

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037377**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.22**

(51) Int. Cl. **A61K 39/29 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201892795**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.02.13**

---

(54) **ВАКЦИНА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА HBV**

---

(31) **61/442,162**

(56) US-A1-20030099668  
US-A1-20090214593  
US-A1-20050129712

(32) **2011.02.11**

(33) **US**

(43) **2019.05.31**

(62) **201391160; 2012.02.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В данном патенте предложены нуклеотидные последовательности, которые кодируют новую консенсусную аминокислотную последовательность корового белка вируса гепатита В (HBV), а также генетические конструкции(векторы) и вакцины, которые экспрессируют указанные белковые последовательности. Также предложены способы индукции иммунного ответа на HBV с использованием предложенных нуклеотидных последовательностей.

**B1**

**037377**

**037377**

**B1**

### Область техники

В настоящем изобретении предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие оровые белки вируса гепатита В (HBV), и их фрагменты; коровые белки вируса гепатита В (HBV) и их фрагменты, усовершенствованные вакцины против HBV, усовершенствованные способы индуцирования иммунных ответов на HBV и усовершенствованные способы профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидуумов против HBV.

### Предпосылки создания изобретения

Эта заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/442,162, поданной 11 февраля 2011 г., которая включена в данное описание путем ссылки.

Гепатит В является широко распространенной во всем мире инфекцией, которая приводит к развитию цирроза, печеночной недостаточности и гепатоклеточной карциноме. Из-за бессимптомной природы заболевания значительное количество случаев гепатита остается незарегистрированным. Несмотря на это, каждый год сообщается об около 350 миллионах случаев хронического гепатита В, большая часть инфицированной гепатитом популяции находится в малоразвитых или развивающихся странах.

Вирус разделен на четыре основных серотипа (adr, adw, ayr, ayw), исходя из антигенных эпитопов, присутствующих в его оболочечных белках. Существует, по крайней мере, восемь генотипов (А-Н) HBV в соответствии с вариацией геномных последовательностей. Альтернативные генотипы HBV имеют установившееся географическое распределение.

Таблица 1. Географическое распределение HBV

Генотип HBV	Геноподтип HBV	Подтип HBsAg	Частота	Основное географическое распределение
А	A2	adw2	высокая	Европа, Северная Америка, Австралия
	A1	ayw1, adw2	высокая	Африка
В	B1, B2, B3	adw2	высокая	Дальний Восток
	B4	ayw1	высокая	Дальний Восток
	B2	adw3	низкая	Дальний Восток
С	C1, C2, C4	adr	высокая	Дальний Восток
	C3	adrq-	высокая	Новая Гвинея, тихоокеанский регион
	C1, C2	ayr	высокая	Дальний Восток
	C1, C3	adw2	низкая	Дальний Восток
	C4	ayw3	низкая	Дальний Восток, тихоокеанский регион
D	D1, D3, D4	adw2	высокая	Западная Азия, Восточная Европа, средиземноморский регион
	D2, D3	ayw3	высокая	
	не идентифицирован	adw3	низкая	Восточная Европа, Испания
	D2	ayw4	низкая	Восточная Европа, Испания, США
Е	-	ayw4	высокая	Африка
F	F1, F2	adw4q-	высокая	Латинская Америка, Аляска, тихоокеанский регион
	F1, F2	ayw4	низкая	Латинская Америка
Г	-	adw2	низкая	Европа, Северная Америка
Н	-	ayw4	низкая	Центральная Америка

J.Med. Virol, DOI 10.

Геном вируса гепатита В представляет собой кольцевую молекулу ДНК, которая в основном является двухцепочечной, но имеет одноцепочечный участок, выходящий из более длинной цепи. Двухцепочечный участок возникает в результате гибридизации более короткой цепи из приблизительно 3020 нуклеотидов с более длинной цепью из приблизительно 3320 нуклеотидов. Одноцепочечный участок негиб-

ридизированных нуклеотидов более длинной цепи связан с ДНК-полимеразой HBV. Геномная ДНК HBV и ДНК-полимераза HBV содержатся в нуклеокапсиде, образованном многочисленными молекулами HBV корового белка (HBsAg). Коровый белок HBV окружен молекулами поверхностного белка HBV (HBsAgs) и липидными молекулами.

Геном HBV содержит четыре открытые рамки считывания (ORF): 1) ORF, которая кодирует ДНК-полимеразу HBV, 2) ORF, которая имеет два иницирующих кодона, причем последовательность, связанная с вторым иницирующим кодоном, кодирует коровый белок, а последовательность, которая включает дополнительный вышележащий иницирующий кодон, кодирует последовательность, именуемую пре-С; 3) ORF, которая имеет три иницирующих кодона, причем один кодирует поверхностный белок (gp27), а другой включает вышележащий иницирующий кодон, который кодирует последовательность, именуемую пре-S2 (gp36), и третий, который включает дополнительный вышележащий кодон, который кодирует последовательность, именуемую пре-S1 (gp42); и 4) ORF, которая кодирует HBxAg, белок, функция которого не изучена.

Профилактические вакцины и способы лечения инфекции HBV включают инъекцию субвирусных частиц, очищенных от плазмы хронических бактерионосителей, или субвирусных частиц, полученных в виде рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных линиях эукариотических клеток. Субвирусные частицы являются вирусными белками и указанные вакцины часто называют субъединичными вакцинами. Белки HBV вводят индивидууму и они становятся мишенями для его иммунной системы. У неинфицированных индивидуумов иммунный ответ на субъединичную вакцину защищает неинфицированного индивидуума от инфекции HBV. У инфицированных индивидуумов иммунный ответ, вызванный вакциной, может иметь терапевтические эффекты.

Chisari F.V., *Am J Pathol*, 2000. 156: 1117-1132 и Pumpeus P. et al. *Intervirology* 2001. 44:98-114 раскрывают строение генома HBV. Dery P. and F. Zoulim, *Pathologie Biologie* 2010, Aug, 58(4):245 53 обсуждают диагностику и лечение вирусного гепатита В. Michel M.L. and P. Tiollais, *Pathologie Biologie* 2010, Aug, 58(4):288 95 обсуждают вакцины против гепатита В и их защитную эффективность и лечебные возможности. Публикация PCT WO 2004026899 раскрывает использование иммуногена, содержащего полипептидную последовательность с аминокислотными последовательностями HBV. Публикация заявки PCT WO 2008093976 раскрывает кодирующие HBV последовательности, белки и вакцины, включая вакцину, содержащую рекомбинантные HBV непротрансфицированные поверхностный антиген и коровый антиген HBV. Полный поверхностный антиген HBV состоит из трех типов поверхностного белка (белок L, белок M и белок S). Публикация заявки PCT WO 2009130588 раскрывает кодирующие HBV последовательности, белки и вакцины, включая нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый антиген вируса гепатита В, который представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии у человека. Публикация PCT WO 2010127115 раскрывает доставку последовательностей HBV с использованием рекомбинантных векторов.

Доступные вакцины против HBV показали некоторую эффективность, но являются дорогостоящими в производстве. Кроме того, имеются также претензии к безопасности получаемых из плазмы субъединичных вакцин. Были исследованы некоторые методы вакцинации, включая базирующиеся на рекомбинантных живых векторах, синтетических белках и ДНК-вакцинах, которые содержат оптимизированные кодоны, кодирующие последовательности белков HBV. Такие другие методы имели при этом в значительной степени изменяющуюся ограниченную эффективность. Кроме того, вследствие геномных различий некоторые вакцины против HBV показали положительную эффективность в некоторых географических районах и ограниченную эффективность в других районах.

Было изучено прямое введение нуклеотидных последовательностей для вакцинации против заболеваний животных и человека и много усилий было сфокусировано на эффективных и действенных средствах для доставки нуклеиновых кислот для получения необходимой экспрессии целевых антигенов, получаемого иммуногенного ответа и, в конечном счете, успеха этого метода.

ДНК-вакцины создают возможность для эндогенного синтеза антигенов, который индуцирует CD8+ Т-лимфоциты, рестриктированные по антигену комплекса гистосовместимости класса I, которые редко получают с субъединичными вакцинами. Кроме того, синтез антигенов, который происходит в течение длительного времени, может помочь преодолеть низкую ответную реакцию и исключить или уменьшить потребность в бустер-инъекциях. К тому же, ДНК-вакцины являются очень устойчивыми и простыми в производстве. Кроме того, более полные клеточные иммунные ответы могут быть вызваны путем объединения стратегий наподобие оптимизации кодонов, оптимизации РНК и путем добавления лидерных последовательностей иммуноглобулинов.

ДНК-вакцины являются безопасными, стабильными, легко получаемыми и хорошо переносимыми в доклинических испытаниях, указывая на отсутствие интеграции плазмид [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 вследствие того, что на эффективность вакцины не влияют предшествующие титры 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, основным препятствием для клинической адаптации ДНК-вакцин было снижение иммуногенности носителей при переходе к более крупным животным [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid ДНК vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40].

Недавние технические достижения в разработке иммуногена ДНК-вакцины, такие как оптимизация кодонов, оптимизация РНК и добавление лидерных последовательностей иммуноглобулинов, улучшили экспрессию и иммуногенность ДНК-вакцин [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by ДНК vaccination with a synthetic gpl20 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Demi, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity ДНК 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 ДНК vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mРНК amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], а также, недавно разработанная технология систем доставки плазмид, такая 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 ДНК 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 Электропорация enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A ДНК by increased local ДНК uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Метод in vivo электропорации использовался в клинических испытаниях для доставки противораковых лекарств, таких как блеомицин, и во многих доклинических исследованиях для большого количества видов животных. Кроме того, исследования показали, что использование консенсусных иммуногенов может увеличить мощность клеточной иммунной реакции по сравнению с природными антигенами [Yan, J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope ДНК 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].

Сохраняется потребность в нуклеотидных конструктах, которые кодируют антигены к HBV, и композиции, полезных для индуцирования иммунных ответов против HBV. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах против HBV, которые являются экономичными и действенными. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах, которые увеличивают уровни нейтрализующих антител и вызывают Т-клеточный компонент. Сохраняется потребность в эффективных вакцинах против HBV, включая те, которые эффективны против штаммов HBV, имеющих широкий спектр генотипов, и предпочтительно, в универсальной вакцине, которая была бы эффективна глобально.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

Один из аспектов настоящего изобретения включает вакцины, полезные для индуцирования иммунного ответа на HBV. Разработка иммунной терапевтической HBV-вакцины с широкой эффективностью против большого количества генотипов может быть обеспечена с использованием ДНК-вакцины для инфекции HBV, основанной на нацеливании универсально консервативных специфических коровых антигенов HBV. Использование консенсусных иммуногенов HBV вызывает более широкие клеточные иммунные реакции и может быть полезным для минимизации степени отличия последовательностей различных вирусных штаммов.

Предложенными в данной заявке являются белки, выбранные из группы, состоящей из: белков, содержащих SEQ ID № 2, белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 2; фрагментов SEQ ID № 2; белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 2; SEQ ID № 4, белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 4; фрагментов SEQ ID № 4; белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 4; SEQ ID № 6, белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 6; фрагментов SEQ ID № 6; и белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 6.

Также предлагаются молекулы нуклеиновых кислот, содержащие последовательности, которые кодируют одну или более из вышеупомянутых белковых молекул. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID № 1; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 1; фрагмента SEQ ID № 1; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 1; SEQ ID № 3; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 3; фрагмента SEQ ID № 3; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 3; SEQ ID № 5; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 5; фрагмента SEQ ID № 5; и нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 5.

Другие аспекты данного изобретения предлагают способы индуцирования иммунного ответа на коровый антиген одного или более генотипов HBV, включающие шаг введения индивидууму указанных молекул нуклеиновых кислот и/или композиций.

Дополнительные аспекты данного изобретения предлагают способы защиты индивидуума от инфекции HBV. Способы включают этап введения указанному индивидууму профилактически эффектив-

ного количества нуклеиновокислотных молекул, содержащих указанную нуклеотидную последовательность, или композиций; причем, нуклеотидная последовательность экспрессируется в клетках указанного индивидуума, а защитная иммунная реакция вызывается на белок, кодируемый указанной нуклеотидной последовательностью.

В некоторых аспектах данного изобретения предлагаются способы лечения индивидуума, инфицированного HBV. Способы включают шаг введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества указанных молекул нуклеиновых кислот и/или композиций.

Аспекты данного изобретения дополнительно относятся к вакцинам, содержащим белки или нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, выбранные из группы, состоящей из: белков, содержащих SEQ ID № 2, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 2; фрагментов SEQ ID № 2; белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 2; SEQ ID № 4, белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 4; фрагментов SEQ ID № 4; белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 4; SEQ ID № 6, белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 6; фрагментов SEQ ID № 6; и белков, которые на 95% гомологичны фрагменту SEQ ID № 6. Вакцины могут дополнительно содержать адьювантный белок или нуклеотидную последовательность, которая кодирует адьювантный белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения адьювантный белок представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES (хемокин, выделяемый Т-клетками при активации).

Вакцины, которые содержат нуклеиновокислотные молекулы, могут содержать нуклеиновокислотные молекулы, которые содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID № 1; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 1; фрагмента SEQ ID № 1; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 1; SEQ ID № 3; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 3; фрагмента SEQ ID № 3; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 3; SEQ ID № 5; нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична SEQ ID № 5; фрагмента SEQ ID № 5; и нуклеотидной последовательности, которая на 95% гомологична фрагменту SEQ ID № 5. Вакцина может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует адьювантный протеин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения адьювантный белок представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

#### Краткое описание фигур

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

На фиг. 2А и 2В показаны результаты экспериментов экспрессии рМ-Core.

На фиг. 3А показаны результаты *in vitro* протокола трансляции.

На фиг. 3В показаны результаты вестерн-блоттинга.

На фиг. 3А и 3В показана повышенная магнитуда секреции IFN- $\gamma$  в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках селезенки C57BL/6 мышей, вакцинированных рМ-Core.

На фиг. 4А и 4В показана повышенная магнитуда секреции TNF- $\alpha$  в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках селезенки C57BL/6 мышей, вакцинированных рМ-Core.

На фиг. 5А и 5В показана повышенная магнитуда секреции CD 107a в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках селезенки C57BL/6 мышей, вакцинированных рМ-Core.

На фиг. 6А и 6В показана реакция гамма-интерферона Т-клеток в печени C57BL/6 мышей, вакцинированных рМ-Core.

На фиг. 7А и 7В показана реакция фактора-альфа некроза опухоли Т-клеток в печени C57BL/6 мышей, вакцинированных рМ-Core.

На фиг. 8 показаны данные анализов ELISPOT.

На фиг. 9 показаны данные экспериментов с использованием клеток, меченых CFSE, для сравнения элиминации пептида, обработанного клетками-мишенями *in vivo*, с помощью CD8 Т-клеток у вакцинированных и невакцинированных животных.

На фиг. 10 показано сравнение процента пролиферации CD3+CD4<sup>+</sup> клеток и CD3+CD8<sup>+</sup> клеток, обработанных вектором рVax (контроль) или плазмидой рMCore, которая экспрессирует М-кор HBV.

На фиг. 11А и 11В показано сравнение антитела против кора HBV в серийных разведениях сыворотки животных, обработанных вектором рVax (контроль) или плазмидой рMCore, которая экспрессирует М-кор HBV.

На фиг. 12 показано процент TNF- $\alpha$  и IFN-g из CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток селезенки и печени.

На фиг. 13 показаны данные экспериментов для определения путем измерения уровней ALT в сыворотке, действует ли клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, на печень.

#### Подробное описание изобретения

##### 1. Определения.

Терминология, использованная в данной заявке, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления данного изобретения и не предназначена для его ограничения. Как использовано в данном описании и формуле изобретения, которая прилагается, форма единственного числа вклю-

чает ссылки на формы множественного числа, если из контекста четко не следует иное.

Для перечисления диапазонов числовых значений в данной заявке каждое промежуточное число, находящееся внутри диапазона, явно охватывается с такой же степенью точности. Например, для диапазона 6-9, числа 7 и 8 охватываются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0, явно охватываются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

а) Адъювант.

"Адъювант", использованный в данной заявке, обозначает любую молекулу, добавленную к вакцинам плазмидных ДНК, описанным в данной заявке, для повышения иммуногенности антигенов, кодируемых плазмидными ДНК, и кодирующих нуклеотидных последовательностей, описанных ниже.

б) Антитело.

"Антитело", использованное в данной заявке, обозначает антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или фрагменты, фрагменты или их производные, включая Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифические антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может быть антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, аффинно очищенным антителом или их смесью, которая демонстрирует достаточную специфичность связывания с целевым эпитопом, или полученной из них последовательностью.

с) Кодированная последовательность.

"Кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота", использованные в данной заявке, обозначают нуклеиновые кислоты (молекула РНК или ДНК), которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодирующая последовательность может дополнительно включать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регулирующими элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные направлять экспрессию в клетках индивидуума или млекопитающего, которому ввели нуклеиновую кислоту.

д) Комплемент.

"Комплемент" или "комплементарный", использованные в данной заявке, обозначают нуклеиновую кислоту, могут означать спаривание оснований по Уотсон-Крику (например, А-Т/У и С-Г) или хугстиновское спаривание оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами нуклеиновокислотных молекул.

е) Консенсус или консенсусная последовательность "Консенсус" или "консенсусная последовательность", использованные в данной заявке, обозначают полипептидную последовательность, исходя из анализа выравнивания множественных подтипов конкретного антигена HBV. Могут быть приготовлены нуклеотидные последовательности, которые кодируют последовательность консенсусного полипептида. Вакцины, содержащие белки, которые содержат консенсусные последовательности, и/или нуклеотидные молекулы, которые кодируют такие белки, могут быть использованы для стимулирования широкого иммунитета против разных подтипов или серотипов конкретного антигена HBV.

ф) Электропорация.

"Электропорация," "электропермеабилитация" или "электрокинетическое усиление" ("EP"), использованные в данной заявке как синонимы, обозначают использование трансмембранного импульсного электрического поля для индуцирования микроскопических путей (пор) в биомембранах; их присутствие в биомембранах позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, siРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

г) Фрагмент.

"Фрагмент", как использовано в данной заявке применительно к нуклеотидным последовательностям, обозначает нуклеотидную последовательность или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с непроцессированным антигеном штамма HBV дикого типа. Фрагменты могут быть ДНК фрагментами, выбранными из по меньшей мере одной из нуклеотидных последовательностей, которые кодируют нижеизложенные фрагменты белка.

"Фрагмент" или "иммуногенный фрагмент" применительно к полипептидным последовательностям обозначает полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с непроцессированным 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 осуществления данного изобретения, фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 20 аминокислот или больше, 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 консенсусного белка.

h) Генетический конструкт.

Как использовано в данной заявке, термин "генетический конструкт" обозначает молекулы ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодирующая последовательность включает сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регулирующими элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные направлять экспрессию в клетках индивидуума, которому ввели молекулу нуклеиновой кислоты. Как использовано в данной заявке, термин "способная экспрессироваться форма" обозначает генные конструкты, которые содержат необходимые регулирующие элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок, так что в случае их присутствия в клетках индивидуума будет экспрессироваться кодирующая последовательность.

i) Идентичный.

"Идентичный" или "идентичность", как использовано в данной заявке в контексте двух или больше нуклеотидных или полипептидных последовательностей, обозначает, что последовательности имеют установленный процент остатков, которые совпадают на всем установленном участке. Процент может быть вычислен путем оптимального выравнивания этих двух последовательностей, сравнения этих двух последовательностей на всем установленном участке, определения количества позиций, на которых идентичный остаток встречается в обеих последовательностях для получения количества совместимых позиций, деления количества совместимых позиций на общее количество позиций в установленном участке и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случаях, когда две последовательности отличаются по длине или выравнивание дает один или более ступенчатых концов и установленный участок сравнения включает только единичную последовательность, остатки единичной последовательности включены в знаменатель, но не в числитель вычисления. При сравнении ДНК и РНК, тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентичность может быть подсчитана вручную или при помощи компьютерного алгоритма последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

j) Иммунный ответ.

"Иммунный ответ", использованный в данной заявке, обозначает активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение антигена, такого как консенсусный антиген HBV. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа или обоих.

k) Нуклеиновая кислота.

"Нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид" или "полинуклеотид", использованные в данной заявке, обозначают по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Описание единичной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает комплементарную цепь описанной единичной цепи. Как и данная кислота, для одной и той же цели может быть использовано много вариантов нуклеиновой кислоты. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает по сути идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементы. Единичная цепь обеспечивает зонд, который может гибридизировать с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который может гибридизировать с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который может гибридизировать в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, или могут содержать части и двухцепочечной, и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, геномной и к ДНК, РНК, или гибридом, причем нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, гипоксантин ксантина, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены с помощью химических методов синтеза или рекомбинантных методов.

l) Функционально связанный.

"Функционально связанный", использованный в данной заявке, обозначает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может располагаться у 5' конца (вышележащий) или у 3' конца (нижележащий) управляемого им гена. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как и расстояние между тем промотором и геном, которым он управляет в гене, из которого получен промотор. Как известно из уровня техники, изменение этого расстояния может быть размещено без потери функции промотора.

m) Промотор.

"Промотор", использованный в данной заявке, обозначает синтетическую молекулу или молекулу природного происхождения, способную придавать, активировать и повышать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических регулирующих транскрипцию последовательностей для способствования повышению экспрессии и/или изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии нуклеиновой кислоты. Промотор может также содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут локализовать до несколько тысяч

пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может происходить из источников, включая вирусные, бактериальные источники, грибы, растения, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально в отношении клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, или в отношении стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешний стимул, такой как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типичные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, промотор lac-оперона, 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.

n) Сигнальный пептид.

"Сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" используются в данной заявке как синонимы и обозначают аминокислотную последовательность, которая может быть присоединена к аминоконцу белка HBV, как изложено в данной заявке. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно направляют локализацию белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности используются в данной заявке, предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто откалываются от оставшейся части белка, часто относится к зрелому белку, после секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности присоединяются к N-концу белка. Как использовано в данной заявке относительно присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность замещает N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном нуклеотидной последовательности, чем кодирует белок без кодирующих последовательностей сигнального пептида. Так, например, SEQ ID № 4 является SEQ ID № 2 с сигнальным пептидом/лидерной последовательностью, присоединенной к N-концу SEQ ID № 2, то есть SEQ ID № 4 является белком, содержащим сигнальный пептид, присоединенный к N-концу SEQ ID № 2. Первый остаток в SEQ ID № 2, "Хаа", обычно является метионином, когда отсутствует сигнальный пептид. Однако, белки, которые содержат сигнальные пептиды, присоединенные к SEQ ID № 2, такие как SEQ ID № 4, замещают метиониновый остаток 1 при Хаа остатком, который связывает сигнальный пептид с белком. Таким образом, N-концевой остаток SEQ ID № 2 может быть каким угодно, но если он кодируется иницирующей последовательностью, то он является метионином. Связывание сигнального пептида/линкерной последовательности с N-концом SEQ ID № 2 обычно удаляет N-концевой метионин. Как использовано в данной заявке, предполагается, что SEQ ID № 4 содержит SEQ ID № 2 с сигнальным пептидом/лидерной последовательностью, присоединенной к N-концу SEQ ID № 2, несмотря на удаление N-концевого остатка Хаа SEQ ID № 2. Аналогичным образом, кодирующие последовательности для SEQ ID № 4 содержат кодирующие последовательности для SEQ ID № 2 с кодирующими последовательностями для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединенными к 5'-концу кодирующих последовательностей, которые кодируют SEQ ID № 2. Иницирующий кодон может представлять собой "nnn" в кодирующих последовательностях для SEQ ID № 2, но он удаляется, когда кодирующие последовательности для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединяются к 5'-концу кодирующих последовательностей, которые кодируют SEQ ID № 2. Как использовано в данной заявке, предполагается, что кодирующие последовательности для SEQ ID № 4 содержат кодирующие последовательности для SEQ ID № 2 с кодирующими последовательностями для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединенными к 5'-концу кодирующей последовательности SEQ ID № 2, где находится nnn. Так, например, предполагается, что SEQ ID № 3 содержит SEQ ID № 1 с кодирующими последовательностями для сигнального пептида/лидерной последовательности, присоединенными к 5'-концу SEQ ID № 1 вместо nnn. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения nnn представляет собой иницирующий кодон на 5'-конце SEQ ID № 1.

o) Жесткие условия гибридизации.

"Жесткие условия гибридизации", использованные в данной заявке, обозначают условия, при которых первая нуклеотидная последовательность (например, зонд) будет гибридизировать ко второй нуклеотидной последовательности (например, мишени), таких как сложная смесь нуклеиновых кислот. Жесткие условия являются последовательностно-зависимыми и будут разными в разных случаях.

Жесткие условия могут выбираться, чтобы быть приблизительно на 5-10°C ниже чем термальная точка плавления ( $T_m$ ) специфической последовательности при определенных ионной силе, pH.  $T_m$  может быть температурой (при определенных ионной силе, pH и нуклеиновой концентрации), при которой 50% зондов комплементарны для нацеленной гибридизации к последовательности-мишени в состоянии равновесия (так как последовательности-мишени находятся в избытке, то при  $T_m$  50% зондов заполняются в состоянии равновесия). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли ниже, чем приблизительно 1,0 М ионов натрия, такая как приблизительно 0,01-1,0 М концентрация ионов натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3 и температуре 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, больше чем приблизительно 50 нуклеотидов). Жесткие условия могут также достигаться добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для избирательной или

специфической гибридизации положительный сигнал может составлять по меньшей мере 2-10 случаев фоновой гибридизации. Типичные жесткие условия гибридизации включают следующее: 50% формамида, 5x SSC и 1% SDS, инкубирование при 42 °C, или, 5x SSC, 1% SDS, инкубирование при 65°C, промывание 0,2x SSC, и 0,1% SDS при 65°C.

p) По сути комплементарный.

"По сути комплементарный", использованный в данной заявке, обозначает, что первая последовательность является по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичной комплементу второй последовательности на участке 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 условия гибридизации.

q) По сути идентичный.

"По сути идентичный", использованный в данной заявке, обозначает, что первая и вторая последовательность по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны на участке 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 нуклеиновых кислот, если первая последовательность по сути комплементарна комплементу второй последовательности.

r) Подтип или серотип.

"Подтип" или "серотип": как использовано в данной заявке, взаимозаменяемы, и в отношении HBV обозначает генетические варианты HBV, так что один подтип распознается иммунной системой независимо от другого подтипа.

s) Вариант.

"Вариант", используемый в данной заявке относительно нуклеиновой кислоты, означает (i) часть или фрагмент упоминаемой нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент упоминаемой нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, по сути идентичную упоминаемой нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизирует в жестких условиях с упоминаемой нуклеиновой кислотой, ее комплементом, или последовательности, по сути идентичные ей.

"Вариант" относительно пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, по сути идентичной упоминаемому белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, то есть, замещение аминокислоты другой аминокислотой со сходными свойствами (например, гидрофильность, степень и распределение заряженных участков), признана в уровне техники как типично включающая незначительное изменение. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, частично, по индексу гидрофобности аминокислот, как понятию из уровня техники. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислот основан на рассмотрении его гидрофобности и заряда. Из уровня техники известно, что аминокислоты со сходными индексами гидрофобности могут замещаться с сохранением функции белка. В одном аспекте, замещаются аминокислоты, имеющие индекс гидрофобности  $\pm 2$ . Гидрофильность аминокислот может также быть использована для выявления замещений, которые привели бы к белкам, сохраняющим биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет вычислить максимальную локальную среднюю гидрофильность указанного пептида, полезный критерий, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4 554 101, включенный полностью в данный документ путем ссылки. Замещение аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может привести к пептидам, сохраняющим биологическую активность, например, иммуногенность, как понятию из уровня техники. Замещения могут быть осуществлены аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$ . На индекс гидрофобности и на значение гидрофильности аминокислот влияет боковая цепь указанной аминокислоты. В соответствии с такими наблюдениями, аминокислотные замещения, совместимые с биологической функцией, как подразумевают, зависят от относительного сходства аминокислот и особенно боковых цепей таких кислот, как обнаружено с помощью гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и других свойств.

t) Вектор.

"Вектор", использованный в данной заявке, обозначает нуклеотидную последовательность, содержащую источник репликации. Вектор может быть вирусным вектором, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или дрожжевой искусственной хромосомой. Вектор может быть ДНК или РНК вектором. Вектор может быть самореплицирующимся экстрахромосомальным вектором, и, предпочтительно, ДНК плазмидой.

2) Коровый антиген HBV.

Коровый белок HBV представляет важную мишень для иммуно-обусловленного клиренса вируса индуцированием 1) реакций цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), 2) реакций клеток Т-хелпера, и/или 3) реакций В-клеток, или, предпочтительно, всех вышеуказанных для перекрестного представления.

Табл. 2 демонстрирует общие черты генотипов для коровых антигенов из HBV-A, HBV-B, HBV-C, HBV-D и HBV-E генотипов с консенсусным коровым белком HBV, указанный на схеме как "HBV-M-core". Для некоторых вариантов осуществления данного изобретения М-коровый конструктор HBV был предусмотрен для повышения гомологичности для широкого ряда коровых мишеней HBV. Общие черты генотипов для корового антигена с предусмотренным М-коровым конструктором - повышение гомологичности для широкого ряда коровых мишеней HBV. Все генотипы должны быть представлены в универсальной иммунной терапевтической вакцине HBV

Таблица 2

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

Предложенными данной заявкой являются антигены, способные вызывать иммунный ответ у млекопитающего на один или более серотипов HBV. Антиген может содержать эпитопы корового белка, это делает их особенно эффективными в качестве иммуногенов, на которые могут быть вызваны анти-HBV иммунные ответы. Антиген HBV может содержать непротранслированный трансляционный продукт, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Предлагается консенсусный коровый белок HBV (SEQ ID № 2). Была получена аминокислотная последовательность, которая включала IgE-лидер на N-конце консенсусных последовательностей корового белка HBV. Таким образом, также предложен белок с IgE-лидером (SEQ ID № 7), присоединенным к консенсусному коровому белку HBV (SEQ ID № 2) для обеспечения IgE-лидер-консенсусного корового белка HBV (SEQ ID № 4). Некоторые варианты осуществления данного изобретения, как предлагается, также содержат HA-маркер (SEQ ID № 8), присоединенный к C-концу консенсусной последовательности корового белка HBV.

Соответственно, предлагается консенсусный белок корового белка HBV (SEQ ID № 6), который содержит IgE-лидер (SEQ ID № 7), присоединенный к консенсусной последовательности корового белка HBV (SEQ ID № 2) и HA-маркер (SEQ ID № 8), присоединенный к C-концу консенсусной последовательности корового белка HBV.

Белки могут быть гомологичными SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологию с последовательностями консенсусных белков данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологию с последовательностями консенсусных белков данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологию с последовательностями консенсусных белков данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологию с последовательностями консенсусных белков данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99% гомологию с последовательностями консенсусных белков данной заявки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок не имеет лидерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок не имеет IgE-лидера. Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% консенсусного белка. Предложены иммуногенные фрагменты SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6. 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

мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как IgE-лидер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагменты не содержат лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагменты не содержат лидерную последовательность IgE-лидера.

Иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6, могут быть предложены. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологию с иммуногенными фрагментами последовательностей консенсусного белка данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологию с иммуногенными фрагментами последовательностей консенсусного белка данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологию с иммуногенными фрагментами последовательностей консенсусного белка данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологию с иммуногенными фрагментами последовательностей консенсусного белка данной заявки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как IgE-лидер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагменты не содержат лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагменты не содержат лидерную последовательность IgE-лидера.

### 3. Генетические последовательности, конструкторы и плазмиды.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6, а также и гомологичный белок, иммуногенный фрагмент и иммуногенные фрагменты гомологичных белков могут быть получены обычным способом. Таким образом, могут быть предложены нуклеиновокислотные молекулы, которые кодируют иммуногенные белки, которые до 95% гомологичны с консенсусной последовательностью, до 96% гомологичны с консенсусной последовательностью, до 96% гомологичны с консенсусной последовательностью, до 97% гомологичны с консенсусной последовательностью, до 98% гомологичны с консенсусной последовательностью и до 99% гомологичны. Аналогичным образом, также предлагаются нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуногенные фрагменты, описанные в данной заявке, и иммуногенные фрагменты белка, гомологичного протеинам, описанным в данной заявке.

Были получены нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие консенсусные аминокислотные последовательности. Вакцины могут содержать одну или более нуклеотидных последовательностей, которые кодируют одну или более консенсусных версий иммуногенных белков, выбранных из этой группы последовательностей, полученных для оптимизации стабильности и экспрессии в людях. Нуклеотидная последовательность (SEQ ID № 1), кодирующая консенсусный белок корового белка HBV (SEQ ID № 2), нуклеотидная последовательность (SEQ ID № 3), кодирующая консенсусный белок IgE-лидер-корового белка HBV (SEQ ID № 4), и нуклеотидная последовательность (SEQ ID № 5), кодирующая консенсусный белок-НА-маркер IgE-лидер-корового белка HBV (SEQ ID № 6). Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к нуклеиновокислотным молекулам, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологию с нуклеотидными кодирующими последовательностями данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к нуклеиновокислотным молекулам, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологию с нуклеотидными кодирующими последовательностями данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к нуклеиновокислотным молекулам, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологию с нуклеотидными кодирующими последовательностями данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к нуклеиновокислотным молекулам, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологию с нуклеотидными кодирующими последовательностями данной заявки. Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к нуклеиновокислотным молекулам, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологию с нуклеотидными кодирующими последовательностями данной заявки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновокислотные молекулы с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данной заявке, которые гомологичны кодирующей последовательностью консенсусного белка, раскрытого в данной заявке, включают последовательности, кодирующие последовательность IgE-лидера, присоединенного к 5'-концу кодирующей последовательности, коди-

рующей последовательности гомологичных белков, раскрытых в данной заявке.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеотидная последовательность не содержит кодирующую последовательность, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеотидная последовательность не содержит кодирующую последовательность, которая кодирует IgE-лидер.

Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к фрагментам SEQ ID № 1, SEQ ID № 3 и SEQ ID № 5. Фрагменты могут представлять собой 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% SEQ ID № 1, SEQ ID № 3 и SEQ ID № 5. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97% по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны фрагментам SEQ ID № 1, SEQ ID № 3 и SEQ ID № 5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагменты включают последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновый лидер, такой как IgE-лидер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагменты не содержат кодирующие последовательности, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагменты не содержат кодирующие последовательности, которые кодируют лидерную последовательность IgE-лидера.

Предложенными в данной заявке являются генетические конструкции, которые содержат нуклеотидная последовательность, которая кодирует коровый антиген HBV, раскрытый в данной заявке, включая последовательности консенсусных белков; последовательности, гомологичные последовательностям консенсусных белков; фрагменты последовательностей консенсусных белков и последовательности, гомологичные последовательностям фрагментов консенсусных белков. Генетические конструкции могут присутствовать в клетке как функционирующая экстрахромосомальная молекула. Генетический конструкт может быть линейной минихромосомой, включая центромеры, теломеры или плазмиды, или космиды.

Генетические конструкции могут также быть частью генома рекомбинантного вирусного вектора, включая рекомбинантный аденовирус, ассоциированный вирус рекомбинантного аденовируса и рекомбинантный вирус коровьей оспы. Генетический конструкт может быть частью генетического материала в истощенных живых микроорганизмах или рекомбинантными микробными векторами, которые живут в клетках.

Генетические конструкции могут содержать регулирующие элементы для генной экспрессии кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты. Регулирующие элементы могут быть промотором, энхансером, иницирующим кодоном, терминирующим кодоном или сигналом полиаденилирования.

Нуклеотидные последовательности могут образовывать генетический конструкт, который может быть вектором. Вектор может быть способным экспрессировать антиген в клетках млекопитающего в количестве, эффективном для вызова иммунного ответа у млекопитающего. Вектор может быть рекомбинантным, вектор может содержать гетерологическую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген. Вектор может быть плазмидой. Вектор может быть полезным для трансфектирования клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген, причем трансформированная клетка-хозяин культивируется и поддерживается в условиях, при которых проходит экспрессия антигена.

Кодирующие последовательности могут быть оптимизированы для стабильности и высоких уровней экспрессии. В некоторых случаях кодоны выбирают для снижения образования вторичной структуры РНК, так как она образуется вследствие внутримолекулярного связывания.

Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, и может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может быть вышележащим от антигенкодирующей последовательности, и терминирующий кодон, который может быть нижележащим от антигенкодирующей последовательности.

Иницирующий и терминирующий кодон могут быть в рамке с антигенкодирующей последовательностью. Вектор может также содержать промотор, который функционально связан с антигенкодирующей последовательностью. Промотор, функционально связанный с антигенкодирующей последовательностью, может быть промотором эфиопского вируса 40 (SV40), промотором вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотором вируса иммунодефицита человека (HIV), таким как промотор длинного концевой повтора (LTR-последовательности) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза (ALV), цитомегаловирусным промотором (CMV), таким как непосредственно ранний промотор CMV, промотор вируса Эпштейн-Бара (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может быть промотором человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин, человеческий металлотионин. Промотор может также быть тканеспецифическим промотором, таким как мышечно или кожноспецифическим промотором, природным или синтетическим. При-

меры таких промоторов описаны в патентной заявке США, номер публикации US 20040175727, содержание которой включено в данную заявку полностью.

Вектор может также содержать сигнал полиаденилирования, который может быть вышележащим от кодирующей последовательности корового белка HBV. Сигнал полиаденилирования может быть сигналом полиаденилирования SV40, сигналом полиаденилирования LTR, сигналом полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигналом полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигналом полиаденилирования человеческого  $\beta$ -глобулина. Сигнал полиаденилирования SV40 может быть сигналом полиаденилирования вектора pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

Вектор может также содержать вышележащий энхансер кодирующей последовательности консенсусного корового белка HBV. Энхансер может быть необходимым для экспрессии ДНК. Энхансер может быть человеческим актином, человеческим миозином, человеческим гемоглобином, человеческим мышечным креатином или вирусным энхансером, таким как из CMV, HA, RSV или EBV. Энхансеры полинуклеотидной функции описаны в патентах США №№ 5 593 972, 5 962 428, и WO 94/016737, содержание которых полностью включено путем ссылки.

Вектор может также содержать источник репликации из млекопитающего, чтобы поддержать вектор экстахромосомально и продуцировать многократные копии вектора в клетке. Вектор может быть pVAX1, pCEP4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), который может содержать источник репликации из вируса Эпштейн-Бара и кодирующий участок ядерного антигена EBNA-1, который может продуцировать многокопийную эписомальную репликацию без интеграции. Вектор может быть вариантом pVAX1 или pVax1 с изменениями, такими как вариантная плаزمиды, описанная в данной заявке. Вариантная плаزمиды pVax1 представляет собой вариант из 2998 пар оснований остова векторной плазмиды pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad CA). Промотор CMV расположен у оснований 137-724. Промотор T7/затравочный сайт находится у оснований 664-683. Различные клонирующие сайты находятся у оснований 696-811. Сигнал полиаденилирования гормона роста большого рогатого скота находится у оснований 829-1053. Ген резистентности к канамицину находится у оснований 1226-2020. Источник pUC находится у оснований 2320-2993.

Исходя из последовательности pVAX1, доступной от Invitrogen, следующие мутации были найдены в последовательности pVAX1, которая была использована как остов для плазмид 1-6, описанных в данной заявке:

C>G 241 в промоторе CMV;

C>T 1942 остова, справа, ниже сигнала полиаденилирования гормона роста большого рогатого скота (bGHpolyA);

A> - 2876 остова, справа, ниже гена канамицина;

C>T 3277 многокопийная мутация в источнике репликации (Ori) pUC (см. Nucleic Acid Research 1985);

G>C 3753 в самом конце Ori pUC, слева, выше сайта PPKSeH.

Пары оснований 2, 3 и 4 изменены от ACT до CTG в остове, слева, выше промотора CMV.

Остовом вектора может быть pAV0242. Вектор может быть вектором типа 5 дефективного по репликации аденовируса (Ad5).

Вектор может также содержать регулируемую последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии гена в клетках млекопитающего или человека, в которые введен вектор. Консенсусная кодирующая последовательность HBV может содержать кодон, который может позволить более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

Вектор может быть pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif), который может быть использован для продуцирования белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Вектор может также быть pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif), который может быть использован для продуцирования белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вектор может также быть MAXBAC™, полностью бакуловирусной системой экспрессии (Invitrogen, San Diego, Calif), который может быть использован для продуцирования белка в клетках насекомого. Вектор также может быть pсДНК I или pсДНК3 (Invitrogen, San Diego, Calif), который может быть использован для продуцирования белка в клетках млекопитающего, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO). Вектор может быть векторами экспрессии или системами для продуцирования белка с помощью стандартных методов и легкодоступных стартовых материалов, включая Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989), которые включены полностью путем ссылки.

#### 4. Фармацевтические композиции.

Предусмотренными в данной заявке являются фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат 10 мг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат от между: 1) по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 нанограмм, или 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, или 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 2) до и включая 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 от 100 наногрaмм, или 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, или 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 и 10 мг. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат от приблизительно 5 нг до приблизительно 10 мг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат от приблизительно 5 нг до приблизительно 10 мг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат от приблизительно 25 нг до приблизительно 5 мг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 50 нг до приблизительно 1 мг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1 до приблизительно 350 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 5 до приблизительно 250 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 10 до приблизительно 200 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 15 до приблизительно 150 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 20 до приблизительно 100 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 до приблизительно 75 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 30 до приблизительно 50 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 35 до приблизительно 40 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 20 мкг до приблизительно 80 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 мкг до приблизительно 60 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 30 нг до приблизительно 50 мкг ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 35 нг до приблизительно 45 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1 до приблизительно 350 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 до приблизительно 250 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкг ДНК.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением формируют согласно используемому способу введения. В случаях, когда фармацевтические композиции представляют собой инъекционные фармацевтические композиции, они стерильны, апиrogenны и не содержат частиц. Предпочтительно используют изотонические рецептуры. Обычно дополнительные компоненты для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннитол, сорбитол и лактозу. В некоторых случаях изотонические растворы, такие как фосфатный буферный солевой раствор, являются предпочтительными. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

бретения в рецептуру добавляют вазоконстрикторный агент.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция является вакциной и более предпочтительно ДНК-вакциной.

Предложенной в данной заявке является вакцина, способная вызывать у млекопитающего иммунные ответы на один или более генотипов HBV. Вакцина может содержать генетический конструкт, как уже было указано выше.

Не ограничиваясь научной теорией, вакцина может быть использована для вызова иммунного ответа (гуморального, клеточного или обоих) на один или более генотипов HBV. Вакцины могут содержать кодирующие последовательности для консенсусной последовательности корового белка HBV (SEQ ID № 2); IgE-лидера, присоединенного к консенсусной последовательности корового белка HBV (SEQ ID № 4); и IgE-лидера, присоединенного к консенсусному коровому белку HBV, присоединенному к НА-маркерной последовательности (SEQ ID № 6). Вакцины могут содержать специфические кодирующие последовательности для консенсусной последовательности корового белка HBV (SEQ ID № 2), такие как (SEQ ID № 1); IgE-лидер, присоединенный к консенсусной последовательности корового белка HBV (SEQ ID № 4), такой как (SEQ ID № 3) и IgE-лидер, присоединенный к консенсусному коровому белку HBV, присоединенному к НА-маркерной последовательности (SEQ ID № 6), такой как (SEQ ID № 5).

Некоторые альтернативные варианты осуществления данного изобретения включают вакцины, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуногенные фрагменты консенсусного корового белка HBV, один или более белков, гомологичных консенсусному коровому белку HBV, и иммуногенные фрагменты одного или более белков, гомологичных консенсусному коровому белку HBV.

Некоторые варианты осуществления данного изобретения предлагают способы получения иммунных ответов на коровый белок HBV, которые включают введение индивидууму одной или более композиций, описанных в данной заявке. Некоторые варианты осуществления данного изобретения предлагают способы профилактической вакцинации индивидуумов от инфекции HBV, которые включают введение индивидууму одной или более композиций, описанных в данной заявке. Некоторые варианты осуществления данного изобретения предлагают способы терапевтической вакцинации индивидуума, инфицированного HBV, которые включают введение индивидууму одной или более композиций, описанных в данной заявке. Диагностирование инфекции HBV перед введением может осуществляться обычным способом.

Вакцина может быть ДНК-вакциной. ДНК-вакцина может содержать ряд одинаковых или разных плазмид, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие консенсусный коровый белок HBV.

ДНК-вакцины описаны в Патентах США №№ 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055 и 5676594, которые включены в данную заявку полностью путем ссылки. ДНК-вакцина может дополнительно содержать элементы или реактивы, которые сдерживают их от интегрирования в хромосому. Вакцина может представлять собой РНК корового белка HBV. РНК-вакцина может быть введена в клетку.

Вакцина может быть рекомбинантной вакциной, содержащей генетический конструкт или антиген, описанный выше. Вакцина может также содержать один или более консенсусных коровых белков HBV в виде одной или более белковых субъединиц, одной или более убитых вирусных частиц, содержащих один или более консенсусных коровых белков HBV, или одну или более истощенных вирусных частиц, содержащих один или более консенсусных коровых белков HBV. Истощенная вакцина может быть истощенными живыми вакцинами, убитыми вакцинами и вакцинами, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных генов, которые кодируют один или более консенсусных коровых белков HBV, а также субъединичной или гликопротеиновой вакцинами. Примеры истощенных живых вакцин, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных антигенов, субъединичных вакцин и гликопротеиновых вакцин 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 и 6589529, каждый из которых включен в данную заявку путем ссылки.

Вакцина может содержать векторы и/или белки, направленные против различных генотипов HBV из различных конкретных регионов мира. Предложенная вакцина может быть использована для индуцирования иммунных ответов, включая терапевтические или профилактические иммунные ответы. Могут быть получены антитела и/или киллерные Т-клетки, которые направлены на консенсусный коровый белок HBV, а также широко распространенные разнообразные генотипы вирусов HBV. Такие антитела и клетки могут быть выделены.

Вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты. Фармацевтически приемлимый эксципиент может быть функциональными молекулами, такими как наполнители, адьюванты, носители или разбавители. Фармацевтически приемлимый эксципиент может быть агентом, облегчающим трансфекцию, который может включать поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адьювант Фрейда, аналог липополисахарида,

включая монофосфорилолипид А, мурамиловые белки, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие агенты, облегчающие трансфекцию.

Агент, облегчающий трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Агент, облегчающий трансфекцию, представляет собой поли-L-глутамат, и, более предпочтительно, поли-L-глутамат присутствует в вакцине в концентрации, меньшей чем 6 мг/мл. Агент, облегчающий трансфекцию, может также включать поверхностноактивные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейда, аналог липополисахарида, включая монофосфорилолипид А, мурамиловые белки, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, и сквален, и гиалуроновая кислота может быть также использованной для введения вместе с генетическим конструктом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, ДНКвекторные вакцины могут также включать агент, облегчающий трансфекцию, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы, или другие липосомы, известные из уровня техники, как смесь ДНК-липосом (см., например, WO 9324640), ионы кальция, вирусные частицы, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию. Предпочтительно, агент, облегчающий трансфекцию, является полианионом, поликатионом, включая поли-L-глутамат (LGS), или липидом. Концентрация трансфектирующего агента в вакцине составляет меньше чем 4 мг/мл, меньше чем 2 мг/мл, меньше чем 1 мг/мл, меньше чем 0,750 мг/мл, меньше чем 0,500 мг/мл, меньше чем 0,250 мг/мл, меньше чем 0,100 мг/мл, меньше чем 0,050 мг/мл, или меньше чем 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть адъювантом. Адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде, или доставляются как белки в комбинации с плазмидой в вакцине. Адъювант может быть выбранным из группы, состоящей из:  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферона (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -интерферона, фактора роста тромбоцитов (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), хемокинов, притягивающих Т-клетки кожи (STACK), эпителиальных тимусоэкспрессированных хемокинов (TECK), ассоциированных со слизистой эпителиальных хемокинов (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включая IL-15 с удаленной сигнальной последовательностью и необязательно включающей сигнальный пептид из IgE. Адъювант может быть IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, фактором роста тромбоцитов (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, эпидермальным фактором роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, или их комбинацией.

Другие гены, которые могут быть полезными адъювантами, включают те кодирующие: 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, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, инактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферона, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC 5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\chi$ 40, O $\chi$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

##### 5. Способы доставки.

Предложенным в данной заявке является способ доставки фармацевтических композиций, предпочтительно вакцин, для обеспечения генетических конструктов и белков корового белка HBV, которые содержат эпитопы, которые делают их особенно эффективными иммуногенами, против которых может быть вызван иммунный ответ к вирусной инфекции HBV. Способ доставки вакцины, или вакцинация, могут быть обеспечены для вызова терапевтического и/или профилактического иммунного ответа. Процесс вакцинации вызывает у млекопитающего иммунные ответы на ряд генотипов HBV. Вакцина может быть доставлена индивидууму для модулирования активности иммунной системы млекопитающего и увеличения иммунного ответа. Доставка вакцины может представлять собой трансфекцию НА-антигена в виде молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и доставляется к поверхности клетки, на которой иммунная система ее распознает и индуцирует клеточный, гуморальный или клеточный и гуморальный ответ. Доставка вакцины может быть использована для индуцирования или вызова иммунного ответа у млекопитающих на ряд вирусов HBV путем введения млекопитающим вакцины, как было указано выше в данной заявке.

При доставке вакцины млекопитающему и вследствие того вектора в клетку млекопитающего, трансфектированные клетки будут экспрессировать и секретировать консенсусный коровый белок HBV. Эти секретированные белки или синтетические антигены будут распознаны иммунной системой как чужеродные, которая установит иммунный ответ, который может включать: антитела, полученные против антигенов, и реакцию Т-клеток, в частности, на антиген. В некоторых примерах у млекопитающего, вакцинированного вакцинами, рассмотренными в данной заявке, будет запущена иммунная система и когда произойдет заражение вирусным штаммом HBV, запущенная иммунная система позволит быстро очи-

ститься от последующих вирусов HBV или через гуморальный, клеточный, или гуморальный и клеточный ответы. Вакцина может быть доставлена индивидууму для модулирования активности иммунной системы индивидуума, тем самым увеличивая иммунный ответ.

Вакцина может быть доставлена в форме ДНК-вакцины, а способы доставки ДНК-вакцин описаны в патентах США №№ 4945050 и 5036006, которые включены в данную заявку полностью путем ссылки.

Вакцина может быть доставлена млекопитающему для вызова иммунного ответа у млекопитающего. Млекопитающее может быть человеком, нечеловекообразной обезьяной, коровой, свиньей, овцой, козлом, антелопой, бизоном, буйволом, полорогим жвачным животным, оленем, ежом, слоном, ламой, альпака, мышей, крысой или курицей и предпочтительно человеком, коровой, свиньей или курицей.

а) Комбинированное лечение.

Фармацевтические композиции, преимущественно вакцины, описанные в данной заявке, могут применять комбинацию белков или генов, кодирующих адьюванты, которые включают:  $\alpha$ -интерферон (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферон (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -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, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, инактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферона, NF $\kappa$ B, 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 фрагменты.

б) Пути введения.

Вакцина может быть введена разными путями, включая оральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, путем ингаляции, путем букального введения, внутривенный, внутриартериальный, внутриперитонеальный, подкожный, внутримышечный, внутриназальный, интратекальный и внутрисуставной или их комбинации. Для ветеринарного использования композиция может быть введена как приемлемая рецептура в соответствии с нормальной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить режим дозирования и путь введения, который является самым подходящим для определенного животного. Вакцина может быть введена с помощью обычных шприцов, безыгольных инъекторов, "пушек для бомбардировки микрочастицами" или других физических способов, таких как электропорация ("EP"), "гидродинамический способ" или ультразвук.

Вакцинный вектор может быть доставлен млекопитающему с помощью нескольких хорошо известных технологий, включая инъекцию ДНК (также именуемую ДНК-вакцинацией) с или без электропорации *in vivo*, посредством липосом, с помощью наночастиц, рекомбинантных векторов, таких как аденовирус, ассоциированный вирус рекомбинантного аденовируса и рекомбинантного вируса коровьей оспы. Антиген HBV может быть доставлен путем ДНК-инъекции и одновременно с электропорацией *in vivo*.

с) Электропорация.

Введение вакцины с помощью электропорации вакцинных плазмид может быть выполнено с использованием электропорационных устройств, которые оснащены для доставки к целевой ткани млекопитающего энергии импульса, эффективной для инициирования образования обратимых пор в клеточных мембранах, и, предпочтительно, энергия импульса представляет собой постоянный ток, подобный заданному току, введенному пользователем. Электропорационное устройство может содержать электропорационный компонент и электродное устройство или рукоятку.

Электропорационный компонент может включать и объединять один или более различных элементов электропорационных устройств, включая: контроллер, генератор формы тока, тестер импеданса, логгер формы волны, входной элемент, элемент создания отчетов о состоянии, коммуникационный порт, компонент памяти, источник питания и переключатель питания. Электропорация может быть достигнута с использованием электропорационного устройства *in vivo*, например, EP системы CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) или электропоратора Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.), для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Примеры электропорационных устройств и электропорационных способов, которые могут облегчить доставку ДНК-вакцин настоящего изобретения, включают описанные Draghia-Akli, et al. в патенте США № 7245963, в патентной публикации США № 2005/0052630, поданой Smith, et al., содержание которых полностью включено в данную заявку посредством ссылок. Другие электропорационные устройства и электропорационные способы, которые могут быть использованы для облегчения доставки ДНК-вакцин, включают те, которые предложены в одной из двух патентных заявок США, находящихся одновременно на рассмотрении и в совместном пользовании, № 11/874072, поданой 17 октября 2007, которая испрашивает преимущества на основании 35 USC 119(e) предварительной заявки № 60/852149, поданой

17 октября 2006, и № 60/978982, поданой 10 октября 2007, все они полностью включены в данную заявку.

Патент США № 7245963, Draghia-Akli, et al. описывает модулярные системы электродов и их использование для облегчения введения биомолекул в клетки выбранной ткани в теле или растении. Модулярные системы электродов могут содержать игольчатые электроды, гиподермальную иглу, электрический соединитель, который обеспечивает проводящее звено из контроллера программируемого импульса постоянного тока к игольчатым электродам; и источник питания. Оператор может держать игольчатые электроды, которые смонтированы на опорной конструкции, и плотно всавлять их в выбранную ткань в теле или растении. Биомолекулы затем доставляются через гиподермальную иглу в выбранную ткань. Активируют контроллер программируемого импульса постоянного тока, а электрический импульс постоянного тока распространяется на игольчатые электроды. Приложенный программируемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекул в клетку между электродами. Полное содержание патента США № 7 245963 включено путем ссылки.

Патентная публикация США № 2005/0052630, поданная Smith, et al., описывает электропорационное устройство, которое может быть использовано для эффективного облегчения введения биомолекул в клетки выбранной ткани в теле или растении. Электропорационное устройство содержит электрокинетическое устройство ("ЕКД-устройство"), работа которого определена программным обеспечением или программируемым оборудованием. ЕКД-устройство производит серию программируемых образцов импульса постоянного тока между электродами в массиве, исходя из контроля пользователя и ввода импульсных параметров, и позволяет хранить и накапливать данные о форме тока. Электропорационное устройство также содержит сменный электродный диск, имеющий массив игольчатых электродов, центральный инъекционный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Полное содержание патентной публикации США № 2005/0052630 включено путем 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, такие как мышцы, но также и в другие ткани и органы. Из-за конфигурации электродного массива, инъекционная игла (для доставки предпочтительной биомолекулы) также полностью вставляется в орган-мишень и инъекция вводится перпендикулярно ткани-мишени, 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 иглы.

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, которые включают электропорационные устройства и их использование, предположены электропорационные устройства, описанные в следующих патентах: патент США № 5273525, опубликованный 28 декабря 1993, патенты США № 6110161, опубликованный 29 августа 2000, № 6261281, опубликованный 17 июля 2001, и № 6958060, опубликованный 25 октября 2005, и патент США № 6939862, опубликованный 6 сентября 2005. Кроме того, в данной заявке рассмотрены патенты, покрывающие объект изобретения, обеспеченный в патенте США № 6697669, опубликованном 24 февраля 2004, который касается доставки ДНК с использованием любого из множества устройств, и патент США № 7328064, опубликованный 5 февраля 2008, относящийся к способу инъекции ДНК.

#### d) Способ приготовления вакцины.

Предложенными в данной заявке являются способы приготовления ДНК-плазмид, которые содержат ДНК-вакцины, описанные в данной заявке. ДНК-плазмиды после заключительного шага субклонирования в экспрессионную плазмиду млекопитающего могут быть использованы для инокулирования клеточной культуры в ферментационном чане большого размера, используя известные в области техники способы.

ДНК-плазмиды для использования с электропорационными устройствами настоящего изобретения могут быть сформированы или получены с использованием комбинации известных устройств и методов, но предпочтительно их получают, используя оптимизированный способ получения плазмид, который описан в опубликованной заявке США № 20090004716, которая была подана 23 мая 2007. В некоторых примерах ДНК-плазмиды, использованные в этих исследованиях, могут быть сформированы при концентациях, больших чем или равных 10 мг/мл. Способы получения также включают или охватывают различные устройства и протоколы, которые обычно известны специалистам в данной области техники, в дополнение к описанным в патентной заявке США № 60/939792, включая описанные в патенте, составляющем предмет лицензии, патент США № 7 238522, который опубликован 3 июля 2007. Вышеуказанные заявка и патент, заявка США № 60/939,792 и патент США № 7 238 522, соответственно, полностью включены в данную заявку.

#### Пример

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, несмотря на то, что показывают предпочтительные варианты осуществления данного изобретения, даны только для иллюстрации. Исходя из вышеизложенного описания и примеров, специалист в данной области техники может определить существенные характеристики этого изобретения и, не отступая от его объема и сущности, может внести различные изменения и модификации для его адаптации

к различным использованиям и условиям. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным в данной заявке будут очевидны для специалиста в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации также находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Консенсусный коровый белок HBV, также именуемый модифицированным HBV или М-коровым конструктором, был разработан из эпитопных последовательностей генотипов А, В, С, D и Е вируса гепатита В. Последовательности коровых белков HBV из этих генотипов были отобраны для включения в конструкцию консенсусного кора, который будет вызывать иммунитет к широкому спектру генотипов, тем самым обеспечивая универсальную вакцину для HBV. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения модификации М-корового конструктора включали добавление последовательности IgE-лидера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения М-коровый белок кодируется с использованием оптимизации кодонов и оптимизации РНК для повышения экспрессии.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность М-кора с IgE-лидером и НА-маркером (SEQ ID № 5), была клонирована в экспрессионный вектор pVAX для получения конструктора pM-Core. *In vitro* тесты экспрессии были проведены с использованием конструктора pM, а pVAX был использован в качестве контроля. Результаты, демонстрирующие положительную экспрессию, представлены на геле-электрофоретических изображениях, показанных на фиг. 2А и 2В.

Трансгенные мыши C57BL/6 были разделены на две группы из четырех мышей каждая, и, используя электропорацию, проиммунизированы трижды 20 мкг ДНК с интервалом в две недели (группа 1 - контроль, вектор pVAX; группа 2 - pM-Core). Мышей иммунизировали в день 0, день 14, день 28 и умертвляли на тридцать пятый день. Селезенки, печень и сыворотка были получены из умертвленных животных.

Исследования *in vivo* штаммов мышей C57BL/6 показывают повышение магнитуды секреции фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), интерферона гамма Т-клеток (IFN- $\gamma$ ) и CD 107a в CD8 и CD4 Т-клетках, взятых из селезенки. На фиг. 3А и 3В показано, что вакцинация мышей C57BL/6 pM-Core повышает магнитуду секреции IFN- $\gamma$  в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенки. На фиг. 4А и 4В, показано, что вакцинация мышей C57BL/6 pM-Core повысила магнитуду секреции TNF- $\alpha$  в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенки. На фиг. 5А и 5В показано, что вакцинация мышей C57BL/6 pM-Core повысила магнитуду секреции CD 107a в CD8+ и CD4+ Т-клетках из селезенки.

HBV-специфическая миграция Т-клеток в печень была также продемонстрирована на животных, которым вводили ДНК-вакцину pM-Core. Нацеливание Т-клеток, специфичных к коровому антигену HBV, с высокой частотой и эффекторной функцией в печень является важной целью для развития иммунной терапии HBV. После иммунизации животные были умертвлены, а их печень была изъята, была определена миграция в печень HBV-специфичных эффекторных Т-клеток. Результаты показали, что вакцина pM-Core приводит эффекторные Т-клетки в печень *in vivo*. На фиг. 6А и 6В показана реакция гамма-интерферона Т-клеток в печени, на фиг. 7А и 7В показана реакция фактора-альфа некроза опухоли Т-клеток в печени и повышение иммунного ответа, которое происходит в результате вакцинации pM-Core.

Консенсусный иммуноген М-кора, кодируемый ДНК-конструктором pM-Core, вызывает строго сбалансированные CD4+/CD8+ Т-клеточные иммунные ответы. Вызванный трафик Т-клеток в печень с высокой частотой демонстрирует подходящий эффекторный фенотип для иммунного клиренса постинфекции HBV.

На фиг. 8 показаны клеточные иммунные реакции, вызванные pM-Core, с использованием метода иммуноферментных пятен (ELISPOT). Спленоциты были стимулированы двумя пулами 15-мерных пептидов, охватывающих всю длину pM-Core и лапирование 8 аминокислотами. 200000 спленоцитов в среде R10 были помещены в 96-луночную планшету, покрытую иммобилизованными антителами IFN- $\gamma$  (R&D system), и оставлены на ночь для стимулирования в присутствии специфического пептидного пула при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки смыли, а планшеты инкубировали в течение ночи с биотинилированным антимышиным идентифицирующим антителом IFN- $\gamma$  (R&D system). Затем были использованы стрептавидин-щелочная фосфатаза и 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфата р-толуидиновая соль и хлорид нитросинего тетразолия для развития пятен. Пятна были посчитаны с помощью автоматизированного ридера ELISPOT (CTL Limited). Как показано на фиг. 8, иммунизация pM-Core могла вызвать сильные клеточные иммунные реакции. Данные показали, что доминантные эпитопы склонялись к пулу пептида 2. Средние HBsAg-специфичные IFN- $\gamma$  Т-клеточные реакции составили приблизительно 2000 ( $\pm$  210) SFU на миллион спленоцитов.

*In vivo* анализы цитотоксичности проводились с использованием меченая сукцинимидоловым эстером диацетата карбоксифлюоросцеина (CFSE), комбинированного с проточной цитометрией. Мы оценили клеточное деление среди клеток клеточных популяций. Спленоциты были изъяты из нативных мышей и разделены на две популяции. Одна популяция, высоко меченая CFSE, пульсировала с релевантным пептидом (например, коровыми пептидами HBV). Другая популяция, низко меченая CFSE, пульсировала с иррелевантным пептидом (например, NS3-пептидами HCV). Меченные обработанные пептидом клетки объединили и использовали в экспериментах создания адаптивного иммунитета, в которых про-

водился проточный анализ. Объединенные популяции обработанных меченых клеток-мишеней ввели двум группам мышей, контрольной группе и иммунизированной группе. Спленоциты отобрали из каждой группы мышей, а образцы перенесли на проточный цитометр. Измерили количество CFSE. Как правило, в таких экспериментах образуется два пика, первый представляет собой иррелевантный пептид; второй представляет собой иммунизирующий пептид на пике, указывающем большее CFSE.

На фиг. 9 показано, что CD8 Т-клетки, индуцированные вакцинацией, могут специфично элиминировать клетки-мишени *in vivo*. Результаты показывают, что образцы селезенки и печени от нативных мышей содержали почти равные количества клеток, которые были в пиках иррелевантного и релевантного пептидов, в то время как результаты ясно показывают, что среди иммунизированных групп пики для клеток, полученных из пульсирующих с релевантным пептидом, были существенно меньше чем с иррелевантным пептидом. Эти данные показывают, что клетки-мишени, обработанные пептидом HBV, специфично элиминировались из мышей, иммунизированных вакциной HBV, но не из неиммунизированных мышей. Любая элиминация клеток-мишеней, обработанных иррелевантным пептидом, если это произошло вообще, была одинаковой и у иммунизированных вакциной HBV мышей, и у неиммунизированных мышей и значительно меньше чем элиминация клеток-мишеней, обработанных пептидом HBV.

На фиг. 10 показаны данные, собранные из анализа пролиферации Т-клеток с использованием CFSE-мечения. Сравнивали процент пролиферации CD3+CD4+ клеток и CD3+CD8+, обработанных вектором pVax (контроль) и плазмидой pMCore, которая экспрессирует М-кор HBV. Кратко, изолированные спленоциты окрашивали сукцинилимидным эстером диацетата карбоксифлуоросцеина (CFDA-SE) из Cell Tracer Kit (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Окрашенные клетки трижды промыли физраствором и оставили на ночь для стимулирования с pMCore-специфичными пептидами с перекрывающимися последовательностями. Клетки инкубировали при 37°C в течение 96 ч. Через 48 ч 50% культуральной среды отбирали и заменяли свежим R10. На четвертый день клетки собрали и покрасили с CD3, CD4 и CD8-специфичными моноклональными антителами (BD Pharmingen). Клетки зафиксировали PBS с 1% параформальдегидом (PFA) и обнаруживали на FACScalibur (Becton Dickinson). Данные анализировали с использованием программы Flow Jo. CFSE-низкая и CFSE-средняя популяция рассматривалась как пролифелированные клетки, как показано на фиг. 10, CD3+CD8+ Т-клетки, выделенные из селезенки, пролифелируют интенсивнее по сравнению с CD3+CD4+ Т-клетками.

На фиг. 11А и 11В представлены данные ELISA, демонстрирующие сравнение антитела против ко-ра HBV в серийных разведениях сывороток от животных, обработанных вектором pVax (контроль) или плазмидой pMCore, которая экспрессирует М-кор HBV. Кратко, высокосвязывающие планшеты ELISA (Costar, Corning, 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 добавили в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания связанное сывороточное антитело обнаруживали HRP-меченным козым антитыминым IgG (фиг. 11А) или IgA (фиг. 11В). Пероксидазоксиогированное антитело определяли с использованием тетротметилбензидина (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата, а OD при 450 нм измеряли с помощью планшет-ридера Multiscan ELISA. В сыворотке, собранной из иммунизированных мышей, наблюдался антиген-специфический гуморальный ответ.

На фиг. 12 показан процент TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  из CD4+ и CD8+ клеток селезенки и печени.

В отсутствие модели мелких животных для HBV, HBcAg использовали для временной трансфекции мышинной печени путем гидродинамической инъекции. Иммунизированные мышинные печени трансфектировали pMCore или NS3/4A HCV. Иммуногистохимическое окрашивание через три дня после трансфекции показало клиренс HBcAg-трансфектированных гепатоцитов по сравнению с NS3/4A-трансфектированными гепатоцитами. Чтобы удостовериться, что клиренс, индуцированный иммунизированными мышами, не вызывает каких-либо повреждений печени измеряли уровни ALT в сыворотке. Результаты на фиг. 13 показывают, что клиренс, вызванный иммунизированными мышами, не вызывает каких-либо повреждений печени.

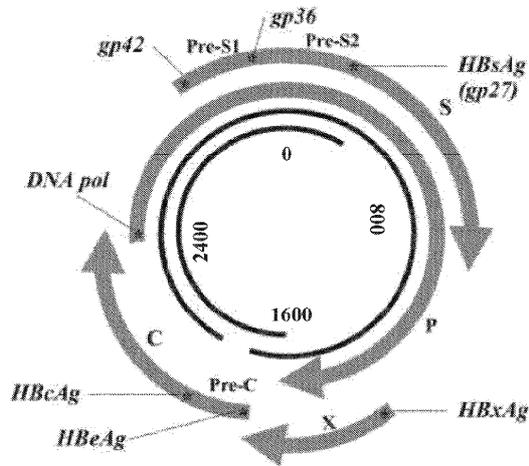
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина для индукции иммунного ответа на HBV, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, включающую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую иммуногенный фрагмент белка, содержащего по меньшей мере 120 последовательных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 2, где последовательные аминокислотные остатки включают остатки серина в аминокислотных положениях 74 и 87 SEQ ID NO:2.

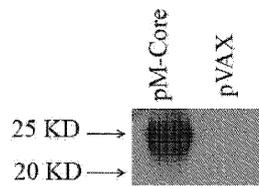
2. Вакцина по п.1, в которой молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид связанный с N-концом.

3. Вакцина по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность включает фрагмент SEQ ID NO: 1, которая кодирует по меньшей мере 120 последовательных аминокислотных остатков SEQ ID NO:2, где последовательные аминокислотные остатки включают остатки серина в положениях аминокислотных остатков 74 и 87 SEQ ID NO: 2.

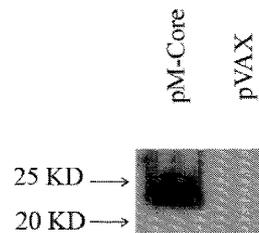
4. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая сигнальный пептид, связанный с 5'-концом нуклеотидной последовательности.
5. Вакцина по п.1, в которой молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой плазмиды.
6. Вакцина по п.1, в которой молекула нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионный вектор.
7. Вакцина по п.1, в которой указанный иммуногенный фрагмент включает по меньшей мере 180 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2.
8. Вакцина по п.3, в которой указанный иммуногенный фрагмент включает по меньшей мере 180 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2.
9. Вакцина по п.1, в которой молекулы нуклеиновой кислоты включены в вирусные частицы.
10. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая молекулу адьюванта.
11. Вакцина по п.10, в которой адьювант представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.
12. Способ индукции иммунного ответа против HBV, включающий введение субъекту вакцины по п.1.



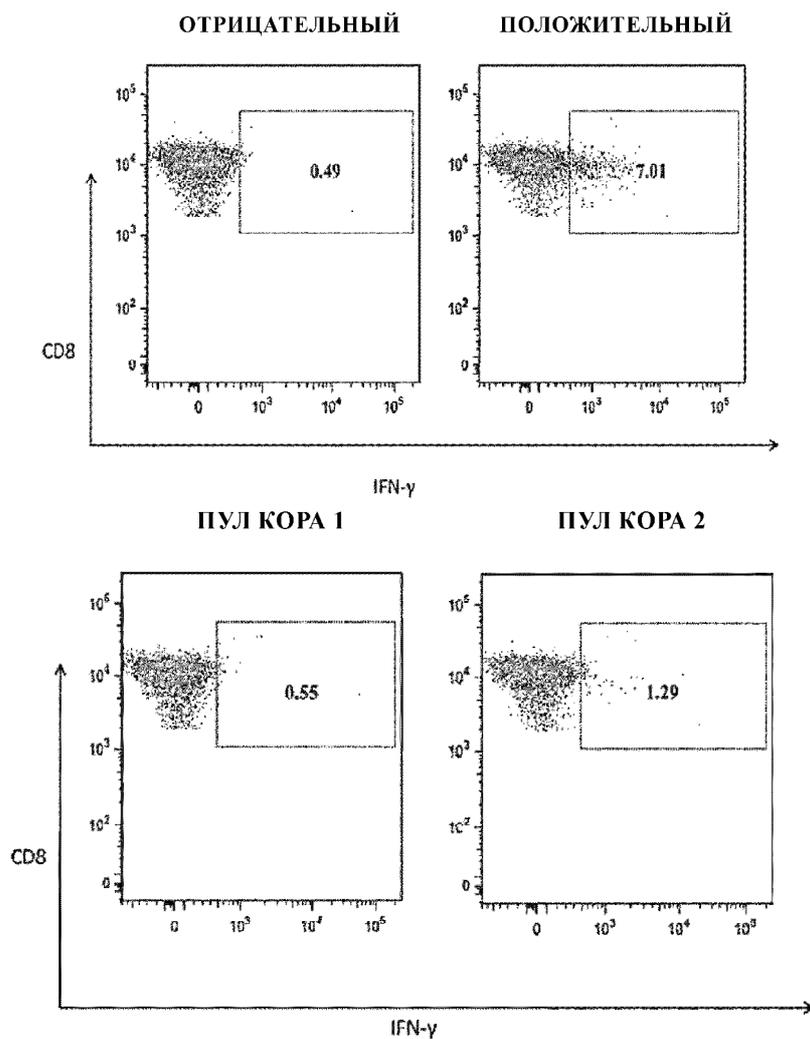
Фиг. 1



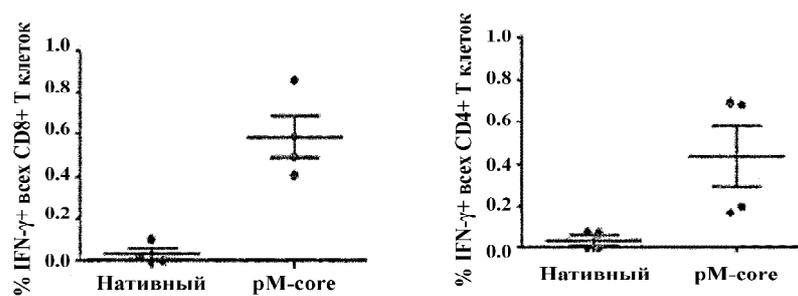
Фиг. 2А



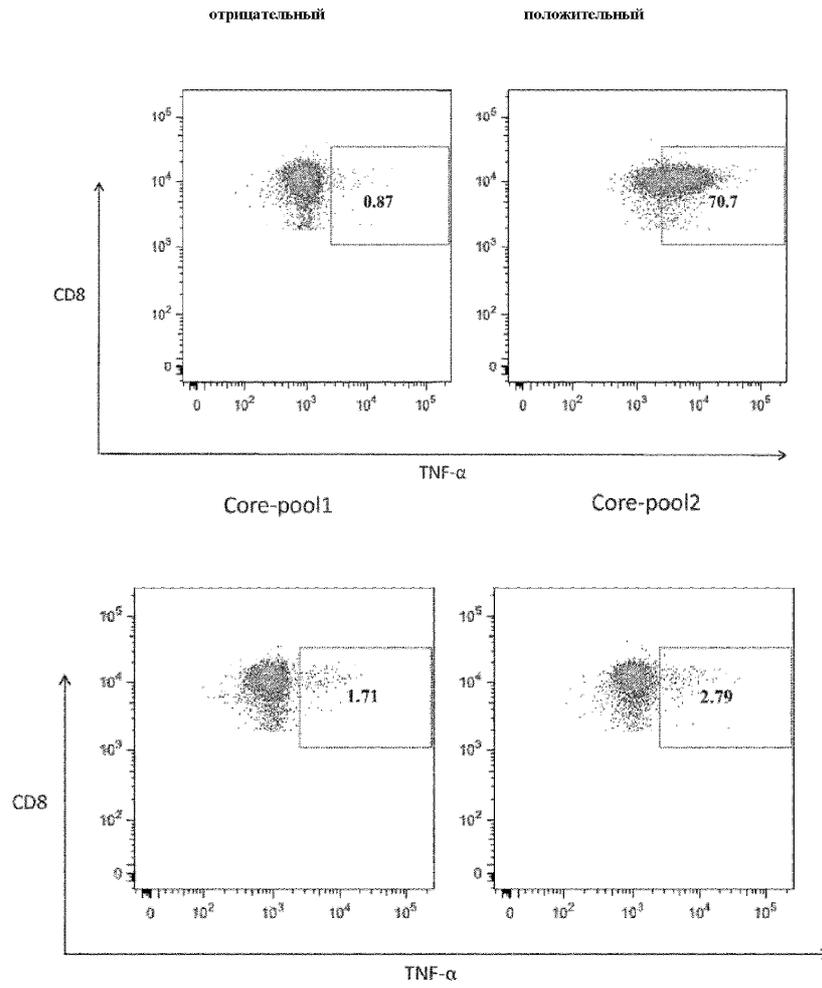
Фиг. 2В



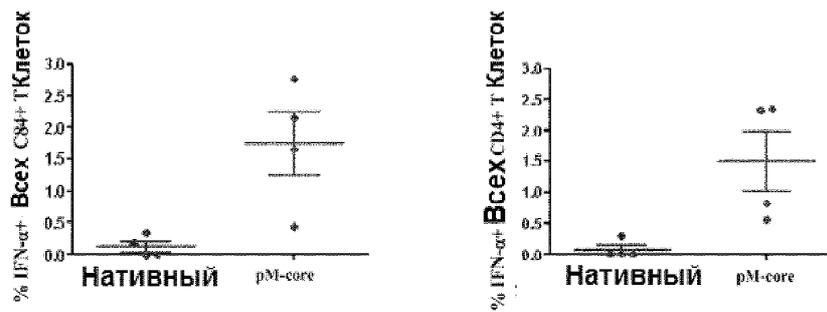
Фиг. 3А



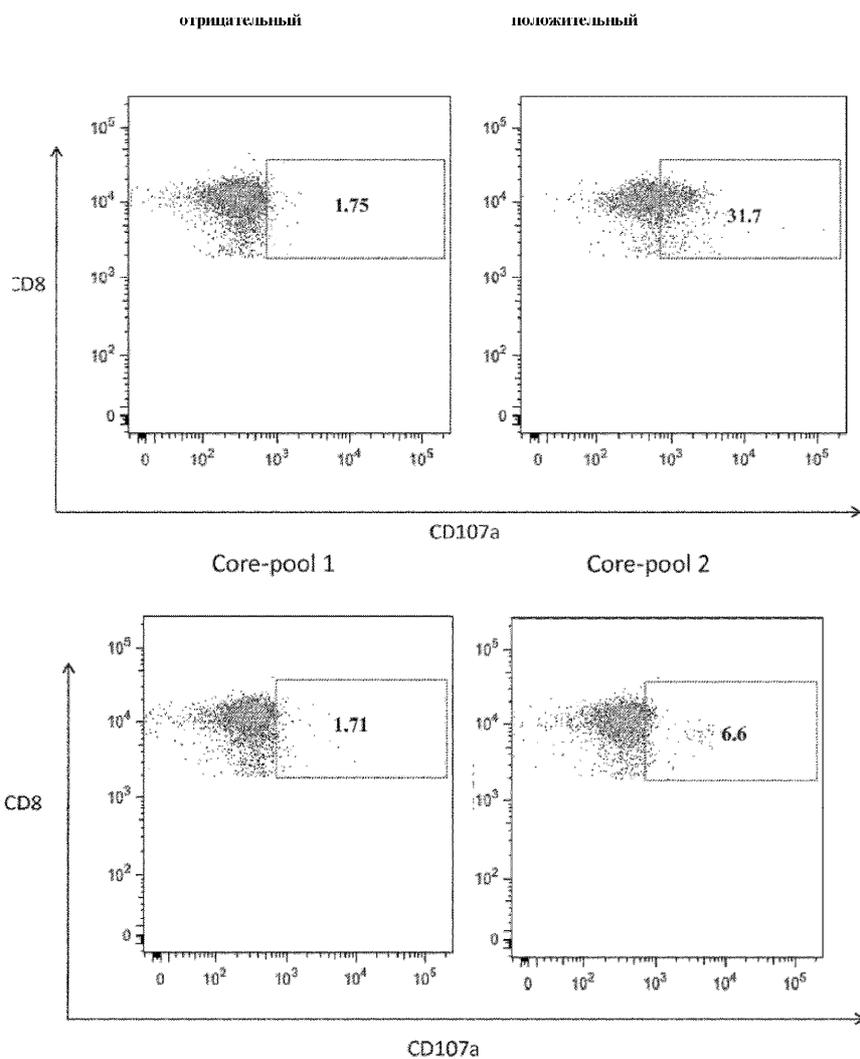
Фиг. 3В



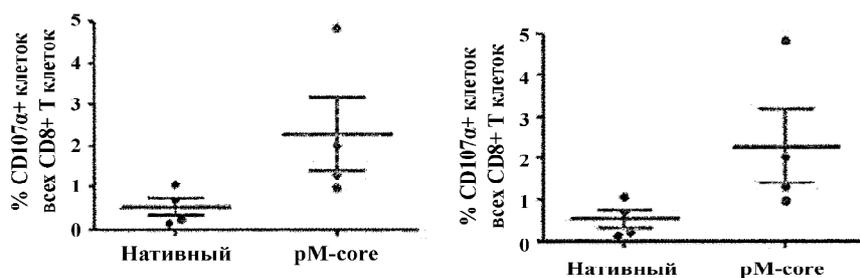
Фиг. 4А



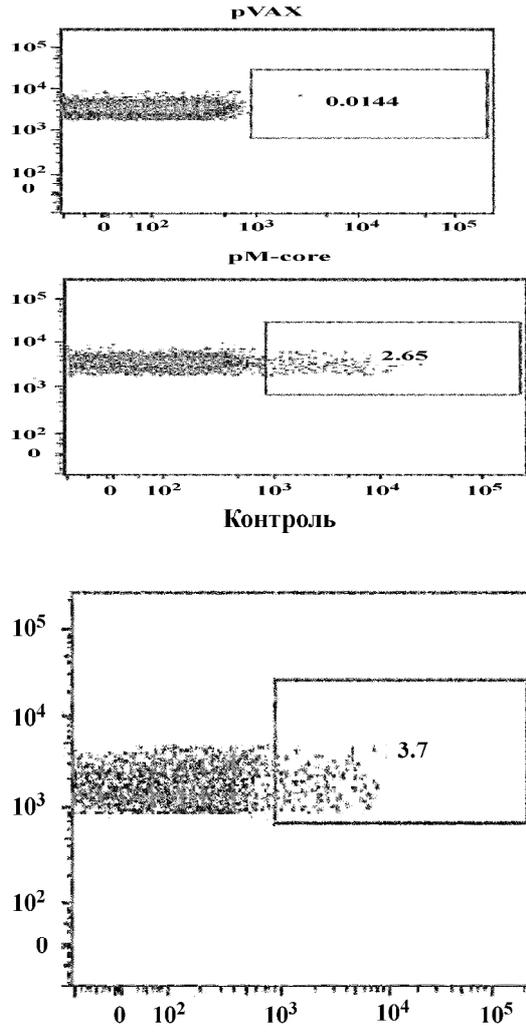
Фиг. 4В



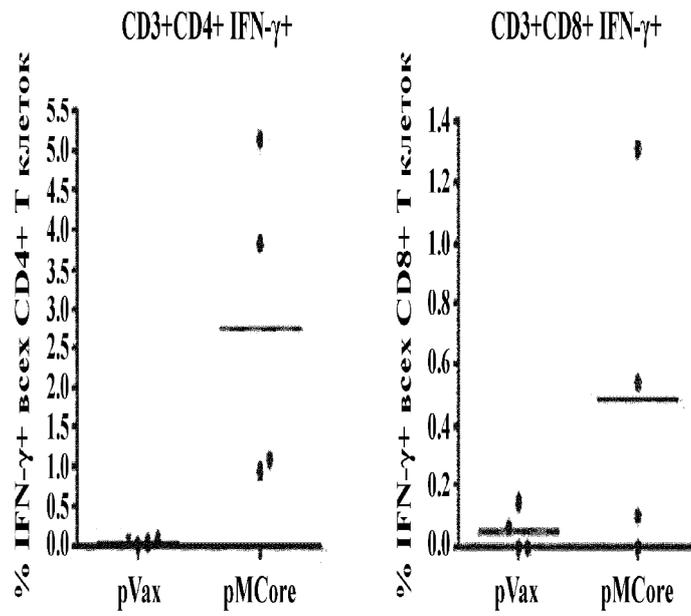
Фиг. 5А



Фиг. 5В



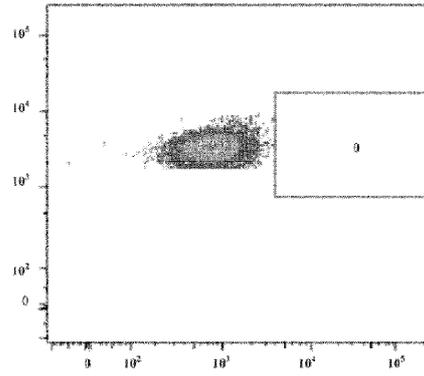
Фиг. 6А



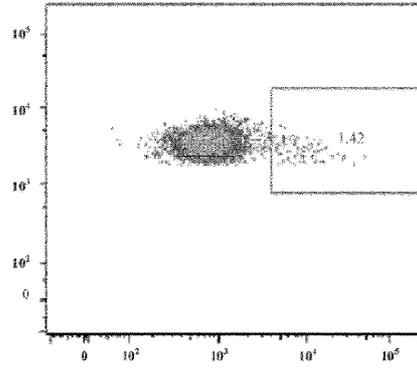
Фиг. 6В

037377

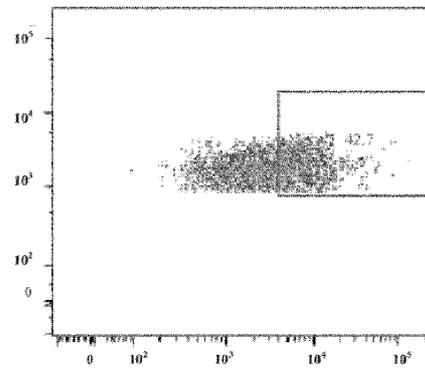
pVAX



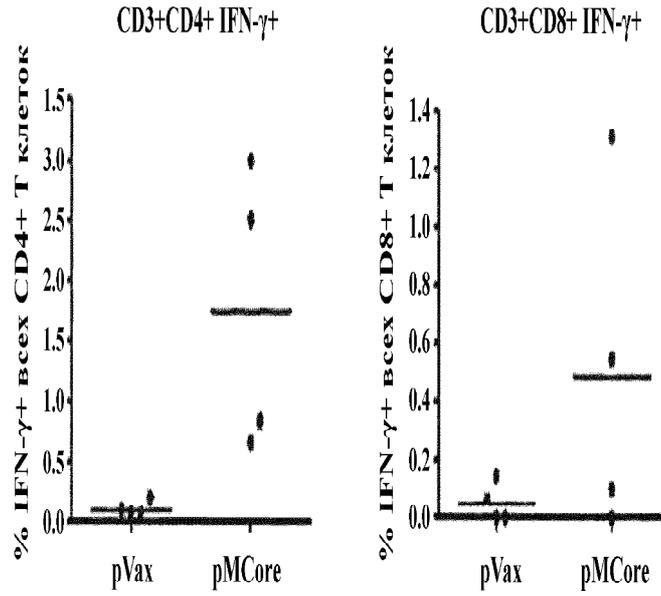
pMCore



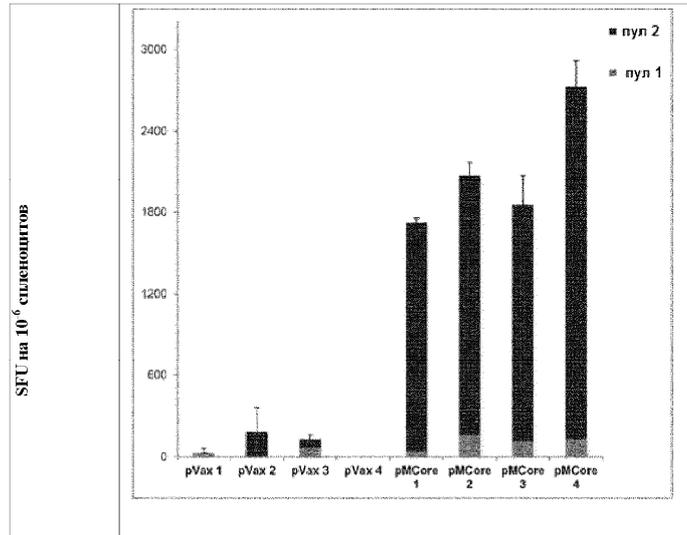
контроль



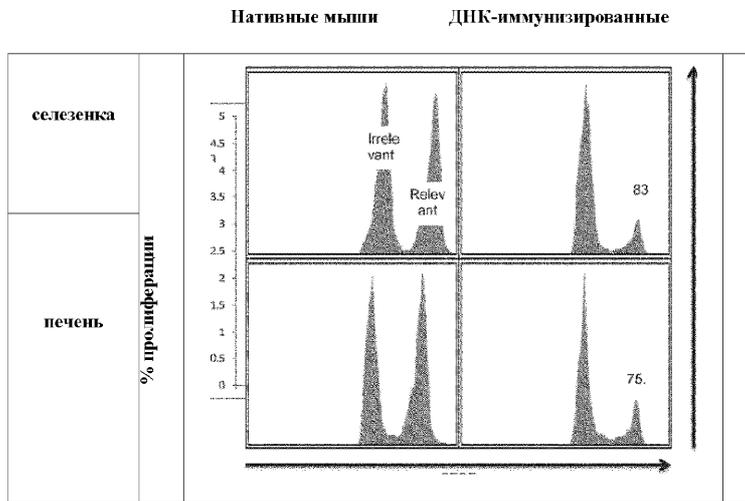
Фиг. 7А



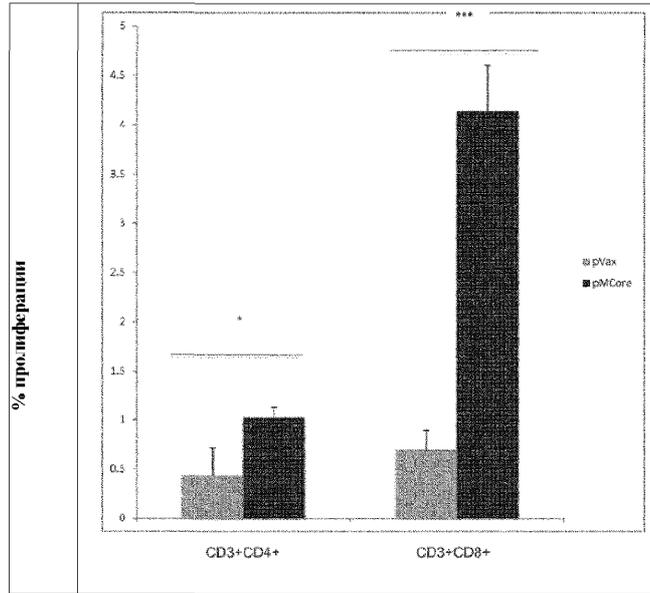
Фиг. 7В



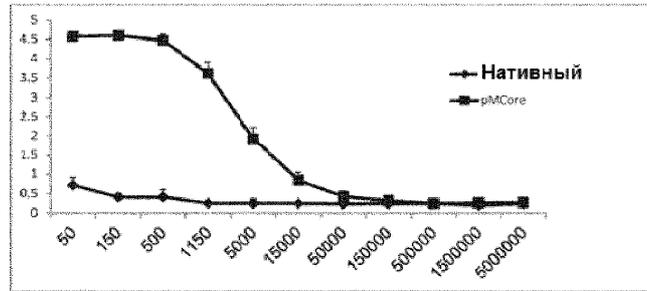
Фиг. 8



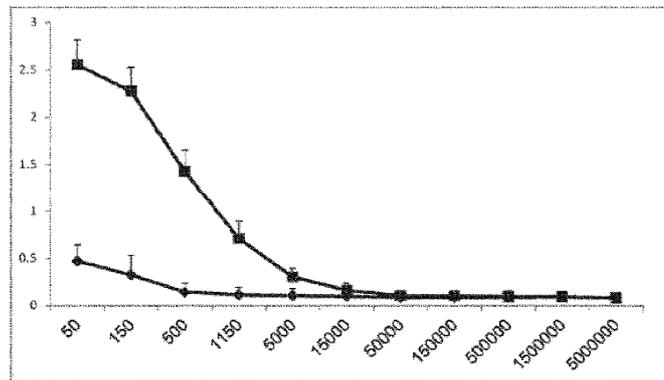
Фиг. 9



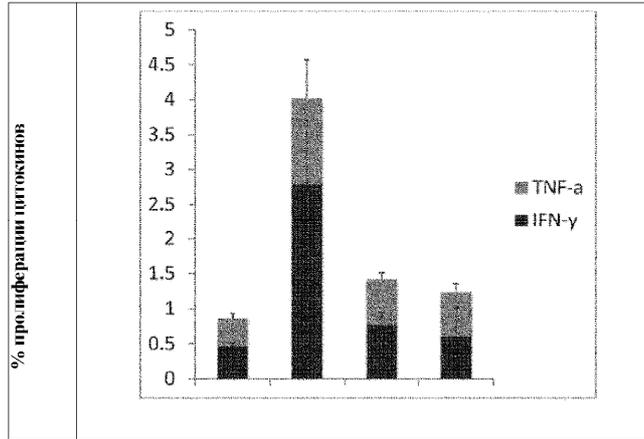
Фиг. 10



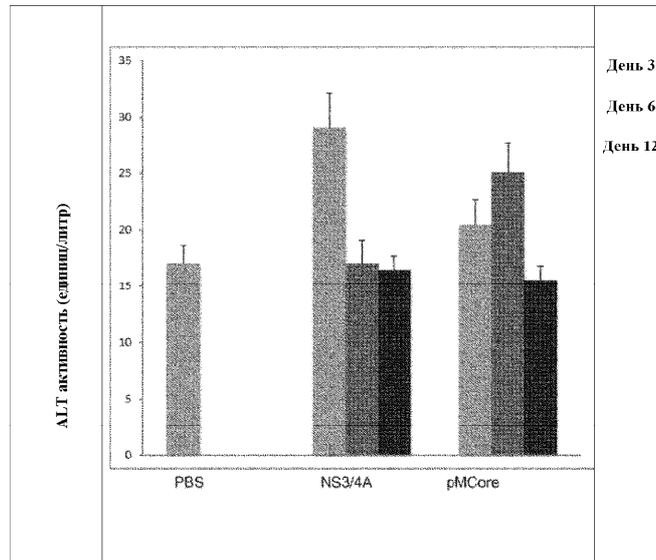
Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 12



Фиг. 13

