу экспрессии pM Core. Фиг. 11A показывает результаты *in vitro* трансляционного протокола. Фиг. 11B показывает результаты вестерн-блоттинга;

фиг. 12 представляет собой график, иллюстрирующий плазмидную карту и последовательность pMCore;

фиг. 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;

фиг. 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. Ноеchst-окраску также использовали для флуоресцентного мечения клеточного ядра. Экспрессия MCore по большей части локализовалась в цитоплазме, как показано окрашиванием вне ядра;

фиг. 15 иллюстрирует схему иммунизации. 4 мышей иммунизировали внутримышечно 30 мкг pMCore;

фиг. 16 показывает увеличенную амплитуду секреции $\text{IFN-}\gamma$ в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 17 - увеличенную амплитуду секреции $\text{IFN-}\gamma$ в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 18 - увеличенную амплитуду секреции $\text{TNF-}\alpha$ в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 19 - увеличенную амплитуду секреции $\text{TNF-}\alpha$ в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 20 - увеличенную амплитуду секреции CD 107a в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 21 показывает увеличенную амплитуду секреции f CD 107a в CD8^+ и CD4^+ Т-клетках из селезенки мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 22 - средний процент HBcAg-специфических CD4^+ или CD8^+ $\text{IFN-}\gamma^+$, $\text{TNF-}\alpha^+$ секретирующих клеток от мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore;

фиг. 23 - средний процент HBcAg-специфических CD4^+ или CD8^+ дважды положительно продуцирующих клеток от мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore;

фиг. 24 - интерферон-гамма Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 25 - интерферон-гамма Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 26 показывает фактора- α некроза опухоли Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 27 - фактора- α некроза опухоли Т-клеточный ответ в печени мышей Balb/C, вакцинированных pM-Core;

фиг. 28 - процент HBcAg-специфических CD4^+ и CD8^+ $\text{IFN-}\gamma^+$, $\text{TNF-}\alpha^+$ продуцирующих клеток в печени мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном

pMCore;

фиг. 29 - средний процент HBcAg-специфических CD4 или CD8 дважды положительных продуцирующих клеток в печени мышей Balb/c, иммунизированных контролем pVAX или консенсусным коровым антигеном pMCore;

фиг. 30 - спленоциты, продуцирующие антиген-специфическое антитело. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно t-тесту Стьюдента;

фиг. 31 - данные анализа ELISPOT;

фиг. 32 - частоту HBcAg-специфических IFN- γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов после стимуляции клеток селезенки иммунизированных мышей;

фиг. 33 - данные экспериментов с использованием CFSE-меченных клеток для сравнения элиминации пептида обработанных клеток-мишеней *in vivo* с помощью CD8 T-клеток у вакцинированных и невакцинированных животных;

фиг. 34 - *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;

фиг. 35 - сравнение процента пролиферации CD3+CD4⁺ клеток и CD3+CD8⁺, обработанных вектором pVax (контроль) или плазмидой pMCore, которая экспрессирует HBV М-кор;

фиг. 36 - процент пролиферации CD4 и CD8 Т-клеток;

фиг. 37А и 37В - 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;

фиг. 38 - HBcAg-специфический гуморальный иммунный ответ, вызванный pMCore, в сыворотке и спленоцитах. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно t-тесту Стьюдента;

фиг. 39 - HBcAg-специфический гуморальный иммунный ответ, вызванный pMCore, в сыворотке и спленоцитах. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего. Значимость определяли согласно t-тесту Стьюдента;

фиг. 40 - процент TNF- α и IFN- γ из CD4⁺ и CD8⁺ клеток селезенки и печени;

фиг. 41 - данные экспериментов по определению того, воздействует ли клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, на печень, путем измерения уровней ALT в сыворотке;

фиг. 42 - иммунное окрашивание отделов печени, взятых через три дня после гидродинамической инъекции PBS, pMCore (HBcAg) или pNS3/4A (HCVNS3-4A) от наивных мышей и мышей, которые были иммунизированы pMCore. Клиренс очень высокий для pMCore-иммунизированной печени по сравнению с NS3/4a-трансфектированной контрольной печенью. Экспрессию pMCore или NS3/4A обнаруживали с помощью антитела к НА (белые/светло-серые клетки);

фиг. 43 - 3 дня после трансфекции, в которые клетки анализировали по поводу экспрессии маркера дегрануляции, экспрессии CD107a и IFN- γ ⁺ после стимуляции пептидами HbcAg;

фиг. 44 - уровни ALT в сыворотке в день 3, 6 и 12 после трансфекции, уровни были измерены и не доказали повышения у релевантных вакцинированных животных;

фиг. 45 - 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 46 - короспецифические 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 47 - клеточные иммунные ответы, специфические к поверхностному антигену А, 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 48 - данные анализа ELISPOT клеточных иммунных ответов, специфических к поверхностному антигену С, 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 49 - 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 50 - 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 prIL-12) вакцинами;

фиг. 51 - сравнение анти-HBV антител в серийном разведении сыворотки от животных, иммунизированных длинной+IL-12 (т.е. pMCore, pLHb A, pLHb C и prIL-12) вакциной;

фиг. 52 - ДНК-конструкт поверхностного антигена HBV и его экспрессию. (А) Филогенетический

анализ консенсусных последовательностей HBs генотипов А и С по сравнению с природным HBs. Консенсусные последовательности обозначены звездочками. (В) Схематическая диаграмма генных вставок HBs в ДНК-плазмиды. рLHBs и рSHBs представляют большие и небольшие белковые антигены HBs. Белки preS1, preS2 и основной S присоединены к сайтам эндопротеолитического расщепления. (С) Выявление рLHBs и рSHBs с помощью внутриклеточного окрашивания трансфектированных клеток RD моноклональным антителом и поликлональной мышинной сывороткой;

фиг. 53 показывает, что рLHBs 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. (А) HBs-специфические IgG реакции, измеренные через одну неделю после каждой иммунизации. Стрелка указывает время иммунизации. (В) Общие IFN- γ реакции, вызванные каждым конструктом к синтетическим preS1/S2 и основному S пептидам. (С) 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;

фиг. 54 - *in vivo* специфический киллинг. Различные группы мышей, иммунизированные либо рVax (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;

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

фиг. 56 показывает, что антиген-специфические CD8 Т-клетки индуцируют противовирусные цитокины. Внутриклеточное окрашивание антивирусных цитокинов после *ex-vivo* стимуляции спленоцитов от мышей BALB/c из различных иммунизированных групп (табл. 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;

фиг. 57 - иммуногенность у нечеловекообразных приматов. Пять макаков-резусов иммунизировали внутримышечно рSHBs/pMCore, рLHBs/pMCore или рLHBs/pMCore + рIL-12 (табл. 4), а затем с помощью электропорации. Обезьяны получили три прививки. (А) Высокие титры антител к HBs наблюдались только после 2 прививки. (В) Ответы IFN- γ измеряли один раз перед первой иммунизацией и через 2 недели после каждой иммунизации. (С) Многие положительные HBs матричные пептидные пулы наблюдались у большинства обезьян из разных групп, подтверждая широкие Т-клеточные ответы у иммунизированных макаков. (D) Внутриклеточное окрашивание (IFN- γ , TNF- α , ИЛ-2) PBMCs после последней иммунизации показывает продуцирование HBs и HBc-специфических антивирусных цитокинов как в CD4, так и в CD8. Фиг. 58А-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. (А) Сывороточная щелочная фосфатаза. (В) Уровни сывороточной аланинаминотрансферазы (ALT). (С) Уровни сывороточной аспартатаминотрансферазы (AST). (D) Уровни общего билирубина в сыворотке. (Е) Уровни сывороточного креатинина. (F) сывороточные уровни азота мочевины крови;

фиг. 59А-59D - 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 (рLHBs-А) (А) и небольшой поверхностный белок (рSHBs-А) (В) и большой поверхностный белок генотипа С (рLHBs-С) (С), и небольшой поверхностный белок (рSHBs-С) (D).

Подробное описание сущности изобретения

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 мультиэпи-

топные реакции, связанные с очисткой инфицированных гепатоцитов. 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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. "Адъювант", как используется в данном документе, означает любую молекулу, добавленную к ДНК-плазмидным вакцинам, описанным в настоящем документе, для повышения иммуногенности антигенов, кодируемых ДНК-плазидами и кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе ниже. "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.

"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.

"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 Хуг-

стена между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

"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.

"Электропорация", "электро-пермеабилзация" или "электро-кинетический энхансмент" ("EP"), 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, миРНК, лекарства, ионы и вода, пройти с одной стороны клеточной мембраны на другую.

"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 по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют белковые фрагменты, описанные ниже.

"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.

Как используется в данном документе, термин "генетический конструкт" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодированная 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.

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 гибридизоваться 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 гибридизоваться с (т.е. является комплементом) матричной последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости.

"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. "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.

"Нуклеиновая кислота", или "олигонуклеотид", или "полинуклеотид", как используется в данном документе, означает 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.

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. 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.

"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 нескольких 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.

"Сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может связываться с amino-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 отщепляются от остальной части белка, часто упоминаемого как зрелый белок, при секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности присоединяются к N-концу белка. "Жесткие условия гибридизации", как используется в данном документе, означают условия, при которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) гибридизуется 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 оп-

ределенных 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 1,0М иона натрия, например приблизительно 0,01-1,0М концентрация иона натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, приблизительно 10-50 нуклеотидов) и 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 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, 5×SSC, 1% SDS, инкубация при 65°C, с промывкой в 0,2 × SSC и 0,1% SDS при 65°C.

"Практически комплементарные", как используется в данном документе, означает, что первая последовательность 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.

"Практически идентичные", как используется в данном документе, означает, что первая последовательность 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.

"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. "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.

"Вариант" относительно пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативным замещением аминокислот, но сохраняет 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 одну биологическую активность. Консервативное замещение аминокислоты, т.е. 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 № 4554101, 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.

"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.

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.

Вакцина может быть ДНК-вакциной. ДНК-вакцины раскрыты в патентах США № 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055 и 5676594, которые включены в настоящее описание полностью в качестве ссылки. ДНК-вакцина может дополнительно содержать элементы или реагенты, которые ингибируют ее интеграцию в хромосому.

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

а. Коровый антиген HBV.

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.

Табл. 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	

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

[illegible]

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

- 16 -

вательностей 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. 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-кодоном 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.

b. Поверхностный антиген HBV.

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.

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 (фиг. 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%) или очень низким (например, меньше, чем 30%) 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.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусные поверхностные антигены

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. 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 полно-

размерного 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.

[illegible]

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты свобод-

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.

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.

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.

- 20 -

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.

- 21 -

генными 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.

c. Комбинация коровых и поверхностных антигенов HBV.

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.

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.

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. 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 № 4510245; 4797368; 4722848; 4790987; 4920209; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310668; 5387744; 5389368; 5424065; 5451499; 5453364; 5462734; 5470734; 5474935; 5482713; 5591439; 5643579; 5650309; 5698202; 5955088; 6034298; 6042836; 6156319; 6589529, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

d. Вакцинные продукты и плазмиды.

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. 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 векторах, которые живут в клетках.

Генетические конструкторы могут содержать регуляторные элементы для экспрессии генов, коди-

рующих последовательности нуклеиновой кислоты. Регулирующие элементы могут быть промотором, энхансерным иницирующим кодоном, стоп-кодоном или сигналом полиаденилирования.

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. 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.

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 металлотионеин. Промотор может быть также тканеспецифическим промотором, таким мышечно или кожно специфическим промотором, природным или искусственным или кожи конкретного промотора, природные или синтетические. Примеры таких промоторов описаны в публикации патентной заявки США № US 20040175727, содержание которой включено в настоящее описание во всей своей полноте.

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 pCER4 (Invitrogen, San Diego, CA).

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 № 5593972, 5962428, а также WO 94/016737, содержание каждого из них в полном объеме включено в качестве ссылки.

Вектор может также содержать точку начала репликации от млекопитающих, чтобы поддерживать вектор экстрахромосомально и продуцировать несколько копий вектора в клетке. Вектор может быть pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), который может содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, которые могут продуцировать высококопированную эписомную репликацию без интеграции. Вектор может быть pVAX1 или вариантом pVax1 с изменениями, таким как вариантная плаزمиды, 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.

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:

C>G 241 в промоторе CMV.

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

A> -2876 скелет, по ходу транскрипции гена устойчивости к канамицину C>T3277 в точке начала

репликации pUC (Ori), мутация с высоким числом копий (см. Nucleic Acid Research 1985).

G>C 3753 в самом конце pUC Ori против хода транскрипции сайта RNaseH.

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

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

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.

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 бакуловирусовая экспрессионная система MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая может быть использована для продуцирования белка в клетках насекомых. Вектором также может быть pcDNA 1 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.

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 фиг. 5-9 соответственно.

е. Фармацевтические композиции вакцины.

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

Фармацевтические композиции могут содержать приблизительно от 5 нг до приблизительно 10 мг вакцинной ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат приблизительно от 25 нг до приблизительно 5 мг вакцинной ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 50 нг до приблизительно 1 мг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 0,1 до приблизительно 500 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 1 до приблизительно 350 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 5 до приблизительно 250 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 10 до приблизительно 200 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 15 до приблизительно 150 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 20 до приблизительно 100 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 25 до приблизительно 75 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 30 до приблизительно 50 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 35 до приблизительно 40 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат приблизительно от 100 до приблизительно 200 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 10 мкг до приблизительно 100 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 20 мкг до приблизительно 80 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 25 мкг до приблизительно 60 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 30 нг до приблизительно 50 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит приблизительно от 35 нг до приблизительно 45 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 1 до приблизительно 350 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 25 до приблизительно 250 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкг ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно на-

стоящему 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 нг 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 мкг 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.

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 нг 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 мкг 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.

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. 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 монофосфорилипид 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.

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 монофосфорилипид 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 WO 9324640), 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. 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), $TNF\alpha$, $TNF\beta$, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), кожный Т-клеточный проводящий хемокин (STACK), эпителиальный тимус-экспрессированный хемокин (TECK), мукозо-ассоциированный эпителиальный хемокин (MEC), IL-12, IL-15, MHC, 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, STACK, TECK, 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.

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, Ikb, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферона, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

f. Способы доставки вакцины.

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 HA 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. 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 доставлена индивидууму, чтобы модулировать активность иммунной системы индивидуума, тем самым повышая иммунный ответ. Способы доставки ДНК вакцины описаны в патенте США № 4945050 и 5036006, оба из которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

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, альпаккой, мышами, крысами или курицей и, предпочтительно, человеком, коровой, свиньей или курицей.

g. Доставка вакцины с адьювантами.

Фармацевтические композиции, предпочтительно вакцины, описанные в данном документе, могут быть введены в комбинации с белками или генами, кодирующими адьюванты, которые могут включать: α -интерферон ($IFN-\alpha$), β -интерферон ($IFN-\beta$), γ -интерферон, IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, 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-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, Ikb, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферона, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1 или TAP2 или их функциональные фраг-

менты. В примерных вариантах реализации изобретения адъювантом является IL-12.

h. Способ генерации иммунного ответа на вакцину.

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.

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.

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 воспаления 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.

Вакцину или фармацевтическую композицию можно вводить различными способами, в том числе перорально, парентерально, подъязычно, чрескожно, ректально, через слизистую, местно, путем ингаляции, посредством трансбуккального введения, внутримышечно, 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 электропорация ("EP"), "гидродинамический метод" или ультразвук. 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.

a. Электропорация.

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 создания 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.

Примеры электропорационных устройств и способов электропорации, которые могут содействовать в получении ДНК-вакцин согласно настоящему изобретению, включают те, которые описаны в патенте США № 7245963, 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.

Патент США № 7245963 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 7245963 включено в данный документ в качестве ссылки.

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 электрокинетическое 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. Электродные массивы и способы, описанные в патенте США № 7245963 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 № 7245963 и патентной публикации США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и 21 калибр. Кроме того, некоторые варианты реализации изобретения, включающие электропорационные устройства и способы их использования, реализации изобретения, предполагают электропорационные устройства, описанные в следующих патентах: патент США № 5273525, выданный 28 декабря 1993, патент США № 6110161, выданный 29 августа 2000, № 6261281, выданный 17 июля 2001, и патент США № 6958060, выданный 25 октября 2005, и патент США 6939862, выданный 6 сентября 2005. Кроме того, патенты, относящиеся к предмету, представленному в патенте США 6697669, выданном 24 февраля 2004, который касается доставки ДНК с использованием любого из множества устройств, и в патенте США 7328064, 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.

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. 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 содержат 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 № 7238522, который был выдан 3 июля 2007 года. Указанные выше заявка и патент США с серийным номером 60/939792 и патент США № 7238522, соответственно, включены в данное описание во всей своей полноте.

Примеры

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 изобре-

тения 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.

Консенсусный коровый белок HBV, также именуемый как HBV модифицированный, М-кор или М-коровый конструктор, 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 конструктора 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.

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 фиг. 10, наблюдалась относительная близость мультигенотипной консенсусной HBcAg-последовательности для всех выбранных последовательностей из разных генотипов. 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 HA-метка, а конструктор был оптимизирован относительно РНК и кодона. Это привело к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей М-коровую последовательность с IgE-лидером и HA-меткой (SEQ ID NO: 5), которая переваривается EcoRI и NotI, и клонируется в вектор экспрессии pVAX (Invitrogen) под контролем цитомегаловирусного преданного промотора. Полученный конструктор затем был назван pMCore (SEQ ID NO: 17).

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 фиг. 11А и 11В.

Кроме того, белок HBcAg экспрессировался ДНК-плазмидой, трансфектированной pMCore, содержащим коровый ген гепатита В (фиг. 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 HA, направленное на закодированный эпитоп HA, клон HA-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 (фиг. 13). Экспрессия была дополнительно подтверждена с использованием анти-HA меченного моноклонального антитела с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Рабдомиосаркомные (RD) клеточные линии трансфицировали pMCore, 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 HA-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 мин при комнатной температуре, конфокальное изображение использовали для визуализации HBcAg в цитоплазме и вокруг ядра трансфицированных RD-клеток, как показано на фиг. 14. Профиль экспрессии подтвердил, что ДНК-плазида, 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 флуоресценции проводились с использованием программного обеспечения Image J (NIH, Rockville, MD).

2) Иммунизация мышей.

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 pM-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. 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 иммунизации 30 мкг pMCore или pVax с последующей электропорацией, как указано на иммунизационной схеме (фиг. 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 постоянно-токовой электропорации (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). По два 0,2 амперных постоянно-токовых 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 мс с 1-секундной задержкой между импульсами. *In vivo* изучение мышцей 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. Фиг. 16 и 17 демонстрируют, что вакцинация мышцей Balb/C рM-Core повышала амплитуду секреции IFN- γ в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки. Фиг. 18 и 19 демонстрируют, что вакцинация мышцей Balb/C рM-Core повышала амплитуду секреции TNF- α в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки. Фиг. 20 и 21 демонстрируют, что вакцинация мышцей Balb/C рM-Core повышала амплитуду секреции CD 107a в CD8+ и CD4+ Т-клетках селезенки.

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

Субпопуляцию спленоцитов ресуспендировали в среде R10 в концентрации 10⁷ на мл и по 100 мкл высевали на 96-луночный круглодонный планшет. 100 мкл среды, содержащей объединенные пептиды рMCore 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 ч и окрашивали LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 10 мин при 37°C. Внеклеточное окрашивание проводили, используя антитела, специфичные к мышечным CD3, CD4 и CD8. Спленоциты затем пермеабилizировали и промывали, используя BD CYTOFIX/CYTOPERM и PERM/WASH (BD Bioscience) соответственно.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов.

Внутриклеточные цитокины затем окрашивали антителами к мышечному интерферону- γ и фактору- α некроза опухоли. Субпопуляцию лимфоцитов ресуспендировали в среде R10 в концентрации 10⁷ на мл и по 100 мкл высевали на 96-луночный круглодонный планшет. 100 мкл среды, содержащей объединенные пептиды рMCore, 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 ч и окрашивали LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 10 мин при 37°C. Внеклеточное окрашивание проводили, используя антитела, специфичные к мышечным CD3, CD4 и CD8. Спленоциты затем пермеабилizировали и промывали, используя BD Cytofix/Cytoperm™ и Perm/Wash™ (BD Bioscience) соответственно. Клетки затем окрашивали внутриклеточно антителами к интерферону- γ , фактору- α некроза опухоли, интрелейкину-2 и лизосомно-ассоциированному мембранному белку 1.

Конъюгированные противомышечные антитела использовали во время внеклеточного и внутриклеточного окрашивания, включая: CD3-фикоэритрин/Су7 (PE/Су7), 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).

Средний индуцированный HBsAg-специфический IFN- γ Т-клеточный ответ был сильным при 2000 ($\pm$ 210) SFU на миллион спленоцитов. Интересно, что внутриклеточное окрашивание стимулированных спленоцитов 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 (фиг. 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% (фиг. 23). Миграция HBV специфических Т-клеток в печень также была продемонстрирована у животных, которым вводили ДНК-вакцину рMCore. 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*. Фиг. 24 и 25 демонстрируют интерферон- γ Т-клеточный ответ в печени, а фиг. 26 и 27 демонстрируют иммунный ответ фактора- α некроза опухоли в печени и повышенную реакцию, которая возникает в результате вакцинации рМCore.

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. Также исследовали способность внутрипеченочных антиген-специфических Т-клеток продуцировать цитокины после ДНК-иммунизации. В каждую печень путем непосредственной инъекции вводили 1 мл 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 мин 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 HBcAg (фиг. 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 HBcAg-специфических CD4 Т-клеток в противоположность селезенке. Процент HBcAg-специфических CD4 Т дважды положительных Т-клеток в покоящейся 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 анти-тело-продуцирующие способности резидентных В-клеток печени иммунизированных мышей. Интересно, что печень в качестве слизистого органа продуцировала больше антиген-специфических IgA, чем IgG (фиг. 30), наблюдение, которое ранее не исследовалось.

На фиг. 31 показаны клеточные иммунные реакции, вызванные рМ-Core с использованием твердо-фазного 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 фиг. 31, иммунизация рМCore вызывает сильные клеточные иммунные реакции. Среднее HBcAg-специфических IFN- γ Т-клеточных реакций составляло приблизительно 2000 ($\pm$ 210) SFU на миллион спленоцитов.

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, 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). Наблюдалось, что через одну неделю после финальной иммунизации рМCore-иммунизированные мыши демонстрировали признаки сильных HBcAg Т-клеточных реакций, как было определено с помощью IFN- γ ELISPOT-анализа после *ex vivo* стимуляции. На фиг. 32 показано, что доминантные эпитопы смещены в сторону пептидного пула 2.

Исследования *in vivo* цитотоксичности проводили, используя мечение карбоксифлюоросцеиндиацетатсукцинимидным эфиром (CFSE) в сочетании с проточной цитометрией. Спленоциты взяли от мышей, 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 груп-

пе. 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.

Фиг. 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.

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 рVax или рMCore, 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 (1 мкМ) и по 10^7 клеток из каждой популяции внутривенно инъецировали наивным или иммунизированным мышам. Спустя 24 или 90 ч, клетки из селезенки и печени выделяли и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент лизиса клеток подсчитывали следующим образом:

$$100 - \left(\frac{(\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках})}{(\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках})} \right) \times 100.$$

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 фиг. 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.

Фиг. 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 ч. Спустя 48 ч 50% культуральной среды удаляли и помещали в свежую R10. На 4-й 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 пролиферирующих клеток. Как показано на фиг. 35, CD3+CD8+ Т-клетки, выделенные из селезенки, пролиферировали больше по сравнению с CD3+CD4+ Т-клетками.

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 засевали 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 ч. Спустя 48 ч 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 (фиг. 36), показывают четкое CD8 Т-клеточное смещение в ответ.

На фиг. 37A и 37B 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, Coining, NY) покрывали 1 мкг/мл белка HBcAg в PBS при 4°C в течение 24 ч, а затем промывали PBS-Tween и блокировали PBS, содержащим 1% BSA, в течение 2 ч при комнатной температуре. Серийно разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания связанное сывороточное антитело было обнаружено с помощью HRP-меченого козьего противомышиного IgG (фиг. 37A) или IgA (фиг. 37B). Пероксидазоноконъюгированные 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. 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, Coining, 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 ч при комнатной температуре. Серийно разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания связанное сывороточное антитело было обнаружено с помощью HRP-меченого козьего противомышиного IgG или IgA. Пероксидазоноконъюгированные 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 (фиг. 38). В-клеточный ELISpot иммунизированных мышей (фиг. 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 реакции после 3 иммунизаций.

Фиг. 40 демонстрирует процент TNF- α и IFN- γ из CD4⁺ и CD8⁺ клеток селезенки и печени.

В отсутствие небольших модельных животных для HBV, был использован HBcAg для временной трансфекции печени мышей путем гидродинамической инъекции. Печени иммунизированных мышей трансфицировали pMCore 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 фиг. 41 показали, что клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, не вызывал повреждение печени.

Прямая гидродинамическая инъекция была также использована для временной трансфекции печени мышей. Здесь иммунизированные или наивные печени мышей трансфицировались либо pMCore 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 с для временной трансфекции печени. Экспрессию или клиренс плазмиды определяли путем окрашивания печени моноклональными антителами к НА. Иммуногистохимическое окрашивание через три дня после трансфекции (фиг. 42) показало клиренс HBcAg-трансфицированных гепатоцитов по сравнению с NS3/4A-трансфицированными печенями животных. CD8 Т-клетки, выделенные из pMCore гидродинамически инъецированных мышей, на фиг. 43 показали более высокую частоту IFN- γ ⁺ CD107a⁺, маркера дегрануляции, по сравнению с иммунизированными печенями животных, трансфицированных иррелевантной плазмиды.

Так как клиренс pMCore-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 повреждения печени, был использован анализ измерения активности фермента аланинаминотрансферазы (ALT), чтобы указать на наличие повреждений печени при повышенных уровнях фермента в сыворотке (фиг. 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 HBcAg-трансфицированных гепатоцитов не повышает уровни ALT у трансфицированных иммунизированных животных за пределы нормального диапазона 5-30 Ед./л (фиг. 44).

Пример 2. Поверхностные белки HBV.

1) Конструирование HBsAg ДНК-вакцины.

Использование консенсусных иммуногенов в контексте вариабельных патогенов с сильно изме-

няющимися 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.

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 (фиг. 52А, фиг. 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).

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 до 99,8%, с поверхностными белками первичных изолятов генотипа А HBV. В частности, были разработаны две версии такого консенсусного белка (фиг. 4 и 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.

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 до 99,8%, с поверхностными белками первичных изолятов генотипа С HBV. В частности, было разработано две версии такого консенсусного белка (фиг. 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.

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 (фиг. 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%) или очень низким (например, меньше, чем 30%) 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) (см. фиг. 3 и 52В). Были синтезированы оптимизированные гены и подтверждены последовательности.

Консенсусные HBV-поверхностные антигены SHBs-A, LHBs-A, SHBs-C и LHBs-C были клонированы в вектор экспрессии для получения конструктов 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 (фиг. 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 HBcAg (pMCore) описано в примере 1.

2) In vitro экспрессия комбинированных ДНК-вакцин HbsAg.

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 мышинным моноклональным антителом к поверхности вируса гепатита В (Abcam, Cambridge, MA). Затем клетки окрашивали вторичным

противомышинным антителом, конъюгированным с изотиоцианатом флуоресцеина (BD Biosciences, San Jose, CA), клетки промывали и фиксировали 2%-ным 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).

После конструирования и оптимизации четырех конструкторов экспрессия белка из каждой плазмиды была подтверждена внутриклеточным окрашиванием. RD или Hep G2 клетки временно трансфицировали отдельными конструкторами или пустым вектором pGX0001 в качестве контроля. Клетки окрашивали внутриклеточно через 48 ч с помощью анти-HBsAg поликлональной мышиной сыворотки или коммерчески приобретенного мышиного моноклонального антитела. Экспрессия была подтверждена с помощью проточной цитометрии (фиг. 52С). Повышенные уровни экспрессии белка HBs наблюдались в клетках, трансфицированных каждым конструктором, по сравнению с клетками, трансфицированными пустыми векторами (pGX0001).

Пример 3. Иммуногенность отдельных искусственных HBsAg ДНК-плазмид в моделях небольших животных.

После исследований экспрессии способность отдельных плазмид индуцировать антигенспецифические гуморальные и клеточные реакции оценивали *in vivo*. Шести-восемь 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). 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 мс 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.

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. Высоко связывающие планшеты ELISA plates (Costar, Coining, NY) покрывали 1 мкг/мл рекомбинантного белка в PBS при 4°C в течение 24 ч, а затем промывали 0,1% PBS-Tween и блокировали PBS, содержащим 1% BSA в течение 2 ч при комнатной температуре, стерильно разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после промывания связанный IgG обнаруживали с помощью HRP-меченного козьего противомышинного 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.

Обе pLHBs и pSHBs из любого генотипа были высокоиммуногенными. Дополнительная иммунизация повысила эти реакции с реакциями антител, демонстрируя наибольшее увеличение спустя две недели после третьей иммунизации (фиг. 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.

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 (Mab-Tech, 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/IM (PMA 0,1 мкг/мл и иономицином 0,5 мкг/мл, Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

HBsAg-специфические IFN- γ секретирующие клетки проанализировали в ответ на два пула искус-

ственных 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 конструкции были способны индуцировать сильные реакции Т-клеток, а перекрестная иммунная реактивность наблюдалась в пределах двух генотипов (фиг. 53В). Хотя вместе preS белки почти одинаковы по размеру с основным S-белком, было эпитопное смещение в клеточноопосредованных иммунных (СМ) 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 конструкции не продемонстрировали существенных отличий в индукции IgG к природному белку HBV по сравнению с более короткими конструкциями.

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

После подтверждения амплитуды СМ была исследована ширина клеточных реакций на генотип-специфические мишени. Соответственно, наборы Интерферон- γ 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 иммунодоминантные 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 конструкта. Реакции в более 50 SFU на миллион клеток считались положительными.

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 (фиг. 53С). Эти данные указывают на высокую степень широких перекрестно-реактивных клеточных реакций, вызванных этими 4 HBs-конструкциями. 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.

Противовирусные эффекторные CD8 Т-клетки индуцируют цитотоксичность, которая представляет собой клеточную активность для элиминирования HBV-инфицированных гепатоцитов. Способность конструктов 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 ч, выделяли клетки из крови, селезенки или печени и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент лизиса клеток рассчитывали следующим образом:

$$100 - \left(\frac{(\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в инфицированных клетках})}{(\% \text{ релевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках} / \% \text{ иррелевантного пептида, пульсирующего в неинфицированных клетках})} \right) \times 100$$

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 конструктами SHBs, составлял 39 и 48% для генотипа А и С соответственно. Средняя элиминация клеток-мишеней для конструктов 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 Аг-плазмидой, как описано в примере 1, у которых 83 и 76% целевой клиренс 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 (фиг. 54). Имея вакцинос-пецифический ЦТЛ трафик в печень, орган, как известно, подавляет Т-клеточный ответ и индуцирует толерантность, подчеркивает эффективность конструктов в стимулировании функционального СМ.

Пример 5. Иммуногенность HBsAg-HBcAg ДНК-коктейля.

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 путей повышения количества иммунных эпитопов, которые Т-клетка будет распознавать для элиминирования, так как коровый антиген HBV участвует в вирусном клиренсе через индукцию HBcAg-специфических ЦТЛ реакций.

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 (см. табл. 3). Мыши, иммунизированные только HBsAg, генерировали высокий титр IgG в своих сыворотках. Интересно, что похожие титры наблюдались в группе SHBs-pMCore, но были менее сильными в группе коктейлей LHBs-pMCore (фиг. 55A). 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

Для дальнейшего изучения иммунного ответа, вызываемого HBS-HBc-иммунизированными мышами, оценивали продуцирование IFN- γ из каждой иммунизированной группы. Среднее SFU на миллион спленоцитов для групп, не имеющих pMCore, составило 689 и 666 для генотипа А и 1160 и 1312 против пептидов генотипа С соответственно. Кроме того, добавление pMCore 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 (фиг. 55B).

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 (фиг. 56A-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-pMCore поддерживали гуморальные ответы, обнаруженные у животных, иммунизированных только SHBs.

Пример 6. Иммунизация резус-макак коктейлем индуцирует сильные клеточные HBc- и HBs-специфические и гуморальные HBs-специфические иммунные реакции.

Эффективность ДНК-вакцины предыдущих ДНК-конструктов была последовательно слабой у крупных животных и людей. Сильные ответы антител и Т-клеточные ответы, стимулированные комбинацией pLHBs или pSHBs и pMCore 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 адьюванта для усиления иммунного ответа против различных антигенов из различных патогенов. Этот адьювант увеличивает Т-клеточные ответы ДНК-вакцины у мышей и макаков, и человека.

1) Вакцинация.

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. См. табл. 4.

Таблица 4. 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

Одной группе вводили путем внутримышечной (ИМ) 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 ИМ доставку вакцину, содержащую 1,0 мг каждого из конструкторов pMCore, pLHb A и pLHb C; эта группа называется "длинной" группой. Третьей группе вводили через ИМ 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 импульсами. Животные были вакцинированы в недели 0, 4, 12 и 30.

2) Отбор проб.

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 PBMC 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.

Реакции с высоким титром антител против HBsAg наблюдались после двух иммунизаций pSHBs/pMCore, но не с pLHBs/pMCore. Этот ответ был сопоставим с данными мышинного антитела на фиг. 55A. Ответ против pLHBs/pMCore поднялся после третьей иммунизации. Адьювант IL-12 повысил титр антител иммунизации коктейлем pLHBs/pMCore уже после всего лишь двух иммунизаций (фиг. 57A). Клеточные иммунные реакции от PBMC показывают практически отсутствие HBs или HBc-специфических ответов после первой иммунизации. Однако ответы наблюдались после второй иммунизации и увеличивались после каждой последующей иммунизации. Сильные ответы свыше 2000 SFU на миллион PBMC наблюдались во всех группах после третьей иммунизации и были в значительной степени направлены против корового антигена. Добавление адьюванта IL-12 усилило амплитуду Т-клеточного ответа 1000 SFU на миллион PBMC по сравнению с только коктейлем pLHBs/pMCore (фиг. 57B). 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 (фиг. 57C). 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.

На фиг. 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 фиг. 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).

Подобно фиг. 45-48, на фиг. 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 усилило клеточный иммунный ответ, а длинные и короткие консенсусные поверхностные антигены HBV были аналогично иммуногенными.

На фиг. 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, присут-

ствующих в вакцине.

На фиг. 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 (т.е. после 1-й, после 2-й и после 3-й иммунизации соответственно). ELISA проводили, как описано выше в примере 1. Данные на фиг. 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.

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, γ -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. 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. Фиг. 57D показывает, что после трех иммунизаций наблюдались HBV-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные реакции. Подобно результатам, показанным в INF- γ ELISpot, ответы против корового антигена доминировали. Добавление IL-12 усиливало общую амплитуду отклика, однако, как ожидалось, этот эффект был более выраженным для CD8 Т-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. 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.

Поскольку клинические исследования пациентов, активно инфицированных HBV, предположили возможность того, что Т-клеточный ответ может быть связанным с патологией печени в течении 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 фиг. 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 значительного ущерба печени вакцинированных животных.

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.

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.

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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина для индуцирования иммунного ответа против HBV у человека, содержащая одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих длинный консенсусный поверхностный антигенный белок HBV и выбранных из:

(a) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из: SEQ ID NO: 10, аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

(b) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из: SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 95% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 96% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 97% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

2. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая:

(c) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6.

3. Вакцина по п.2, содержащая:

(a) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из: SEQ ID NO: 10, аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из: SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 95% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 96% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 97% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична по всей длине полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12; и

(c) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6.

4. Вакцина по п.3, содержащая:

(a) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 и содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9;

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 и содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

(c) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6, и содержащую одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 соответственно.

5. Вакцина по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

6. Вакцина по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.

7. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая адъювант.

8. Вакцина по п.7, отличающаяся тем, что указанный адъювант представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

9. Способ индукции у человека иммунного ответа против HBV, включающий введение вакцины по п.1.

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

11. Способ лечения человека, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение вакцины по п.1.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует одну или более аминокислотных последовательностей длинного консенсусного поверхностного

антигенного белка HBV, выбранных из:

- (a) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 10;
- (b) аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;
- (c) аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;
- (d) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 12;
- (e) аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12; и
- (f) аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из:

- (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9;
- (b) нуклеотидной последовательности, которая на 98% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9;
- (c) нуклеотидной последовательности, которая на 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9;
- (d) нуклеотидной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 11;
- (e) нуклеотидной последовательности, которая на 98% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11; и
- (f) нуклеотидной последовательности, которая на 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор экспрессии и нуклеотидная последовательность, кодирующая одну или более аминокислотных последовательностей, функционально связана с регуляторным элементом.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.

17. Способ индукции у человека иммунного ответа против HBV, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.12.

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

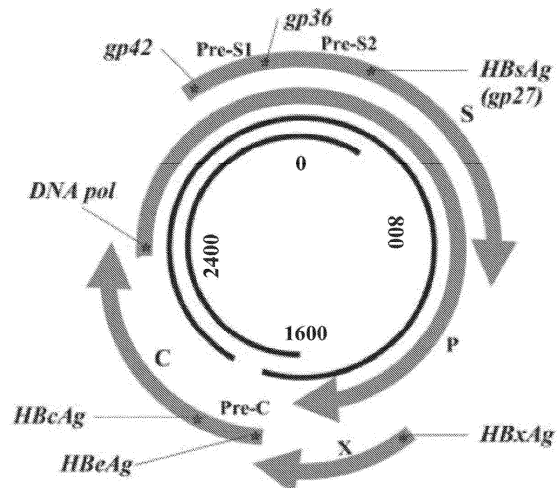
19. Способ лечения человека, у которого была диагностирована HBV-инфекция, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.12.

20. Белок, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из:

- (a) SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12;
- (b) аминокислотной последовательности, которая на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; и
- (c) аминокислотной последовательности, которая на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

21. Вакцина для индуцирования иммунного ответа против HBV у человека, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 и адъювант.

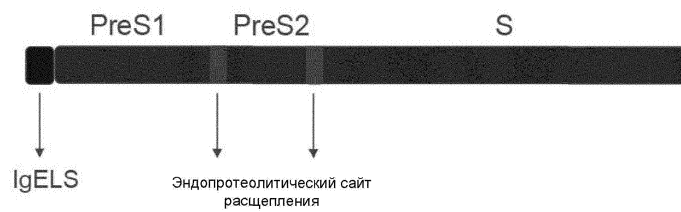
22. Вакцина по п.21, отличающаяся тем, что указанный адъювант представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.



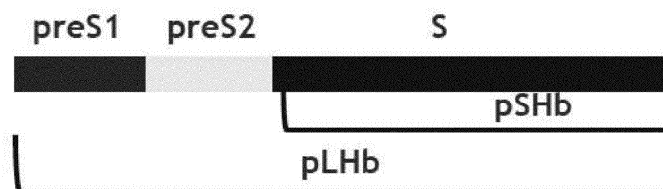
Фиг. 1



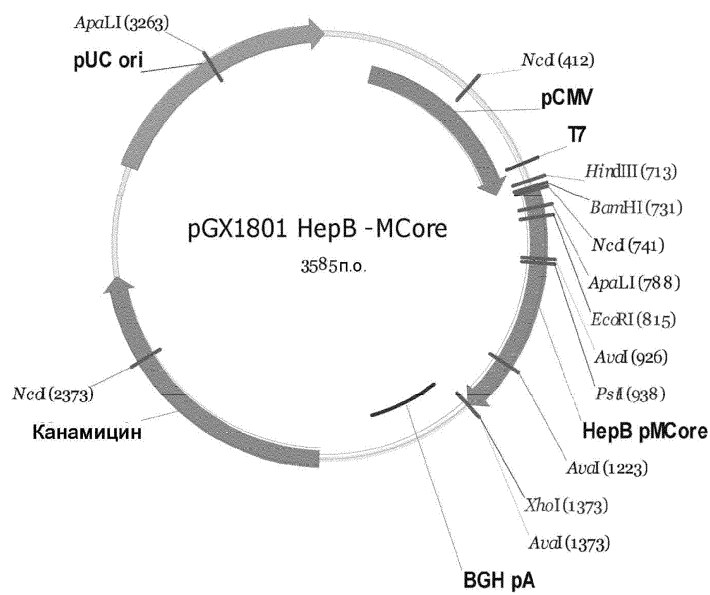
Фиг. 2



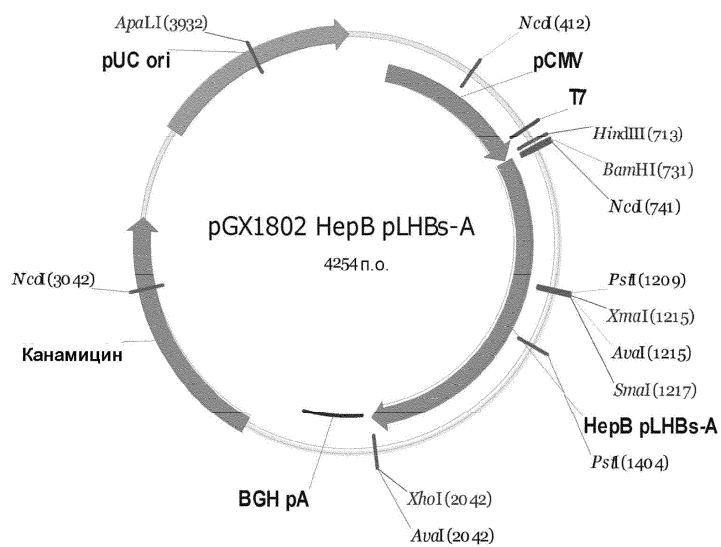
Фиг. 3



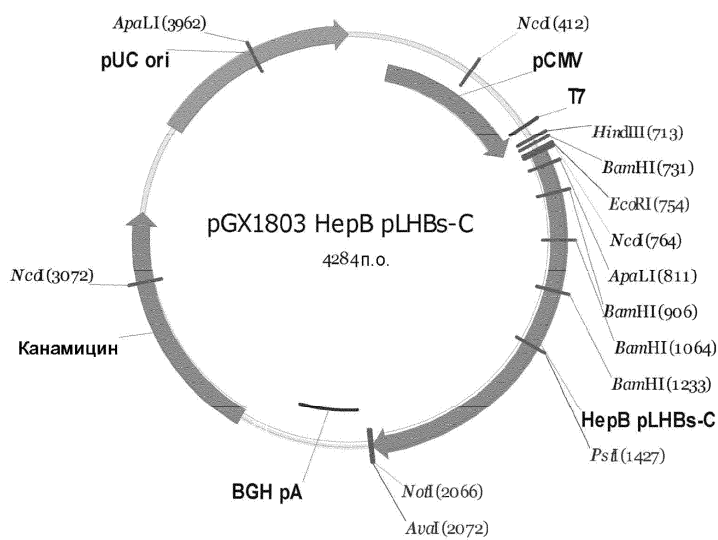
Фиг. 4



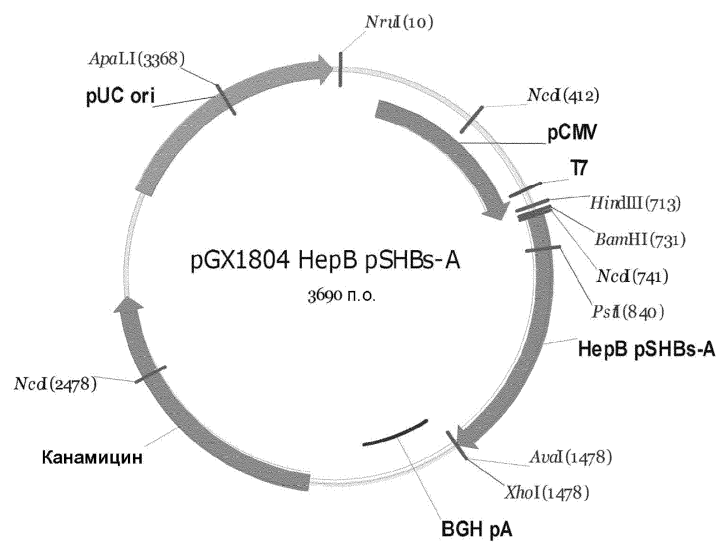
Фиг. 5



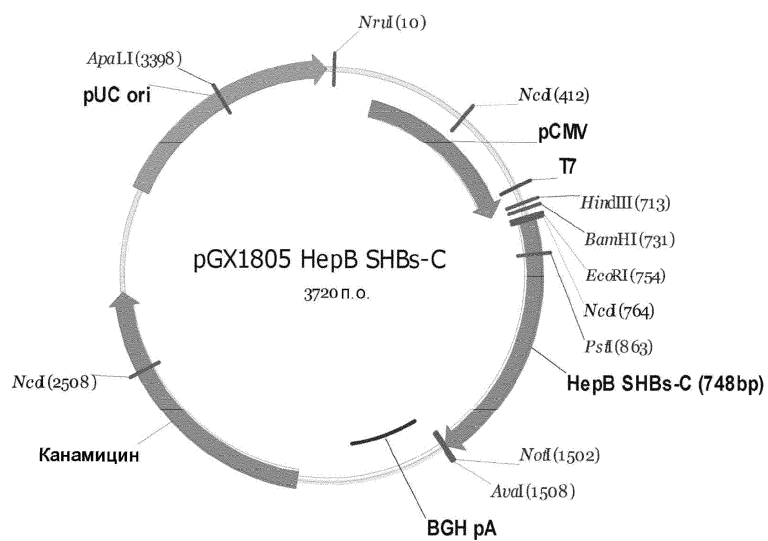
Фиг. 6



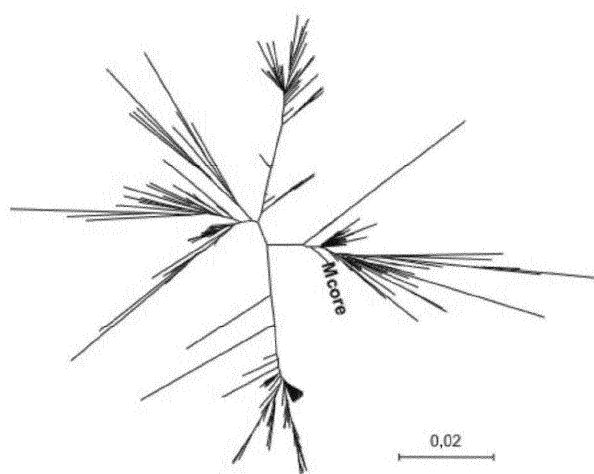
Фиг. 7



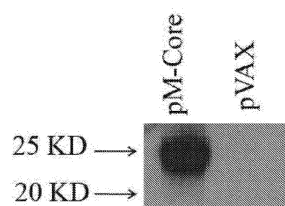
Фиг. 8



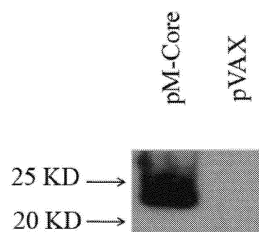
Фиг. 9



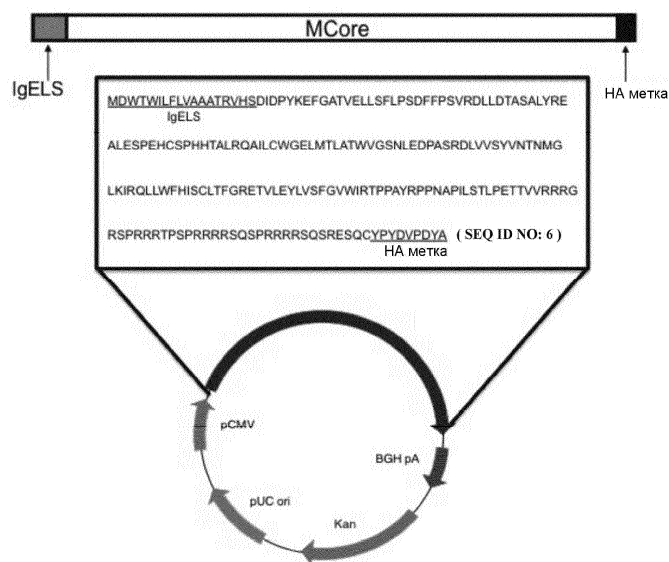
Фиг. 10



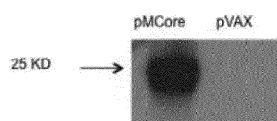
Фиг. 11А



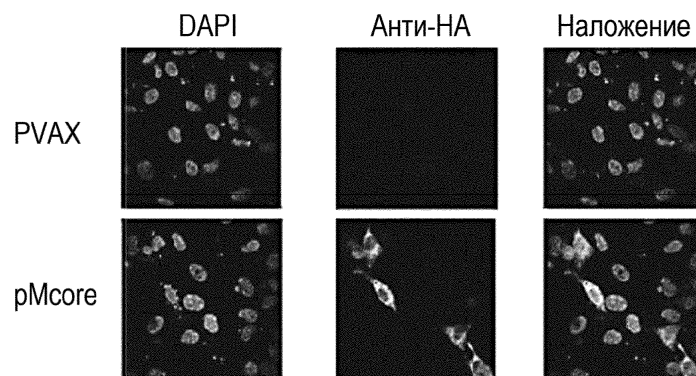
Фиг. 11В



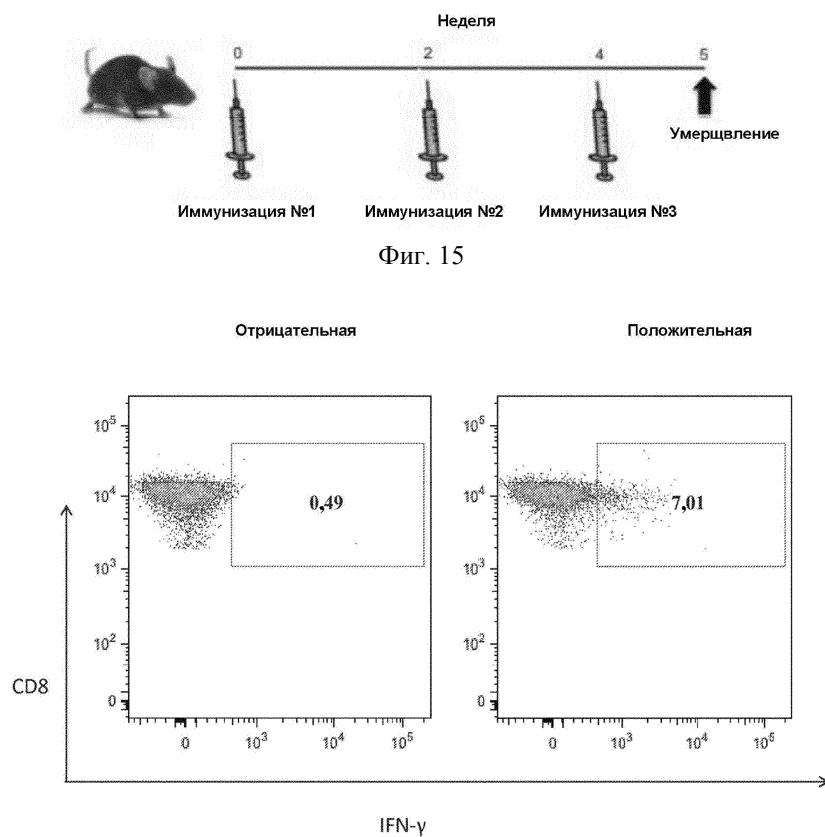
Фиг. 12



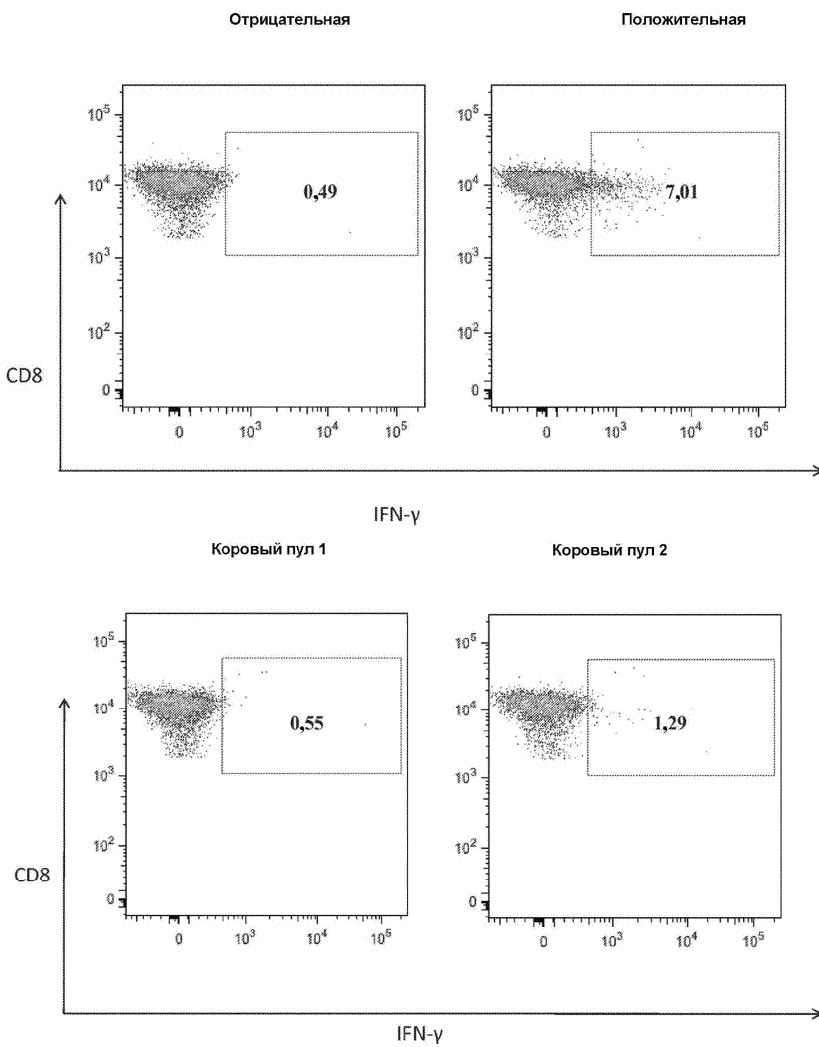
Фиг. 13



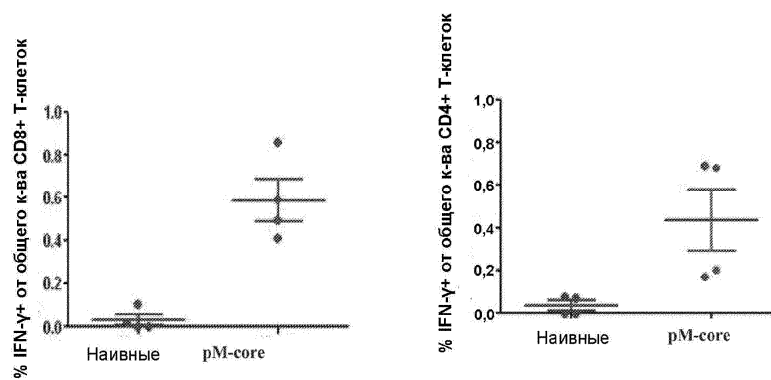
Фиг. 14



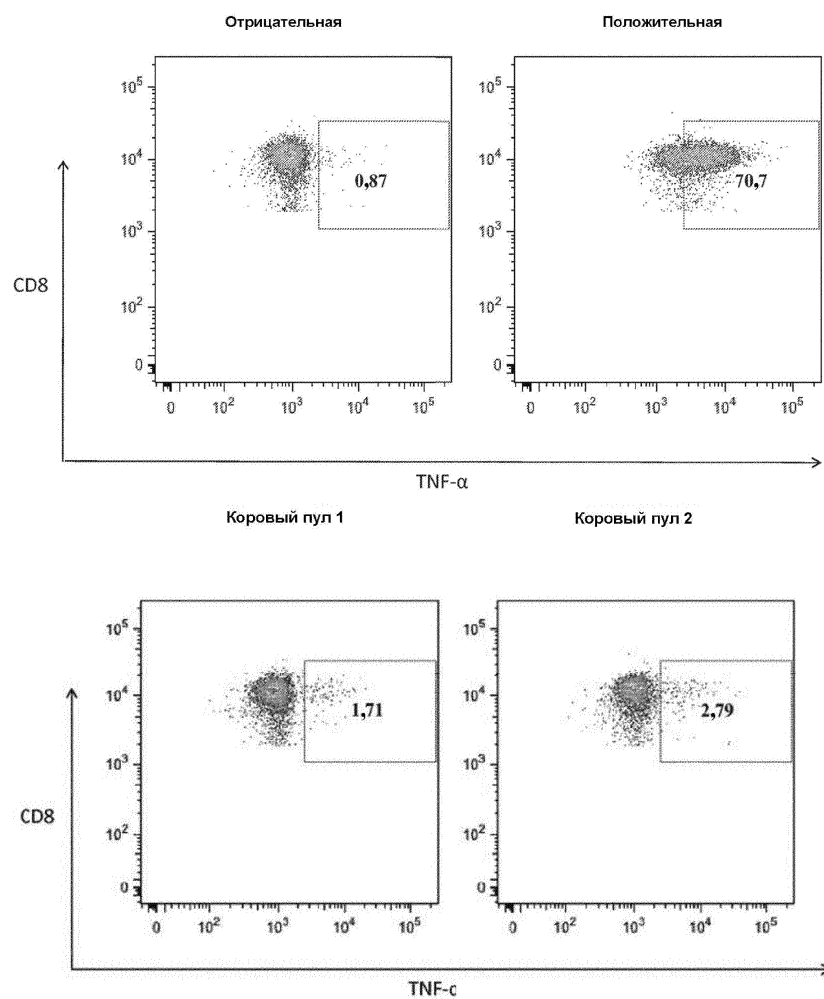
Фиг. 15



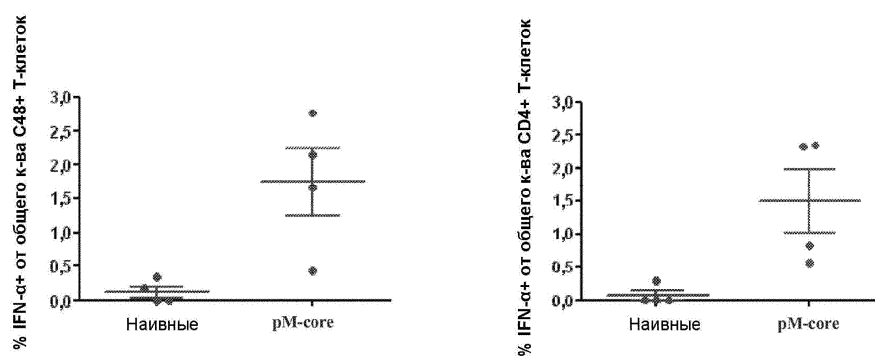
Фиг. 16



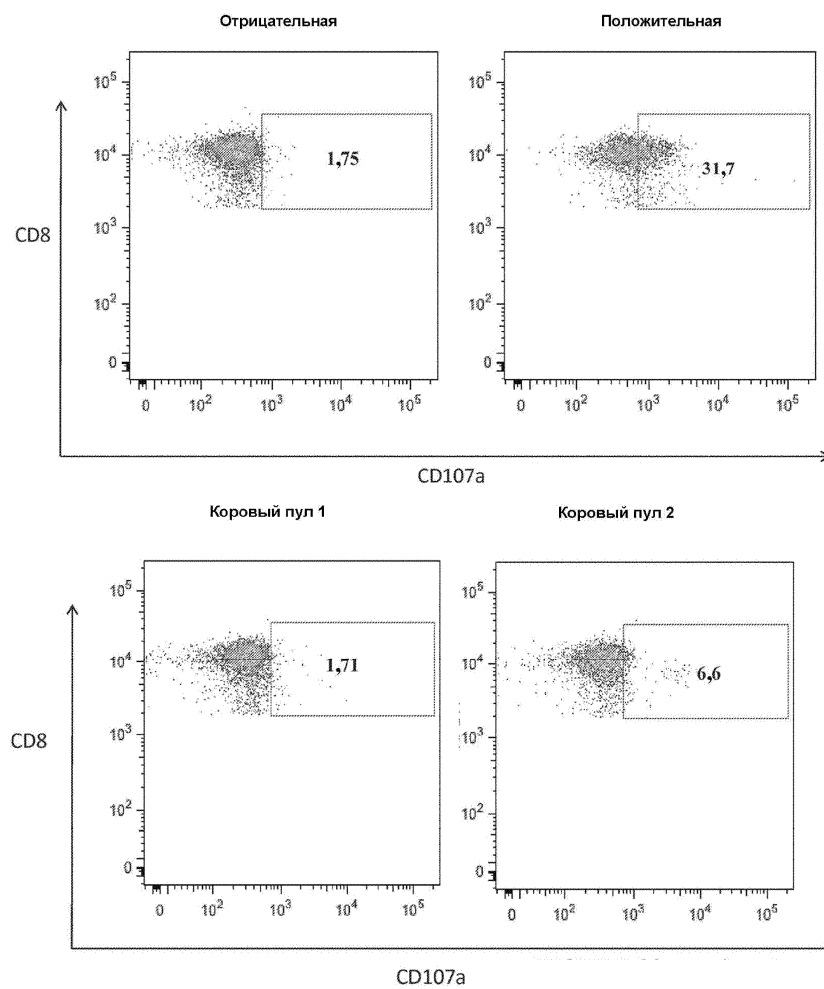
Фиг. 17



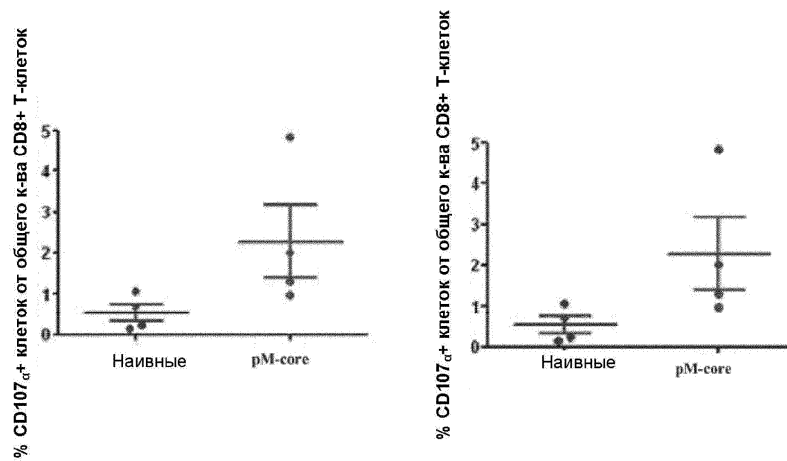
Фиг. 18



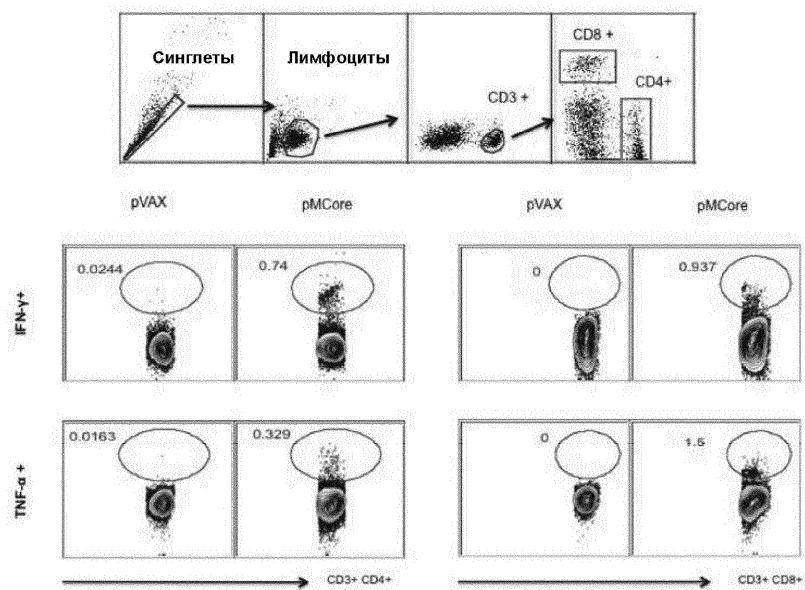
Фиг. 19



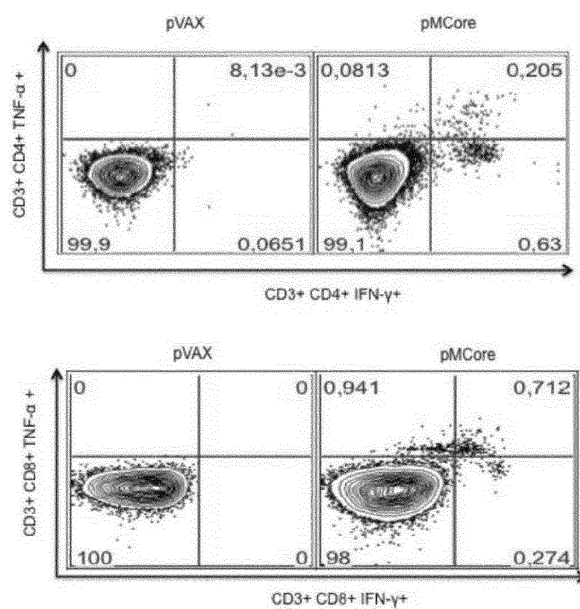
Фиг. 20



Фиг. 21

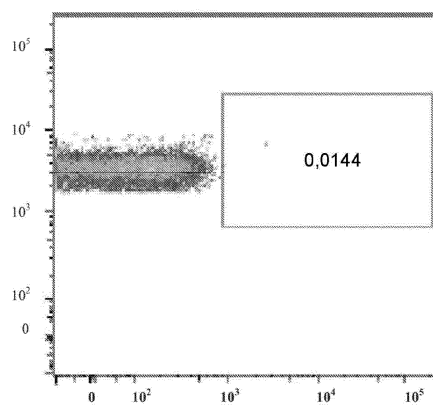


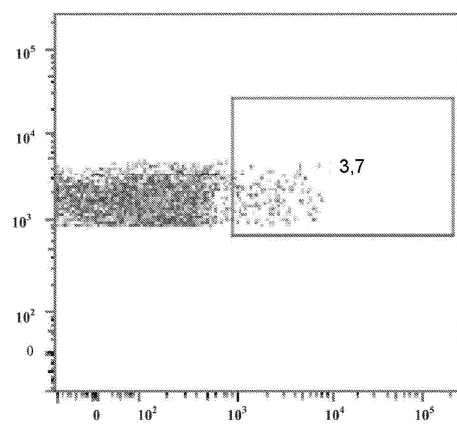
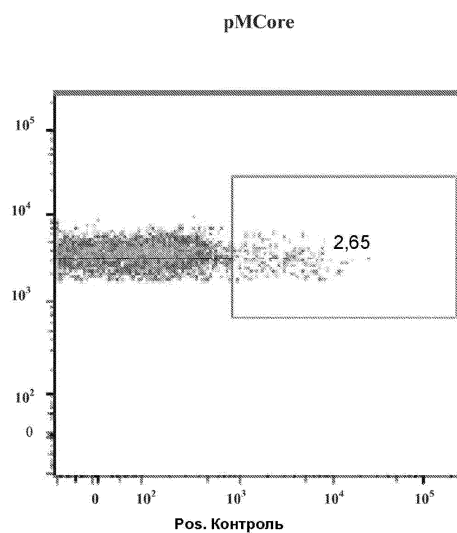
Фиг. 22



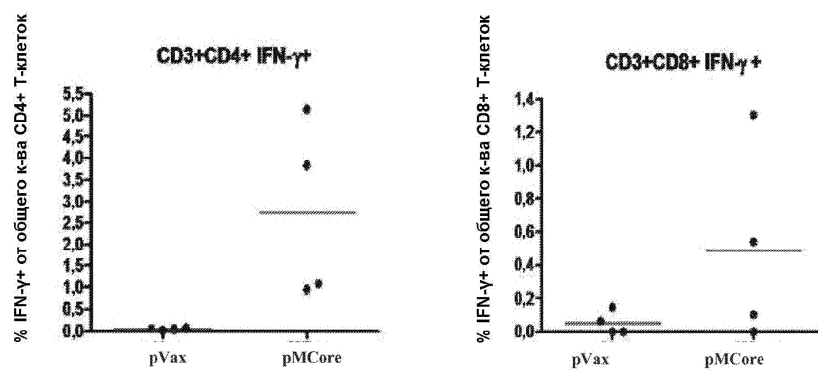
Фиг. 23

pVAX

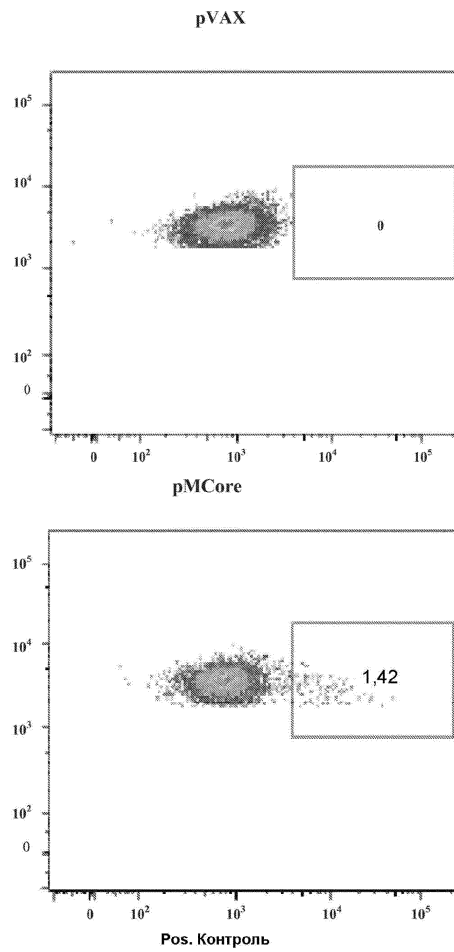




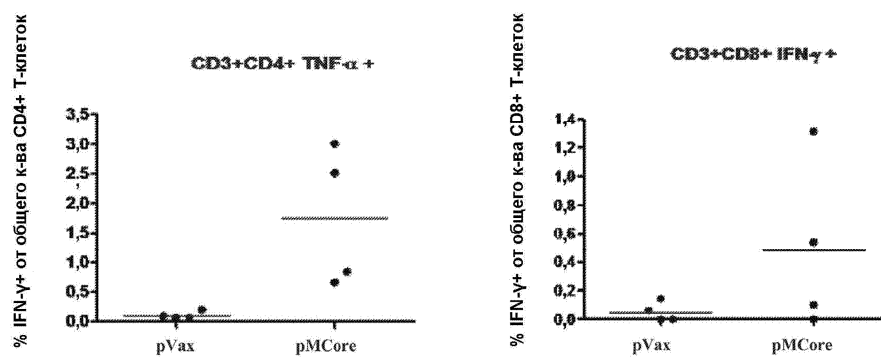
Фиг. 24



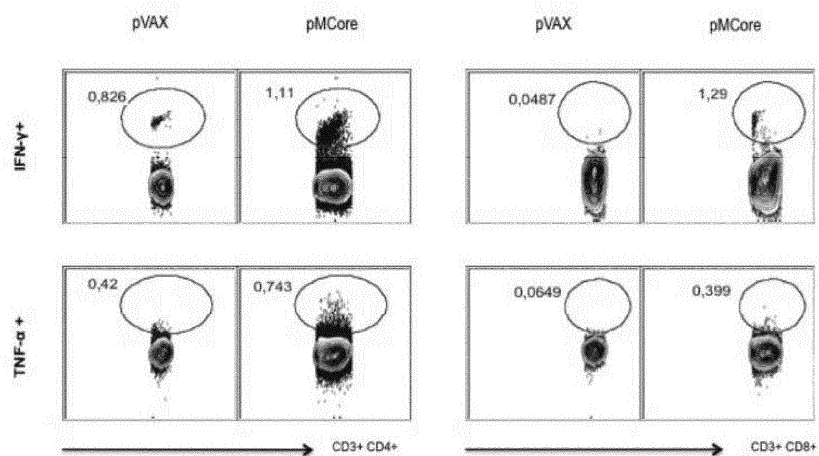
Фиг. 25



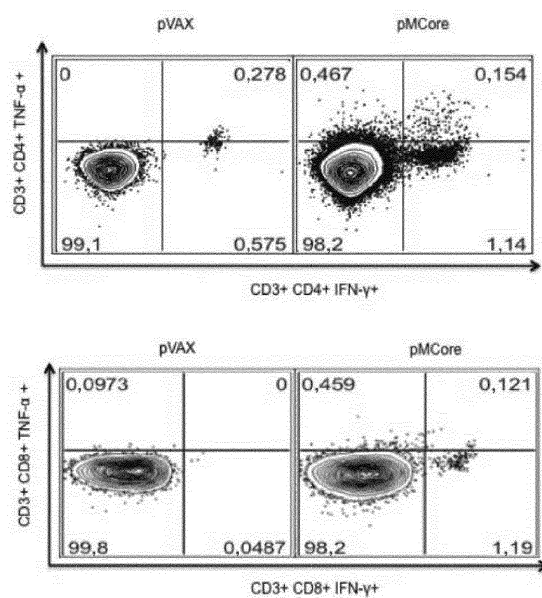
Фиг. 26



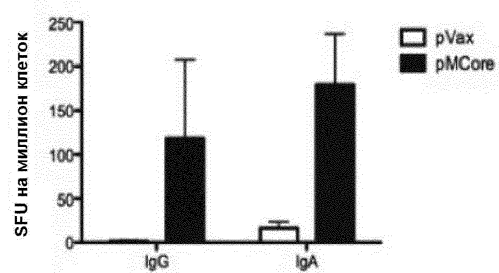
Фиг. 27



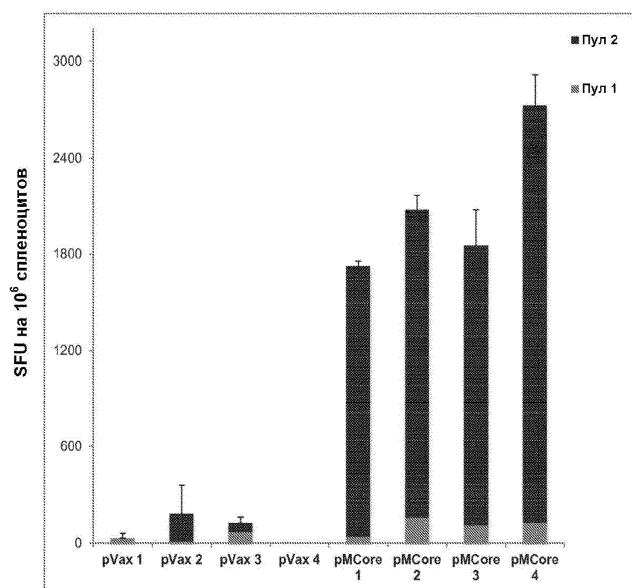
Фиг. 28



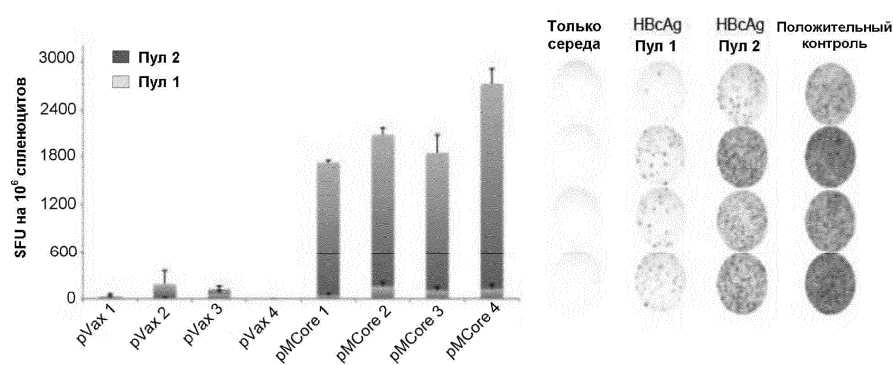
Фиг. 29



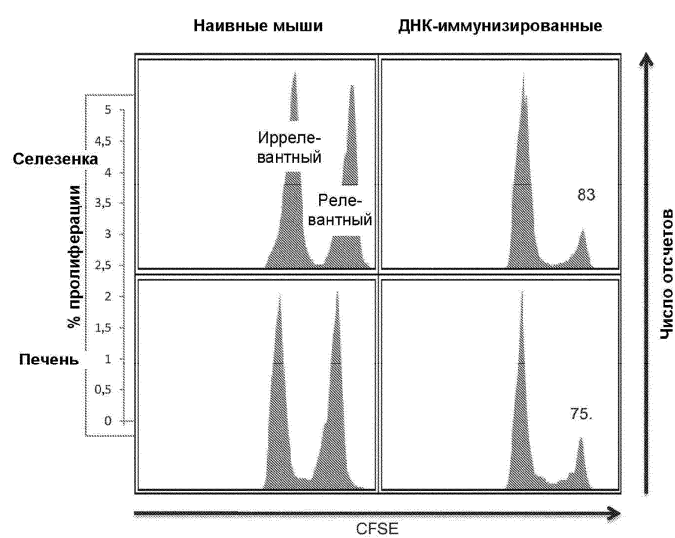
Фиг. 30



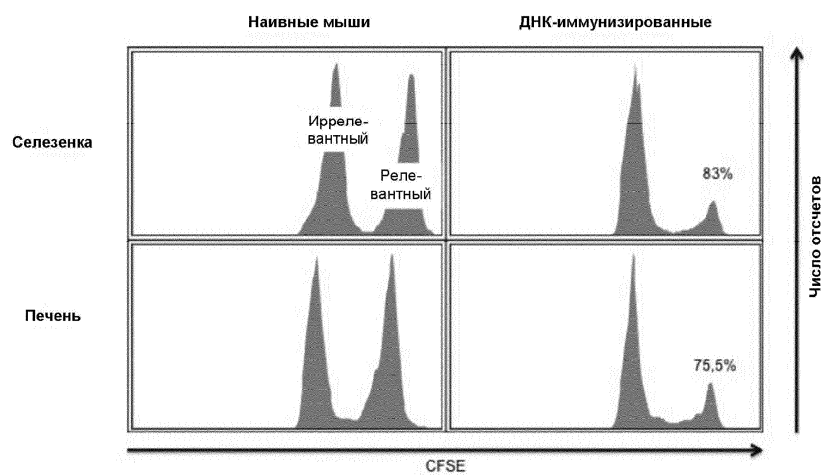
Фиг. 31



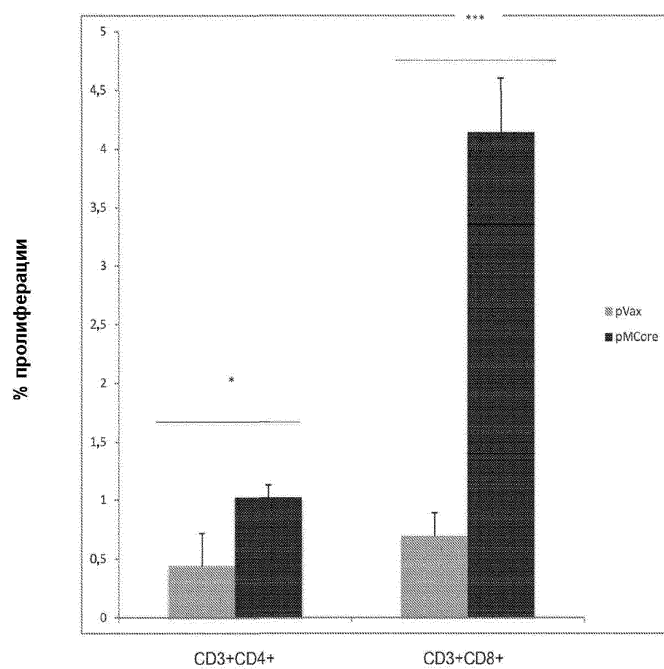
Фиг. 32



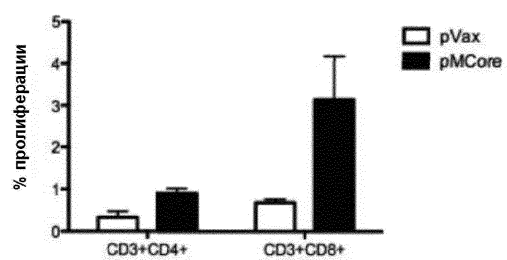
Фиг. 33



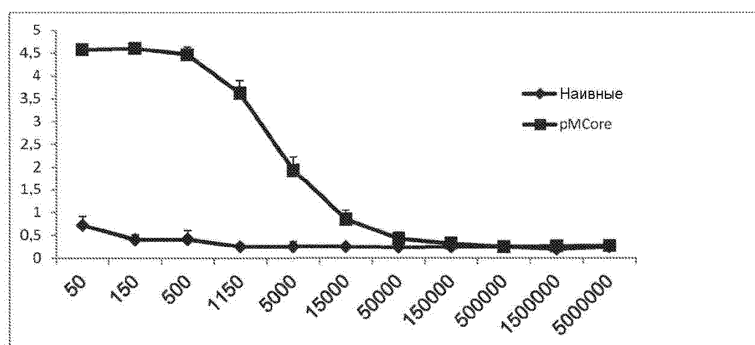
Фиг. 34



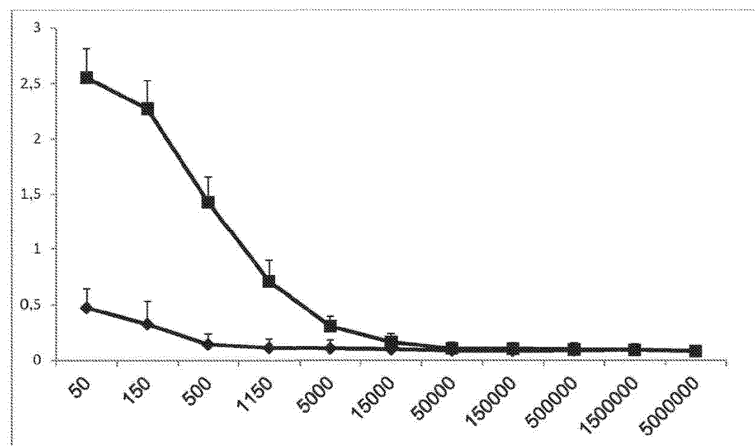
Фиг. 35



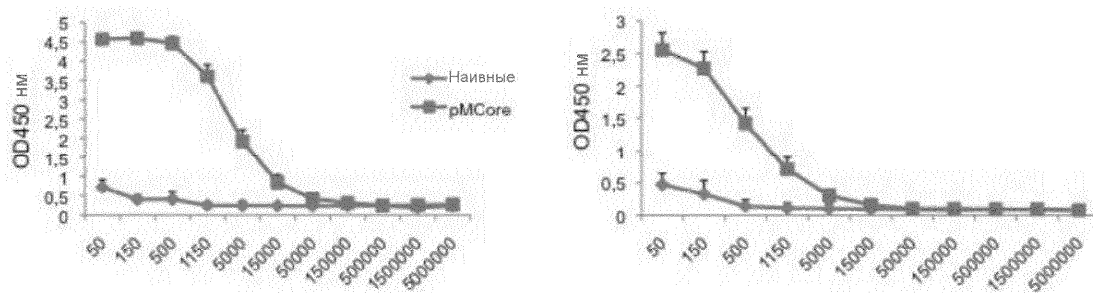
Фиг. 36



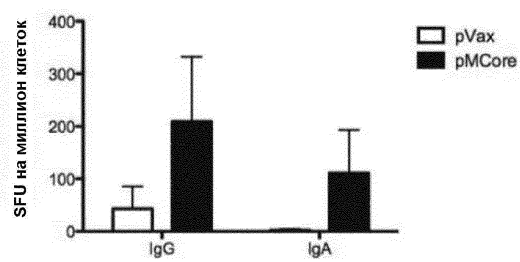
Фиг. 37А



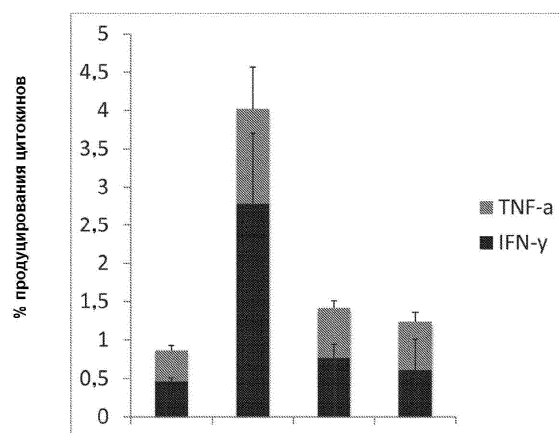
Фиг. 37В



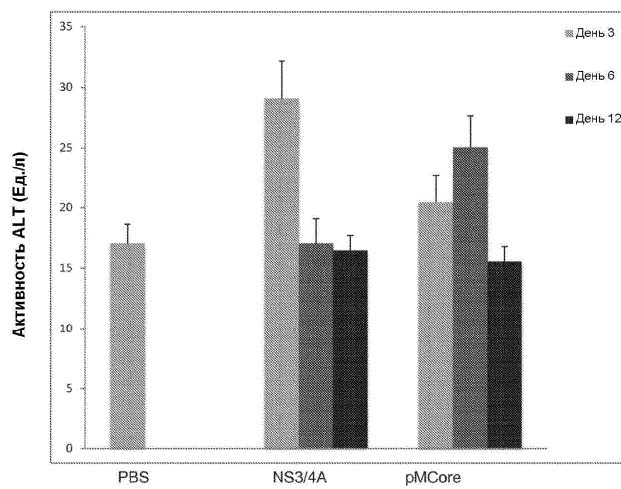
Фиг. 38



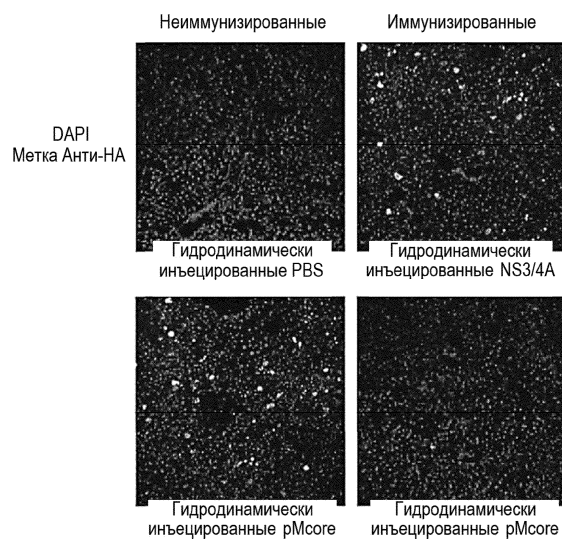
Фиг. 39



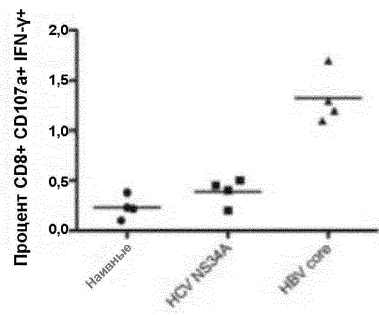
Фиг. 40



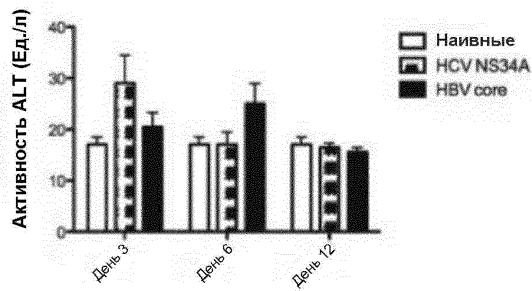
Фиг. 41



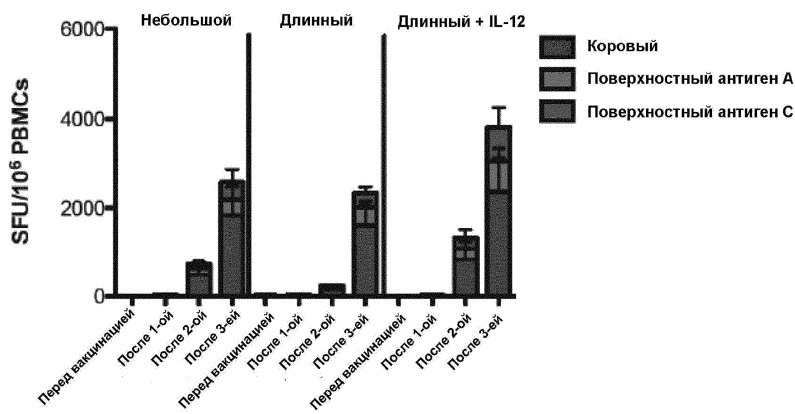
Фиг. 42



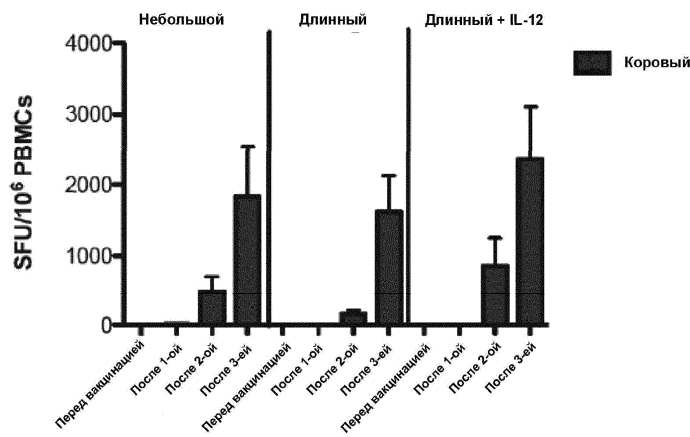
Фиг. 43



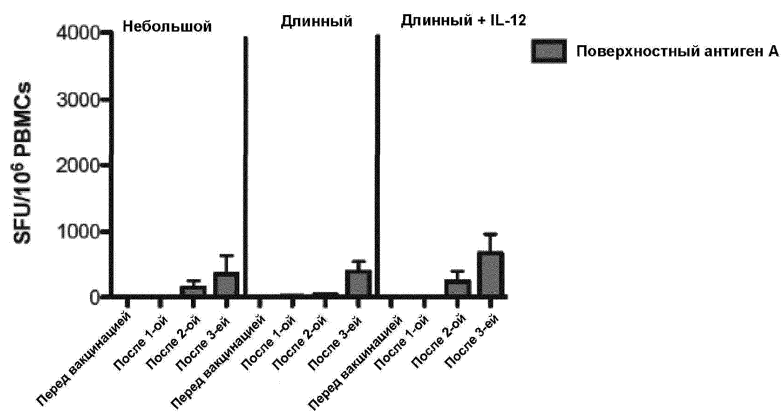
Фиг. 44



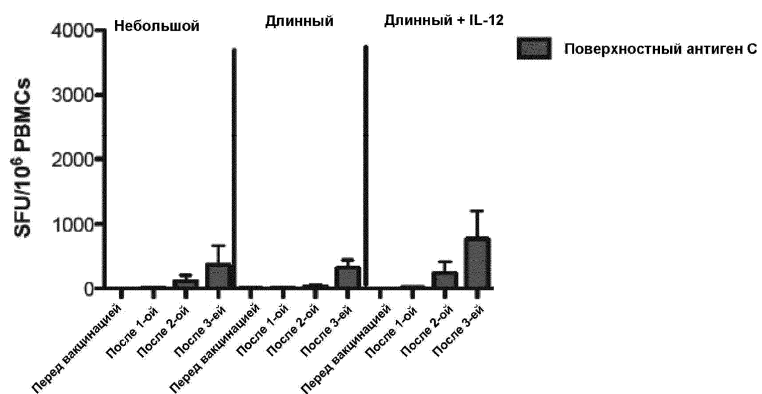
Фиг. 45



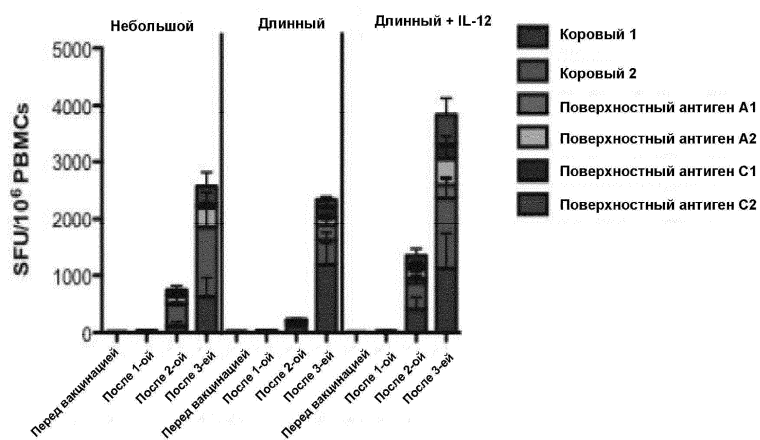
Фиг. 46



Фиг. 47

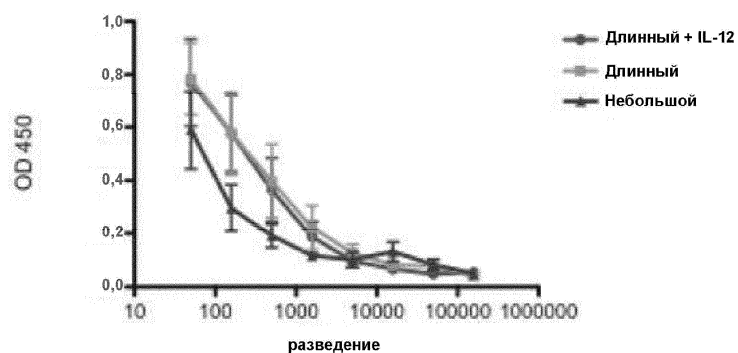


Фиг. 48

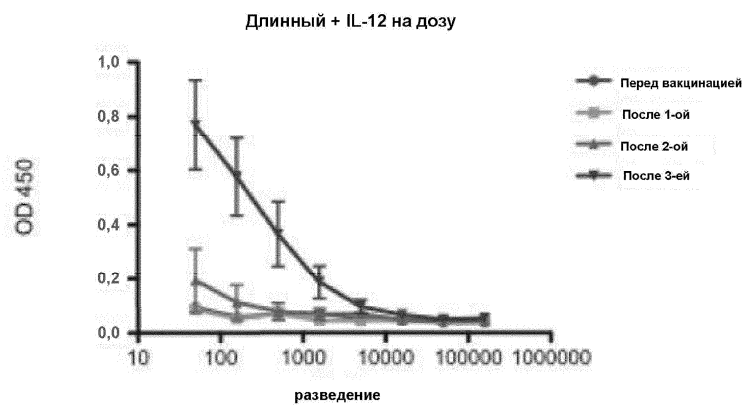


Фиг. 49

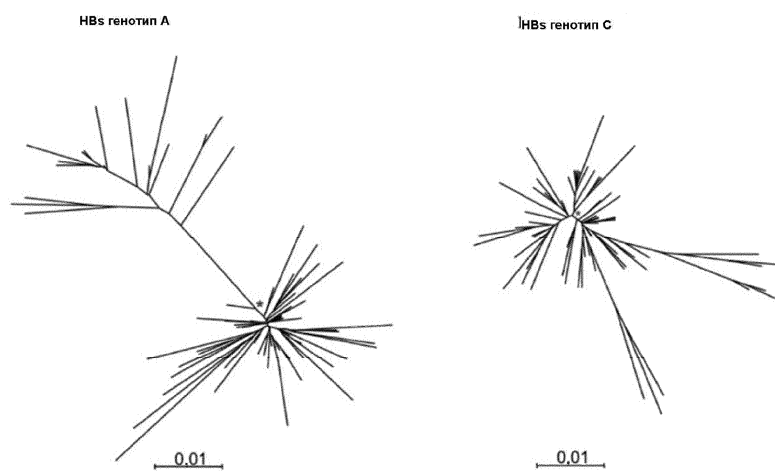
после 3-ей OD



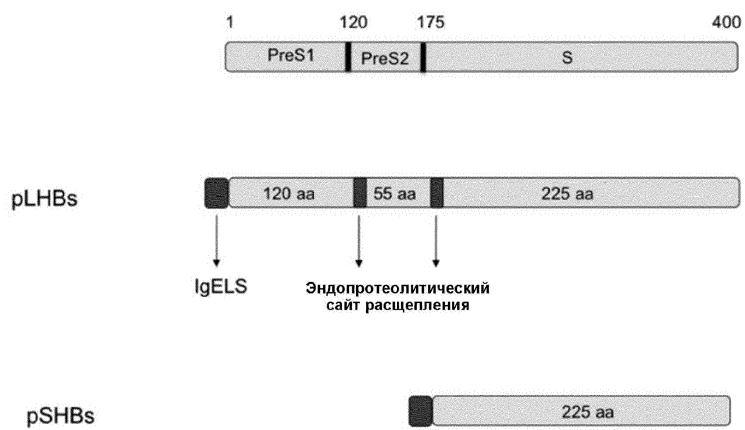
Фиг. 50



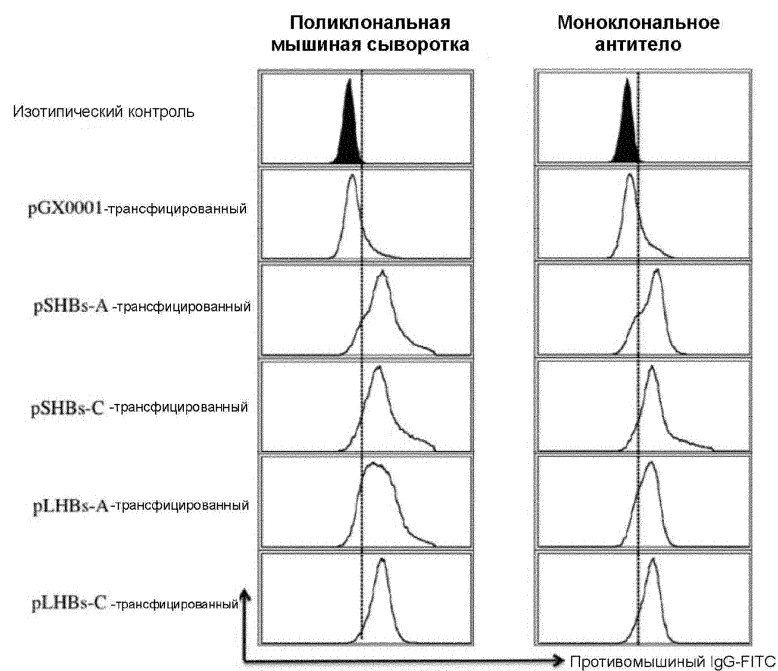
Фиг. 51



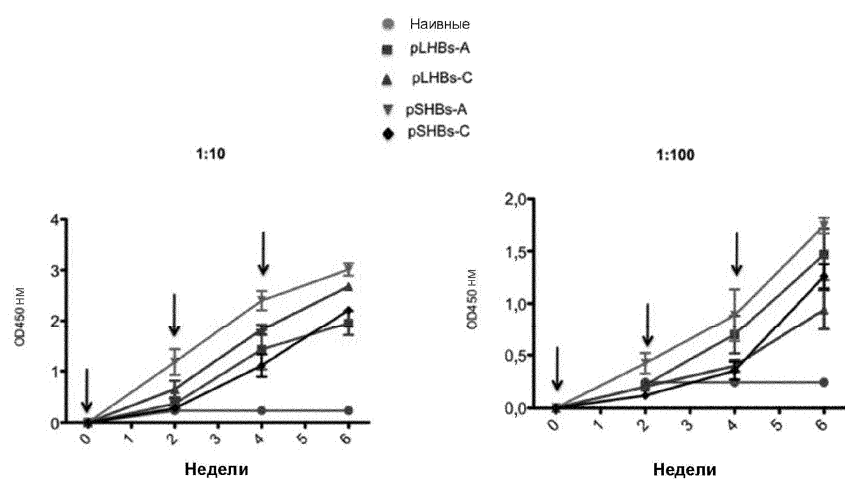
Фиг. 52А



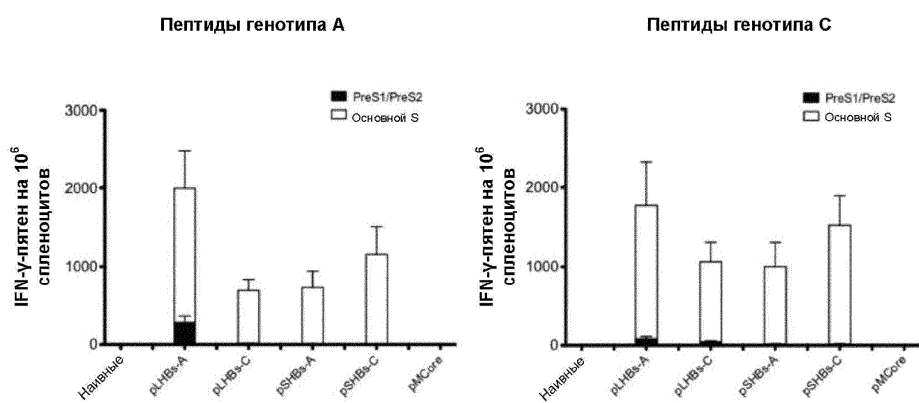
Фиг. 52В



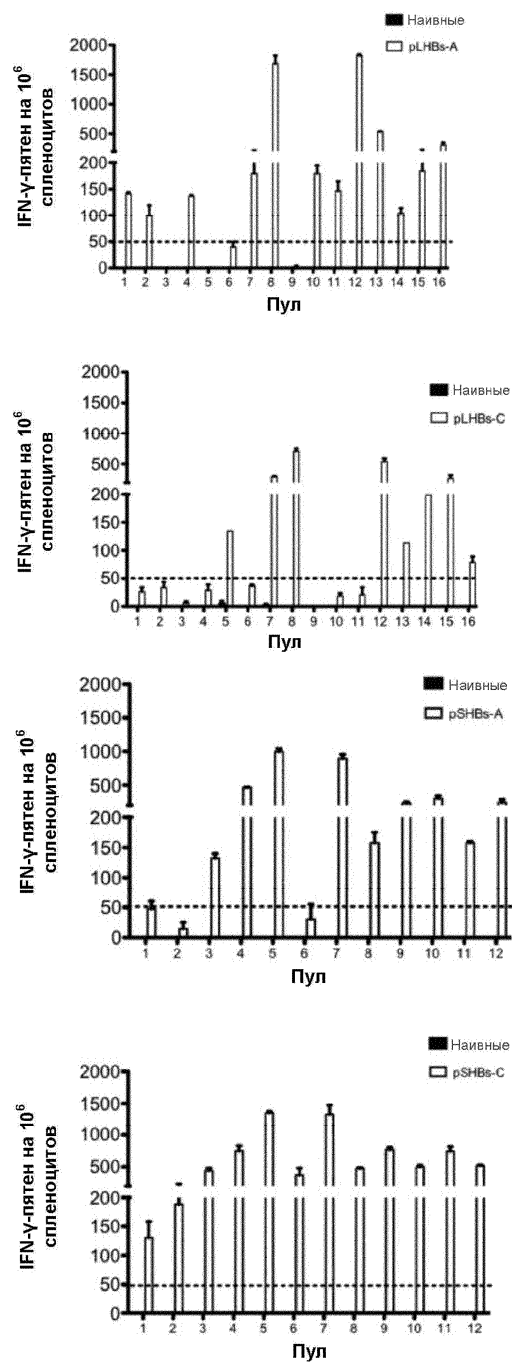
Фиг. 52С



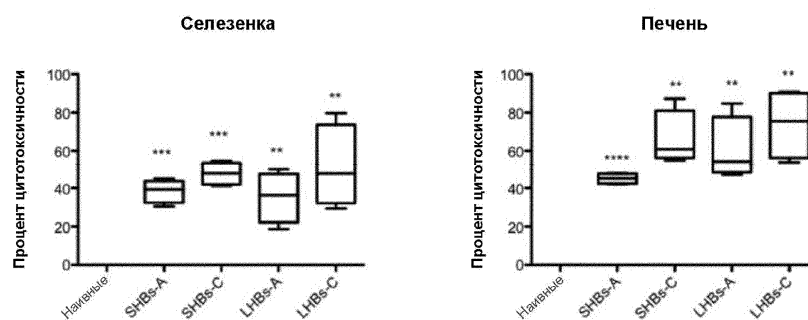
Фиг. 53А



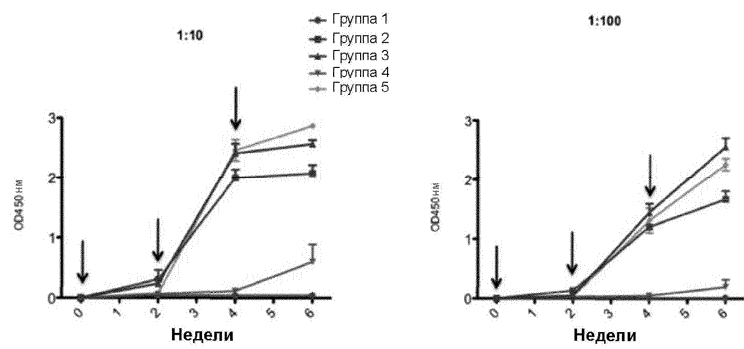
Фиг. 53В



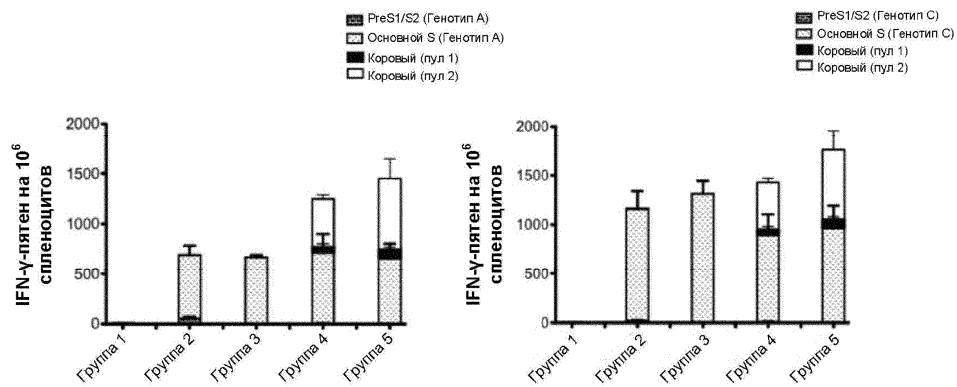
Фиг. 53С



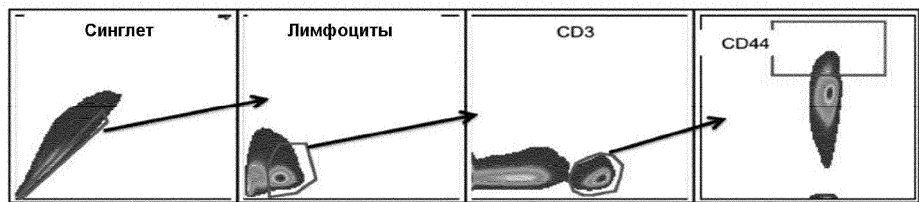
Фиг. 54



Фиг. 55А

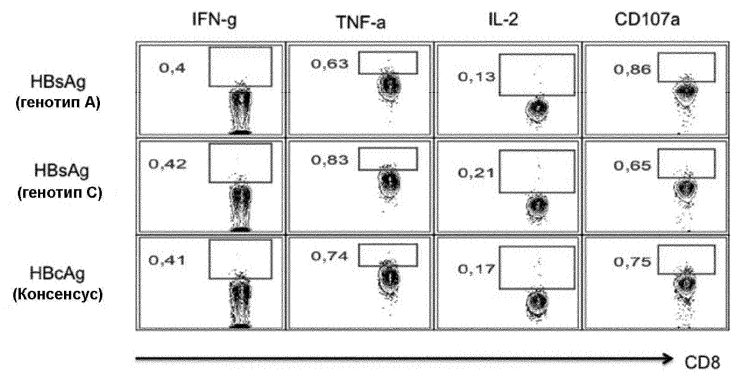


Фиг. 55В



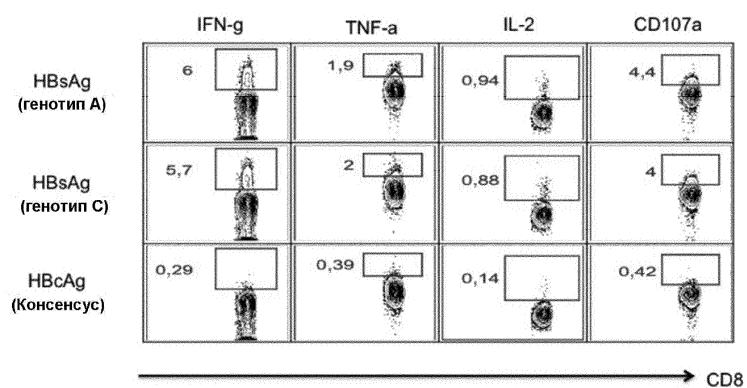
Фиг. 56А

Группа 1 – только rGX0001



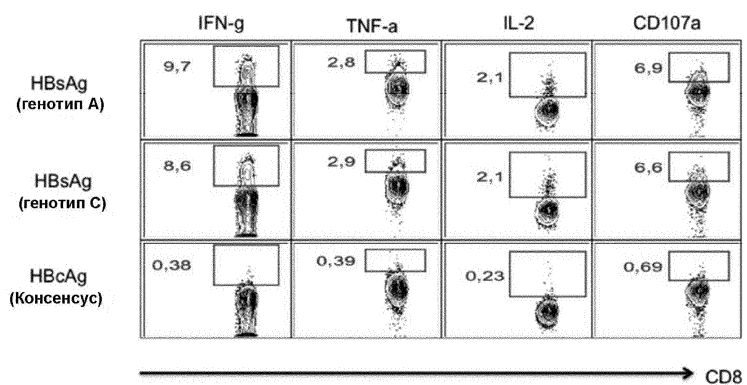
Фиг. 56В

Группа 2 – pLHBs-A / pLHBs-C



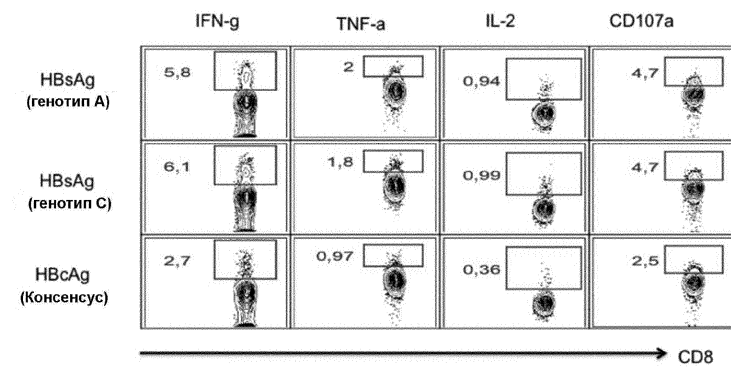
Фиг. 56C

Группа 3 – pSHBs-A / pSHBs-C



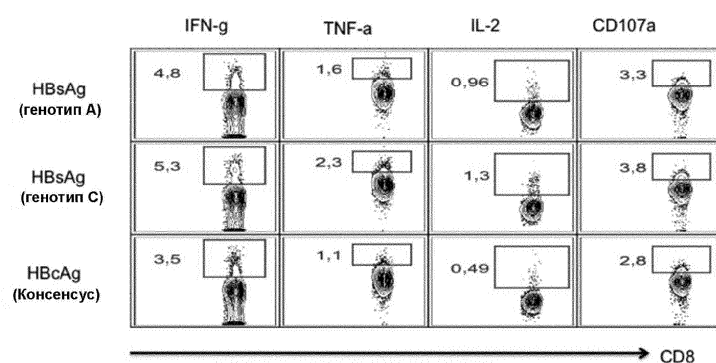
Фиг. 56D

Группа 4 – pLHBs-A / pLHBs-C / pMCore

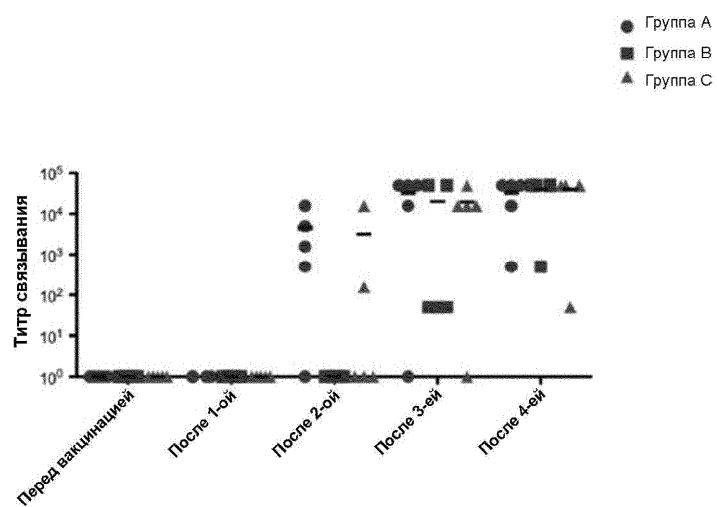


Фиг. 56E

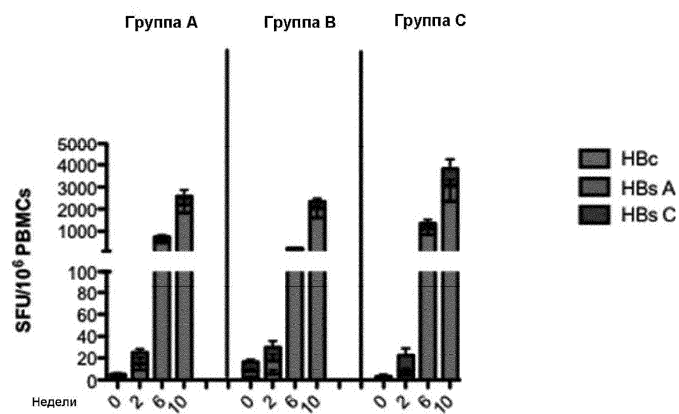
Группа 5 – pSHBs-A / pSHBs-C / pMCore



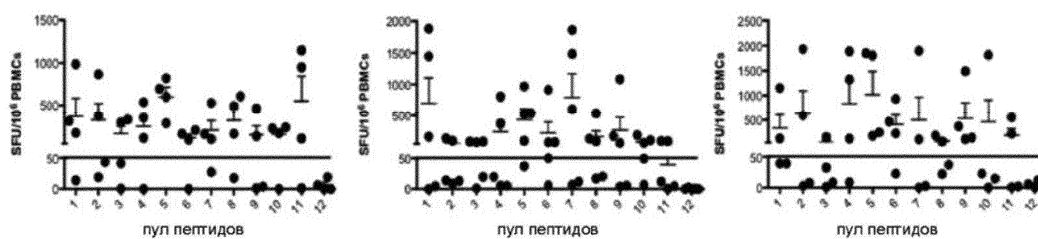
Фиг. 56F



Фиг. 57А

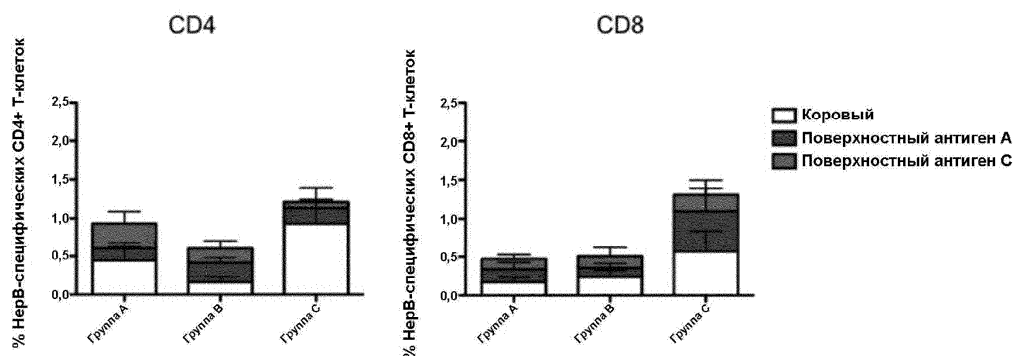


Фиг. 57В

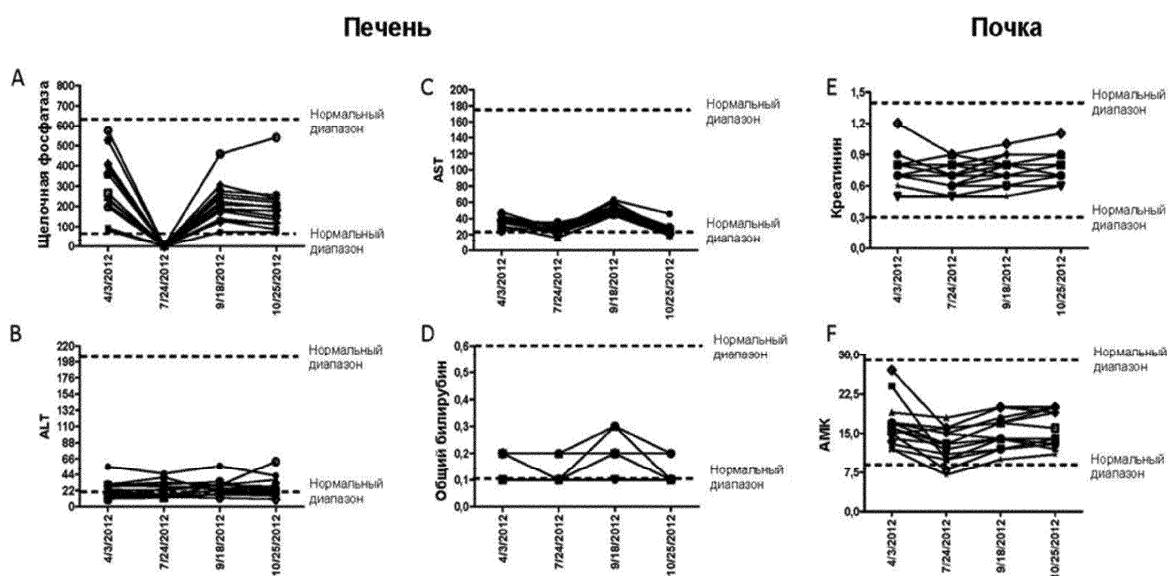


Группа	ID обезьяны	Положительные матричные пулы	Положительные пептидные эпитопы
Группа А	4634	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	30
	5022	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	16
	4943	1, 2, 5, 6, 7, 8, 11	12
	4942	1, 2, 4, 5, 10, 11	10
	4954	2, 5, 10	2
Группа В	4628	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	20
	5018	1, 2, 3, 7,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

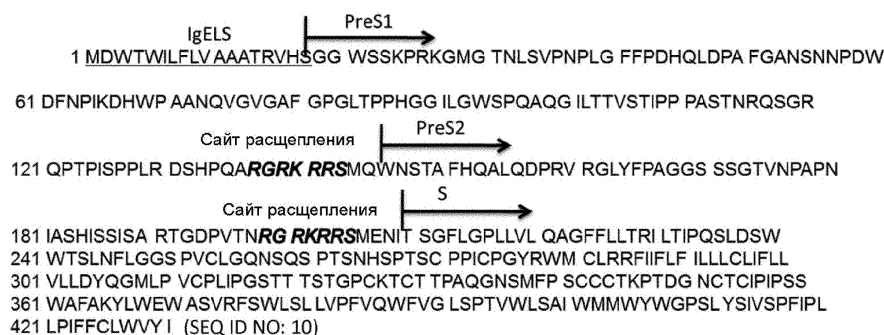
Фиг. 57С



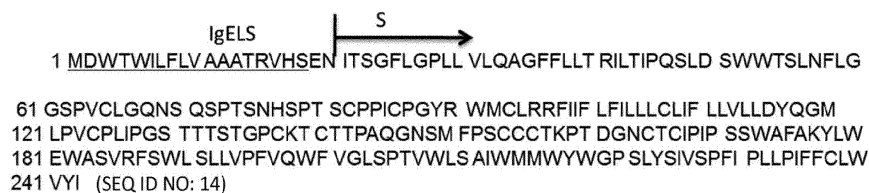
Фиг. 57D



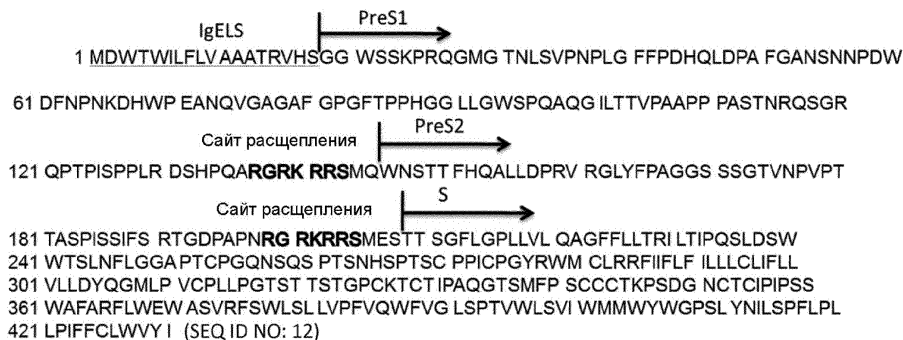
Фиг. 58



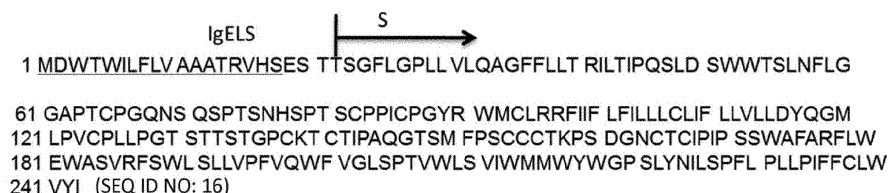
Фиг. 59А



Фиг. 59В



Фиг. 59С



Фиг. 59D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2